

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310163

研究課題名(和文) 腹腔内転移のバイオイメージングと抑制物質の分子デザイン

研究課題名(英文) Bio-imaging of peritoneal metastasis and molecular design of inhibitors

研究代表者

梅澤 一夫 (Umezawa, Kazuo)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70114402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は天然からの探索および分子デザインにより転移を抑制する低分子化合物を発見し、培養細胞における転移抑制効果および作用機構を解析する。さらにマウス腹腔内転移を発光癌細胞のイメージングで評価し、新しい方法で腹腔内転移を抑制することを目的とする。主な成果として1) 生体イメージング法により、NF-kappa B 阻害剤DHMEQはマウスにおける胃癌の播種・転移を抑制することを示した。2) 新規がん細胞遊走阻害剤migracinを放線菌から発見した。3) 2型糖尿病の経口医薬として広く使われるglybenclamideはヒト卵巣癌細胞の浸潤を抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Purpose of this project is to discover new metastasis inhibitors of low molecular weight from nature and by molecular design. Especially, peritoneal metastasis is very difficult to treat, and wetly to set up bio-imaging system of peritoneal metastasis to evaluate our metastasis inhibitors. Our main discoveries are the followings. 1) We previously discovered NF-kappa B inhibitor DHMEQ. DHMEQ was found to inhibit peritoneal metastasis of highly invasive human gastric cancer cells in mice, in which metastasis was analyzed by bio-imaging. 2) We discovered novel cancer cell migration inhibitor migracin from a microorganism. This inhibitor inhibited migration of human breast carcinoma, fibrosarcoma, and lung carcinoma cells without any cytotoxicity. 3) Glybenclamide is orally active, and widely used for the treatment of type-2 diabetes. In the course of our screening of cancer cell invasion inhibitors, we found that glybenclamide inhibited ovarian cancer cell invasion mediated by PDGF-AA.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：分子デザイン バイオイメージング 腹腔内転移 浸潤 遊走 NF-kappa B DHMEQ DTCM-glutarimide

1. 研究開始当初の背景

転移はがんの本質的な悪性形質であるが広く臨床で使われる転移抑制薬の発見には至っていない。そこで、副作用の少ない新しい機構で働く抗がん剤、転移抑制剤が強く求められている。研究代表者は、すでに多くの低分子シグナル伝達阻害剤を発見、発表している。研究室では常に、天然からのスクリーニングと分子デザイン、得られた阻害剤の作用機構解明、阻害剤を用いた病態解析を行っている。NF- κ B 阻害剤 DHMEQ を発見し、その標的タンパク質の同定し(J. Med. Chem. 51:5780-5788, 2008)、多くの抗炎症・抗がん活性を示した。光学活性の(-)-DHMEQ は主に培養細胞の実験に使われ、ラセミ体の DHMEQ は主に動物実験に使われる。さらに、NF- κ B を阻害する天然物 9-methylstreptimidone から多くの誘導体をデザイン・合成して、その中から合成の容易な DTCM-glutarimide (DTCM-G) を発見した (Bioorg. Med. Chem. Lett. 19: 1726-1727, 2009)。一方、近年、がん細胞を光るがん細胞にかえて、イメージングで観察する技術が発展した。がん細胞を発光酵素でラベルするバイオイメージングは *in vivo* でがんの進展と局在の情報が得られることから、腹腔内転移の研究に好適であり、分担研究者は測定系の構築ができています。そして治療の対象として、胃がん、卵巣がんなどにみられる腹腔内転移は最も制御が難しい状況なのである。

2. 研究の目的

本研究では、イメージング技術を用いて、がんの腹腔内転移抑制効果を解析することで薬剤有効性のスクリーニングを行う。腹

腔内転移は最も制御が難しい転移のひとつである。具体的には、すでに見出している NF- κ B 阻害剤 DHMEQ の腹腔内転移モデルの抑制効果を調べる。代表者は微生物、植物、およびケミカルライブラリーからの活性物質スクリーニングも行っており、これらのサンプルは単純化した *in vitro* 浸潤アッセイから入って、新規転移抑制物質を見出す。このように、分子デザインおよび天然からのスクリーニングで転移を抑制する新しいリードを見出し、バイオイメージングと組み合わせることで、腹腔内がん転移を抑制する活性物質の発見を可能にする。本プロジェクトの特徴は、新しい転移抑制物質が得られ、開発にもつなげられる点である。予想される結果と意義として、新しい転移抑制剤が得られることで、転移抑制による副作用の少ない抗がん剤は強く求められているので、致死性の高い多くのスキルス胃がんや卵巣がんなど腹腔内転移を伴う難治性がん患者に還元できる。

3. 研究の方法

(1) 転移阻害物質のスクリーニング：NF- κ B 阻害剤 DHMEQ に浸潤・転移阻害活性があるため、NF- κ B 阻害剤の微生物、植物からのスクリーニングを続ける。さらに、遊走阻害物質の探索系を構築し、がん細胞の遊走阻害物質を微生物、植物からスクリーニングする。

(2) がん細胞の遊走とマトリゲル浸潤アッセイ：悪性度の高いがん細胞を用い、比較的簡単な *in vitro* 転移評価系である遊走能を wound healing assay で評価する。次に細胞浸潤能は Matrigel invasion assay を用いて

評価する。

(3) 発光細胞の作成：発光がん細胞の作製として、胃がん細胞、膵がん細胞、卵巣がん細胞に分泌型ルシフェラーゼ（ウミホタルルシフェラーゼ）遺伝子を導入する。このプローブをがん細胞に導入し、プローブの細胞レベルでの有効性を *in vitro* にて確認する。*in vivo* 使用に必要な反応（十分なシグナル強度）が得られるよう、この時点でプローブの修飾をする。十分機能的なプローブと確認された後に、細胞に安定導入する。

4. 研究成果

(1) 2型糖尿病薬 glybenclamide による卵巣がん細胞の浸潤抑制と作用機構：がん細胞の遊走害物質を微生物からスクリーニングしたところ、既知物質の paxilline が得られた。paxilline は Ca^+ 依存型 K^+ チャネルを阻害することに注目して、より毒性の少ない ATP 依存型 K^+ チャネルブロッカー glybenclamide に注目した。glybenclamide はヒト卵巣がん細胞 ES-2 細胞において遊走および浸潤を抑制した。ES-2 細胞において ATP 依存型 K^+ チャネル pore 部分のサブユニットの Kir6.2 および sulfonylurea 受容体 SUR2B の発現が確認された。作用機構として、PDGF-AA の分泌低下関与していることがわかった。経口投与可能で毒性の非常に少ない ATP 依存型 K^+ チャネルを阻害する glybenclamide が顕著な浸潤抑制効果を示したので、転移抑制剤として利用できる可能性が示唆された。（雑誌論文 5）

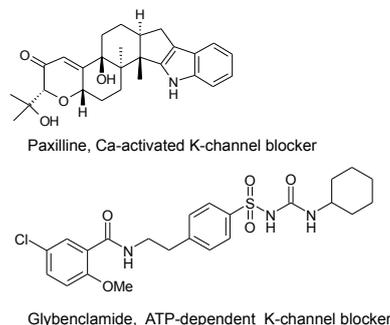
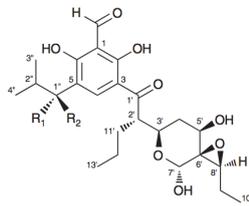


図 1 卵巣がん細胞の浸潤を阻害する paxilline と glybenclamide。

(2) 放線菌由来新規がん細胞遊走阻害物質 migracin の単離と卵巣がん細胞浸潤の抑制：

がん細胞の遊走・浸潤を抑制する低分子化合物は新しい転移抑制剤として有用と考えられる。そこで、私たちは wound healing assay を用いて乳がん MDA-MB-231 細胞の遊走を測定し、探索系を構築した。そして阻害物質を微生物株培養液から探索した。その結果、放線菌由来の 2 つの新規化合物を発見し、migracin A および B と命名した。migracin A および B は MDA-MB-231 細胞のほか、肺腺がん A549 細胞、線維肉腫 HT1080 細胞においても遊走を阻害した。migracin A と B は同等の阻害活性を示した。（雑誌論文 2）次に卵巣がん細胞 ES-2 における migracin A の遊走や浸潤の抑制を調べた。migracin A は 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで細胞毒性を示さず、それよりずっと低い濃度で ES-2 細胞の遊走と浸潤を抑制した。以上の結果から migracin は転移を抑制する新しい医薬の候補として可能性がある。



Migracin A: R₁ = H, R₂ = OEt
 Migracin B: R₁ = OEt, R₂ = H

図 2 新規がん細胞遊走阻害剤 migracin A & B。

(3) 新規 epoxide-free (-)-DHMEQ 誘導体の分子デザイン・合成と生物活性：

私たちは特異性が高い NF-κB 阻害剤として epoxyquinomicin の構造をもとに(-)-DHMEQ をデザイン・合成した。(-)-DHMEQ は NF-κB 構成因子の p65 や RelB の特異的 cysteine に共有結合して DNA 結合能を消失させる。一方、(-)-DHMEQ は構造に cysteine 結合部位である epoxide を有している。epoxide は反応性が高く、安定性を低下させると考えられるので epoxide のない(-)-DHMEQ 誘導体の Exo-ene EQ を分子デザインして合成した。マクロファージ様マウス RAW264.7 細胞において Exo-ene EQ は(-)-DHMEQ と同等の濃度で LPS に誘導される炎症因子の発現と分泌を抑制した。がん細胞の Matrigel 浸潤も抑制することがわかった。Exo-ene EQ は (-)-DHMEQ より合成が容易であり、がん細胞の浸潤も抑制し、新しいがん分子標的医薬の候補として可能性がある。

(4) NF-κB 阻害剤(-)-DHMEQ の新しい阻害機構の解明：

近年、noncanonical 経路がリンパ腫や固形が

んに 関与すると報告されたので、(-)-DHMEQ による noncanonical NF-κB 抑制の詳細な機構の解析を行った。必要な DNA を導入した HeLa 細胞を用いた研究の結果から、(-)-DHMEQ は RelB と p52 を不安定化すること、(-)-DHMEQ が結合した RelB は核移行に重要な importin との親和性が低下することがわかった (雑誌論文 4)。これらの結果から、(-)-DHMEQ は noncanonical NF-κB が活性化している疾患に対する有用と考えられる。

(5) (-)-DHMEQ によるがん細胞の接着の抑制と galectin-3-binding protein の役割の解明：

galectin-3-binding protein (G3BP)は多くのがん細胞に発現がみられ、悪性化に関与すると考えられているが、役割はわかっていない。(-)-DHMEQ を用いた実験結果から NF-κB に発現が促進される G3BP はフィブロネクチンとの結合を増加させ、浸潤・転移を促進させることが示唆された。(雑誌論文 6)

(6) DHMEQ による発光がん細胞の in vivo 腹腔内転移モデルの抑制

膵がん AsPC-1 細胞に luciferase を導入した AsPC-1-Gluc 細胞を調製して、腹腔内転移モデルを作成した。DHMEQ は恒常的に活性化された NF-κB を阻害し、アポトーシス阻害因子 IAP-1 の発現を減少させた。さらに足場依存性のアポトーシスであるアノイキスを誘導した。アノイキス耐性は転移能の獲得につながる。さらに発光 AsPC-1 細胞を腹腔内に撒き、DHMEQ を腹腔内投与したところ、がん細胞の顕著な減少と転移モデ

ルの抑制がみられた。(雑誌論文 1、図 3)

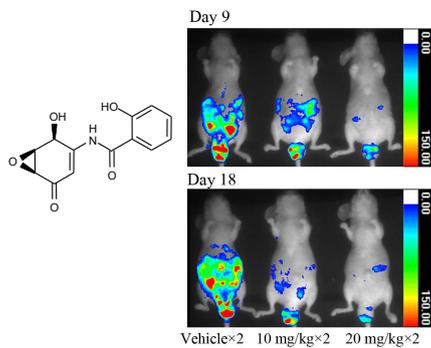
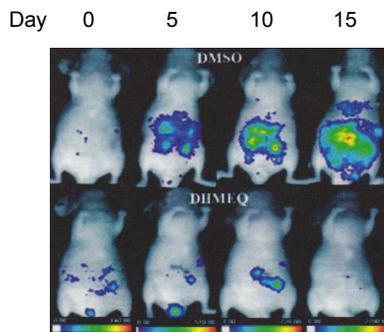


図 3 発光膵がん AsPC-1 細胞の腹腔内転移モデルと DHMEQ 腹腔内投与による抑制。(雑誌論文 1)

バイオイメージングにより、胃がん細胞の腹腔内転移が、がん細胞を DHMEQ 処理することで顕著に抑制されることがわかった。胃がん細胞 NUGC4 に luciferase を導入し、発光細胞 44As3Luc を調製した。NUGC4 および 44As3Luc 細胞は比較的高い NF- κ B 活性を恒常的に有しており、いずれも DHMEQ に阻害された。DHMEQ 処理すると、腹腔基底膜の構成成分 ECM でコートしたプレートへの接着能が減少した。さらに DHMEQ 処理した細胞は vehicle 処理細胞よりも顕著に腹腔内への局在、接着が減少した(雑誌論文 8、図 4)。DHMEQ 処理細胞



群にはマウスの延命効果もみられた。
図 4 発光胃がん NUGC4 細胞の DHMEQ 前

処理による腹腔内転移抑制。(雑誌論文 8)

(7) DTCM-G によるがん細胞浸潤の抑制と機構解析:

DTCM-G は転移能が高いマウス悪性黒色腫細胞 B16-F10 の Matrigel 浸潤を強く抑制した。作用機構を調べたところ、MMP-1, MMP-2, MMP-9 の発現を阻害していることがわかった。さらに DTCM-G は p53 および Bax の発現を増強させ、逆に MDM2 および Bcl-xL の発現を減少させ、アポトーシスよりアノキシスが強く誘導されていることがわかった。DTCM-G の作用機構として、直接的な NF- κ B 阻害剤ではないこと、長時間処理では NF- κ B を阻害することを見出した。Akt-IKK の阻害を介しての NF- κ B 阻害が示唆された。(雑誌論文 3,7)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (関連の論文は計 38 件 8 件を表示) 3 以外すべて査読あり。

1. M. Sato, K. Nakanishi, S. Haga, M. Fujiyoshi, M. Baba, K. Mino, Yimin, H. Niwa, H. Yokoo, K. Umezawa, Y. Ohmiya, T. Kamiyama, S. Todo, A. Taketomi and M. Ozaki: Anoikis induction and inhibition of peritoneal metastasis of pancreatic cancer cells by a nuclear factor-kappa B inhibitor, (-)-DHMEQ. *Oncology Res.* in press.
2. Y. Arai, H. Iinuma, Y. Ikeda, M. Igarashi, K. Hatano, N. Kinoshita, T. Ukaji, S. Simizu and K. Umezawa: Migracins A and B, new inhibitors of cancer cell migration, produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* 66: 225–230, 2013.
3. T. Ukaji, S. Gantsev and K. Umezawa:

Inhibition of Cancer cell invasion and metastasis by NF-kappa B inhibitors. (Review) Creative Surgery and Oncology 2013 (3): 6-12, 2013.

4. M. Takeiri, K. Horie, D. Takahashi, M. Watanabe, R. Horie, S. Simizu and K. Umezawa: Involvement of DNA binding domain in the cellular stability and importin affinity of NF- κ B component RelB. Org. Biomol. Chem. 10: 3053-3059, 2012.

5. T. Yasukagawa, Y. Niwa, S. Simizu and K. Umezawa: Suppression of cellular invasion by glybenclamide through inhibited secretion of platelet-derived growth factor in ovarian clear cell carcinoma ES-2 cells. FEBS Lett. 586:1504-1509, 2012.

6. N. Noma, S. Simizu, Y. Kambayashi, Y. Kabe, M. Suematsu, and K. Umezawa: Involvement of NF- κ B-mediated expression of galectin-3-binding protein in tumor necrosis factor- α -induced breast cancer cell adhesion. Oncology Reports 27: 2080-2084, 2012.

7. A. Kaneda, S. K. Gantsev and K. Umezawa: Inhibition of cellular invasion and induction of anoikis in mouse melanoma cells by an anti-inflammatory agent DTCM-glutarimide. Creative Surgery and Oncology 2012: 4-9, 2012.

8. K. Mino, M. Ozaki, K. Nakanishi, S. Haga, M. Sato, M. Kina, M. Takahashi, N. Takahashi, A. Kataoka, K. Yanagihara, T. Ochiya, T. Kamiyama, K. Umezawa and S. Todo: Inhibition of nuclear factor-kappaB suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer by blocking cancer cell adhesion. Cancer Science 102: 1052-1058, 2011.

[学会発表] (関連の学会発表は計 25 件 表示は省略)

[その他]

ホームページ等

<http://www.umelab.net> 梅澤研究室の紹介

<http://www.aichi-med-u.ac.jp> 愛知医科大学

HP より分子標的医薬探索寄附講座へ

6. 研究組織

(1) 代表研究者

梅澤 一夫 (UMEZAWA Kazuo)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70114402

(2) 研究分担者

清水 史郎 (SIMIZU Siro)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号: 30312268

石川 裕一 (ISHIKAWA Yuichi)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号: 40348826

(平成23年度のみ分担研究者)

尾崎 倫孝 (OZAKI Michitaka)

北海道大学・保険科学院・教授

研究者番号: 80256510

(平成23、24年度のみ分担研究者)

斉藤 毅 (SAITO Tsuyoshi)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号: 80609933

(平成24年度のみ分担研究者)

芳賀 早苗 (HAGA Sanae)

北海道大学・保険科学院・研究員

研究者番号: 60706505

(平成25年度のみ分担研究者)