

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590111

研究課題名（和文）疎水性を指標としたソマトスタチン配列を有する抗腫瘍化合物の探索

研究課題名（英文）Search for the anti-tumor derivatives containing the somatostatin sequence focusing on the hydrophobic index

研究代表者

津田裕子（TSUDA YUKO）

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：10098478

研究成果の概要（和文）：(1) ソマトスタチン配列(X-Tyr-D-Trp-Y)の疎水性を高めるような Y 基の置換、Tyr 残基の置換を行い、より疎水性に富み腫瘍細胞の増殖を抑制する化合物群を得た。(2) C 末 (=Y) に疎水性を有するナフチル基を導入し、D-Trp を Ile に置換することにより、DNA ポリメラーゼ (pol)β を選択的に阻害し腫瘍細胞増殖抑制活性を有する化合物を得た。(3) さらに腫瘍細胞増殖抑制活性を示した化合物を NBD で蛍光標識し、その細胞内分布を検討した結果、アダマンチル基およびナフチル基含有化合物は膜透過性に優れていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A structure-activity relationship studies revealed that hydrophobicity of Y0-14 could be responsible for their antiproliferative activity. This hypothesis has been explored in this project using the somatostatin sequence, X-Tyr-D-Trp-Y, and peptide synthesis technique: (1) substitution of Tyr produced more hydrophobic Y0 compounds with higher antiproliferative activity than Y0-14; (2) double replacement (X-Tyr-Ile-NH-naphthalene) created a potent and β-specific DNA pol inhibitor; (3) the distribution of Y0 compounds incorporated fluorescent NBD, demonstrated that an adamantane moiety had an excellent permeability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：抗腫瘍活性、疎水性、ソマトスタチン配列、DNA polymerase 阻害

1. 研究開始当初の背景
抗腫瘍活性を有する化合物は多数あり、ソマトスタチン (SS-14) もその一つである。SS-14 は成長ホルモン、グルカゴン、インス

リン、ガストリン等の分泌を抑制するばかりでなく、腫瘍細胞の成長を抑制することが知られている。これら SS-14 の作用はソマトスタチン受容体(SSTR 1-5)を介して引き起こさ

れ、SSTR 1-5 は正常細胞のみならず腫瘍細胞にも多く発現している。そこで、ホルモン分泌抑制活性を示さない抗ガン剤の開発を目指した SS-14 類似体の探索が進められてきた。そのような状況下、ホルモン分泌抑制活性を示さず、腫瘍活性のみを示す TT232 [H-D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Thr-NH₂] が Keri らにより報告された (Proc. Natl. Acad. U. S. A. 1996, 93, 12513)。我々は、TT232 をさらに小分子化し、抗腫瘍活性物質の探索を行い、Y0-14 (H-Tyr-D-Trp-1-NH-Adamantyl) を得た。Y0-14 の構造—活性研究の結果、疎水性と抗腫瘍活性および DNA polymerase (DNA pol) 阻害活性の間により相関があることを示唆した (Miyazaki et al. J. Med. Chem. 2008, 51, 5121; Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008, 18, 6199)。

2. 研究の目的

- (1) 腫瘍細胞増殖抑制活性を向上させることを目的として、Y0-14 を基盤としてより疎水性の高い誘導体の合成を行った。
- (2) DNA pol 分子種選択的阻害物質を得る目的で、Y0-14 の構造変換を行なった。
- (3) Y0-14 の腫瘍細胞増殖抑制作用発現の機構を明らかにするために、腫瘍細胞増殖抑制活性を示す化合物を NBD で蛍光標識し、その細胞内分布を検討した。

3. 研究の方法

- (1) まず、Y0-14 に疎水性を付加する分子修飾を行った。一例をあげると Tyr の OH 基の修飾 (Bzl 基など) や、N-メチル化を行い、Tyr 残基を Phe, 2', 6'-dimethyl-L-tyrosine (Dmt)、1-naphthylalanine (1-Nal)、2-naphthylalanine (2-Nal) で置換した (図 1)。

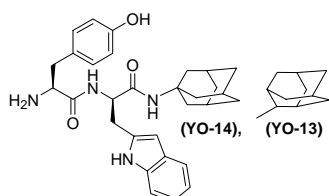


図 1. Y0-14 および-13 の化学構造

得られた化合物の疎水性は、HPLC を用い Valko らの方法 (J. Chromatogr., 2004, 1037, 299) に従って ϕ_0 値を求めて評価した。

- (2) DNA pol 阻害を標的とした小分子の設計は C 末にナフチルアミド基を有する化合物から開始した。C 末にナフチルアミド基を有する化合物は腫瘍細胞増殖抑制活性をほとんど示さなかったものの、DNA pol α および β を強力に阻害した。DNA pol は、DNA 複製や修復等に関与する DNA 合成酵素群であり、その分子種選択的阻害剤は、抗炎症剤や抗ガン剤としてだけでなく、各分子種の未知の機能解明にも役立つと期待された。そこで、pol 分子種選択的阻害剤の開発を目指し、ナフタ

レン骨格を基盤とし、pol に対する親和性と化合物が細胞内に侵入する必要性を考慮し、D-Trp をさまざまな酸性および疎水性アミノ酸で置換した化合物をデザイン、合成した (図 2)。

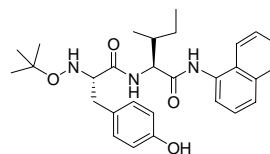


図 2. Y0-96 の化学構造

- (3) 誘導体の腫瘍細胞増殖抑制活性は、ヒト大腸がん由来細胞 (HCT116 細胞) を用い、MTT test で評価した。
- (4) 誘導体の DNA pol 阻害活性は合成テンプレート・プライマー-poly (dA9/oligo (dT)) に対するヌクレオチド [³H]-dTTP の取り込みにより評価した。
- (5) ソマトスタチン受容体 (SSTR 1-5) に対する結合活性はヒト・リコンビナント CHO-K1 cells および HEK-298 EBNA cells に発現した SSTR 1-5 を用い、ラジオリガンドとの競合拮抗実験により測定した。
- (6) Y0-14 の細胞内移行を検討するために、Y0-14 に蛍光基である nitrobenzofurazan (NBD) を導入した Y0-80 を合成した。Y0-80 を Colon26 cells に接触させ、共焦点レーザー顕微鏡で経時的に観察した。輝度平均値を膜透過の指標として評価した。

4. 研究成果

- (1) Tyr 残基を Phe, Dmt, 1-Nal, 2-Nal 置換した誘導体を合成し、グラジエント HPLC による保持時間とイソクラティック HPLC による疎水性の指標 ϕ_0 により化合物の疎水性を評価した。 ϕ_0 は移動相中の有機溶媒のパーセンテージとイソクラティック保持ファクターの相関から得られる値で、医薬品の疎水性の評価に有効に用いられている。Tyr 残基を Phe, 1-Nal, 2-Nal に置換した化合物 Y0-109、-111、-113 は Y0-14, 13 よりはるかに高い ϕ_0 値を示し、疎水性が高い化合物が得られた。

表 1. Y0 化合物の疎水性 index と MS データ

Compound	Retention time ^{a)} (min)	Hydrophobicity ^{b)} ϕ_0	TOF-MS: m/z [M+H] ⁺	
			Found	Clacd
Y0-14	24.6	49.5	501.7	501.6
Y0-13	24.2		501.5	501.6
Y0-89	30.4	51.6	591.7	591.6
Y0-90	29.9	51.1	591.6	591.7
Y0-91	21.3	/	592.6	592.7
Y0-92	21.1	/	592.4	592.7
Y0-109	41.1	55.6	485.9	485.6
Y0-110	41.6	55.1	485.9	485.6
Y0-111	44.3	58.5	535.3	535.6
Y0-112	43.3	59.6	535.5	535.6
Y0-113	45.5	59.9	535.3	535.6
Y0-114	44.6	55.9	535.4	535.6
Y0-115	39.1	51.6	529.3	529.6
Y0-116	38.4	48.9	529.4	529.6
Y0-133	14.9	/	495.2	495.2
Y0-134	32.8	/	657.3	657.3
Y0-135	62.1	/	1108.6	1108.6

またグラジエント HPLC による保持時間と ϕ_0 値の間には良い相関がみられた(表 1)。これら化合物の SSTR1-5 に対する結合能は、SS-14 の 1,000 分の 1 程度と低かったが、Phe, Dmt の置換体は比較的強く結合した。DNA pol 活性について、すべての化合物は Y0-14、13 と同等以上の阻害活性を示した。なかでも 1-Nal, 2-Nal の置換体は 10 μ M および 100 μ M で Y0-14、13 より強力な阻害活性を示した。ヒト腫瘍細胞 (HCT116 cells) において、すべての化合物は 100 μ M で Y0-14、13 より強力な抑制効果を示した。すなわち、疎水性と DNA pol 阻害活性の間には良い相関が見られたが、ある程度の疎水性を示す化合物はヒト腫瘍細胞 (HCT116 cells) の増殖活性を抑制した

(2) D-Trp をさまざまな酸性および疎水性アミノ酸で置換した化合物を合成した。今回検討した化合物のうち、D-Trp を Ile や Phe で置換した化合物は DNA pol β のみを選択的に強く阻害した(表 2)。また、これらはヒト大腸ガン細胞 (HCT116 cells) に対しても有効な抗腫瘍活性を示した。さらに、Ile で置換した化合物はアルキル化剤である MMS (メチルメタンスルホン酸) との併用により、その効果を増強することが示され、優れた抗ガン剤として期待される。

表 2. Y0-96 の DNA pol 阻害活性

Mammalian pols	IC ₅₀ values (μ M)
<i>[A-Family]</i>	
Human pol γ	>200
<i>[B-Family]</i>	
Calf pol α	>200
Human pol δ	>200
Human pol ϵ	>200
<i>[X-Family]</i>	
Rat pol β	11.5 \pm 0.7
Human pol λ	>200
Human pol μ	>200
Calf TdT	>200
<i>[Y-Family]</i>	
Human pol η	>200
Mouse pol ι	>200
Human pol κ	>200

(3) Y0-80 を Colon26 cells に接触させ、共焦点レーザー顕微鏡で経時的に観察すると、細胞質への移行が観察された。Y0-80 の C 末端部のアダマンタンをナフタレンまたはシクロヘキサンの置換した化合物 Y0-89 および Y0-90 について同様に観察すると、Y0-89 は Y0-80 よりゆっくりと細胞質へ移行したが、Y0-90 の細胞内への移行は観察されなかった。アダマンタンが膜の透過性に優れており、そのことが Y0-14 の高い腫瘍細胞増殖抑制活性に寄与している可能性が示唆された (図 3)。

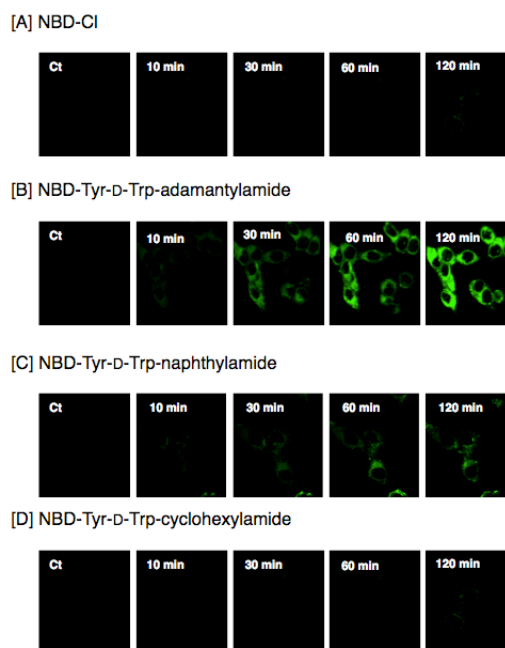


図 3. Colon26 ガン細胞における NBD 蛍光標識した Y0 化合物の膜透過性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Kuriyama I., Miyazaki A., Tsuda Y., Yokoi T., Okada Y., Takeuchi T., Sugawara F., Yoshida H., Mizushima Y. Inhibitory effect of somatostatin peptide analogues on DNA polymerase activity and human cancer cell proliferation. *Anticancer Res.* 査読有, 30, 2010, 4841-4850, <http://ar.iiarjournals.org/contact/by/year>
- ② Tsuda Y., Miyazaki A., Otkuno E., Kuriyama I., Mizushima Y., Yoshida H. A new class of somatostatin analogues with antiproliferative activity in human cancer cells. *Peptides 2010; Proceedings of the 31th European Peptide Symposium*, Edited by Lebl, M. et al., Prompt Scientific Publishing, San Diego, U.S.A. 査読無, 2010, pp468-469, <http://www.eurpepsoc.com/symposium.proceedings>
- ③ Kleczkowska P., Kosson P., Ballet S., Van den Eynde I., Tsuda Y., Tourwe D., Lipkowski A. PK20, a new opioid-neurotensin hybrid peptides that exhibits central and peripheral antinociceptive effects. *Molecular*

- Pain. 査読有, 6, 86, 2010, <http://www.molecularpain.com/content/6/1/86>
- ④ Teno N., Gohda K., Wanaka K., Sueda T., Tsuda Y. Identification of novel plasmin inhibitors possessing nitril moiety as warhead. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有, 21, 2011, 6305-6309, DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.08.121
- ⑤ Ishihara M., Nishida C., Tashiro Y., Critli I., Rosenkvist J., Koizumi M., Okaji Y., Yamamoto R., Yagita H., Okumura K., Nishikori M., Wanaka K., Tsuda Y., Okada Y., Nakauchi H., Heissig B., Hattori K. Plasmin inhibitor reduces T-cell lymphoid tumor growth by suppressing matrix metalloproteinase-9-dependent CD11b⁺/F4/80⁺ myeloid cell recruitment. *Leukemia*. 査読有, 26, 2012, 332-339, DOI:10.1038/leu.2011.203
- ⑥ Ambo A., Ohkatsu H., Minamizawa M., Watanabe H., Sugawara S., Nitta K., Tsuda Y., Okada Y., Sasaki Y. Relationship between structure and P-glycoprotein inhibitory activity of dimeric peptides related to the Dmt-Tic pharmacophore. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 査読有, 2012, 192-194, DOI:10.1016/j.bmcl.2012.01.107
- ⑦ Gohda K., Teno N., Wanaka K., Tsuda Y. Predicting subsite interactions of plasmin with substrates and inhibitors through computational docking analysis. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 査読有, 27, 2012, 571-577, DOI: 10.3109/14756366.2011.603129
- ⑧ Teno N., Otsubo T., Gohda K., Wanaka K., Sueda T., Ikeda K., Okunomiya-Hijikata A., Tsuda Y. Synthesis and evaluation of tripeptidic plasmin inhibitors with nitrile as warhead. *J. Peptide Sci.* 査読有, 18, 2012, 620-625, DOI: 10.1002/jsp.2442
- ⑨ Morishita M., Naemura A., Tamura Y., Yamaya H., Tsuda Y., Okada Y., Okada K., Matsuo O., Yamamoto J. Mechanism of the experimental antithrombotic effect of some apple varieties involves enhanced endogenous thrombolytic activity. *Interventional Med. & applied Sci.* 査読有, 4, 2012, 115-124, DOI: 10.1556/JMAS.4.2012.3.1
- ⑩ Okada Y., Tsuda Y., Salvadori S., Lazarus L. H. Developmental Potential for endomorphin opioidmimetic drugs. *Int. J. Med. Chem.* 査読有, 2012, 2012, Article ID 715123, 10 pages, DOI:10.1155/2012/715123
- ⑪ Imazumi H., Suyama T., Takami D., Hidaka K., Miyazaki A., Yokoi T., Kuriyama I., Yoshida H., Mizushima Y., Tsuda Y. Synthesis and anticancer activities of lipophilic somatostatin derivatives. *Peptide 2012; Proceedings of the 32nd European Peptide Symposium*, Edited by Kokotos G., *et al.* The European Peptide Society, Published by the University of Athens, Greece, 査読無, 2012, pp666-667, <http://www.eurpepsoc.com/symposium.proceedings>
- ⑫ Kuriyama I., Miyazaki A., Tsuda Y., Yoshida H., Mizushima Y. Inhibitory effect of novel somatostatin peptide analogues on human cancer cell growth based on the selective inhibition of DNA polymerase. *Bioorg. Med. Chem.* 査読有, 21, 2013, 408-411, DOI:10.1016/j.bmc.2012.11.024
- [学会発表] (計 13 件)
- ① Tsuda Y., Miyazaki A., Okuno E., Kuriyama I., Mizushima Y., Yoshida H. A new class of somatostatin analogues with antiproliferative activity. The 31th European Peptide Symposium, Copenhagen, 2010年9月.
- ② 堀麻衣, 宮崎杏奈, 坂遼, 津田裕子, 岡田芳男, 岸本修一, 福島昭二. ソマトスタチン関連抗腫瘍性ペプチドの膜透過性. 第60回日本薬学会近畿支部総会・大会, 摂南大学, 2010年11月.
- ③ 栗山磯子, 宮崎杏奈, 津田裕子, 吉田弘美, 坂口謙吾, 水品善之. ソマトスタチン由来ペプチドによるDNA合成酵素阻害活性とヒト由来癌細胞増殖抑制活性への影響. 第33回日本分子生物学会, 神戸, 2010年12月.
- ④ Miyazaki A., Hori M., Saka R., Kishimoto S., Fukushima S., Tsuda Y. The considerable effects on anti-tumor activity and cell permeability of small peptides containing adamantyl group. 5th International Peptide Symposium, Kyoto, 2010年12月.

- ⑤ 宮崎杏奈, 栗山磯子, 水品善之, 吉田弘美, 津田裕子. DNA ポリメラーゼ分子種選択的阻害剤の開発研究. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011 年 3 月.
- ⑥ 堀麻衣, 宮崎杏奈, 坂遼, 津田裕子, 岡田芳男, 岸本修一, 福島昭二. ソマトスタチン関連抗腫瘍性ペプチドの膜透過性. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011 年 3 月.
- ⑦ Ochi F., Kitaoka K., Miyazaki A., Yokoi T., Hidaka K., Kuriyama I., Yoshida H, Mizushina Y., Tsuda Y. Somatostatin derivatives that exhibit inhibitory effects on DNA polymerase and human cancer cell proliferation. 14th Peptide Forum, 鹿児島, 2011 年 12 月.
- ⑧ 越智文也, 北岡健二, 宮崎杏奈, 横井利夫, 日高興士, 栗山磯子, 吉田弘美, 水品善之, 津田裕子. 疎水性を指標としたソマトスタチン誘導体の合成と生物活性. 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 2012 年 3 月.
- ⑨ Inazumi H., Suyama T., Takami D., Hidaka K., Miyazaki A., Yokoi T., Kuriyama I., Yoshida H., Mizushina Y., Tsuda Y. Synthesis and anticancer activities of lipophilic somatostatin derivatives. The 32nd European Peptide Symposium, Athens, Greece, 2012 年 9 月.
- ⑩ 陶山泰治郎, 稲住瞳, 高見大介, 日高興士, 宮崎杏奈, 横井利夫, 栗山磯子, 吉田弘美, 水品善之, 津田裕子. 脂溶性に富むソマトスタチン誘導体の合成と抗腫瘍活性. 第 49 回ペプチド討論会, 鹿児島, 2012 年 11 月.
- ⑪ 宮崎杏奈, 伊藤梨紗, 榎本章, 津田裕子, 栗山磯子, 吉田弘美, 水品善之. ナフチル基を有するペプチドミメティックの DNA ポリメラーゼ・阻害活性. 第 49 回ペプチド討論会, 鹿児島, 2012 年 11 月.
- ⑫ 栗山磯子, 宮崎杏奈, 津田裕子, 吉田弘美, 水品善之. 新規ソマトスタチン由来ペプチドの DNA ポリメラーゼ・特異的阻害活性に基づくヒトがん細胞増殖抑制とアポトーシス誘導. 日本農芸化学会 2013 年度大会, 仙台, 2013 年 3 月.
- ⑬ 宮崎杏奈, 伊藤梨紗, 榎本章, 津田裕子, 栗山磯子, 吉田弘美, 水品善之. DNA ポリメラーゼ・選択的阻害活性を有する小分子ペプチドミメティックの構造活性相関研究. 日本薬学会 133 年会, 横浜, 2013 年 3 月.

[図書] (計 2 件)

- ① Tsuda Y., Okada Y. Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. Vol. 3 -Building Blocks,

Catalysis and Coupling Chemistry; Solution-Phase Peptide Synthesis, Edited by Andre B. Hughes, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2011, pp. 203-251.

- ② 岡田芳男, 津田裕子. オピオイド: アゴニスト, アンアゴニストの医薬品開発に向けた戦略, 遺伝子医学 MOOK 21 号, 2012, 3 月, pp292-297.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 新規ソマトスタチン由来ペプチド化合物並びに該化合物を含む DNA ポリメラーゼ阻害剤, 抗癌剤及びアポトーシス誘導剤
 発明者: 水品善之, 津田裕子, 宮崎杏奈, 栗山磯子, 吉田弘美
 権利者: 学校法人神戸学院
 種類: 特許
 番号: 特願 2012-244575
 出願年月日: 2012 年 11 月 6 日
 国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田裕子 (TSUDA YUKO)
 神戸学院大学・薬学部・教授
 研究者番号: 10098478

(2) 研究分担者

水品善之 (MIZUSHINA YOSHIYUKI)
 神戸学院大学・栄養学部・准教授
 研究者番号: 20307705

宮崎杏奈 (MIYAZAKI ANNA)
 神戸学院大学・薬学部・助教
 研究者番号: 00340919

横井利夫 (YOKOI TOSHIO)
 神戸学院大学・薬学部・教授
 研究者番号: 501222555

(3) 連携研究者 無