

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23510284

研究課題名(和文) 臨床検体に基づく実践的生体分子を標的とする天然由来分子標的抗がん剤の探索

研究課題名(英文) Search of naturally-occurring anti-cancer agent targeted to a practical biological molecules derived from clinical cancer cells.

研究代表者

青木 俊二 (AOKI, SHUNJI)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：60252699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：Prostate cancer antigen-1 (PCA-1)は、特に高い死亡率を示すホルモン療法抵抗性前立腺癌や膵臓癌の臨床検体で高発現するタンパクで、DNA、RNAの脱メチル化酵素活性を有することが明らかになっている。また、PCA-1の脱メチル化酵素活性を阻害することでこれら悪性度の高いがんの増殖を抑制できることも明らかになっている。本研究では、PCA-1の阻害剤を天然から探索し、ホルモン抵抗性難治性前立腺癌や膵臓癌に対する副作用の少ない分子標的抗がん剤としての展開を目指した。その結果、生薬の抽出エキスライブラリーから数種のエキスに活性を見だし、試験の結果を指標に分画精製を行った。

研究成果の概要(英文)：A DNA and/or RNA-alkylating damage-repair enzyme called prostate cancer antigen (PCA)-1 is highly expressed in clinical androgen-independent prostate cancer cells and pancreatic cancer cells. Genetic inhibition of the enzymatic activity by injecting siRNA effectively inhibited the growth of prostate and pancreatic cancer cells. Therefore, PCA-1 inhibitor would be a novel and clinically effective anti-cancer drug against prostate cancer, even for hormone independent varieties and pancreatic cancer.

On the other hand, on the guidance of inhibition against PCA-1 enzymatic activity, we tried to search for anti-cancer substances from extracts of medicinal plants. We found several active extract and isolate the active components by the assay-guided separation.

研究分野：天然薬物学

キーワード：PCA-1 DNA, RNA脱メチル化酵素 前立腺がん 膵臓がん 分子標的抗がん剤 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

連携研究者の辻川らは、真に臨床適用可能な前立腺癌治療薬の創薬を展開するために、培養細胞を用いるのではなく臨床で得られる前立腺癌術後病理組織を用いて標的分子の同定を行った。その結果、非癌部に比べ癌部において顕著な発現上昇を示す新規タンパク質 PCA-1 を発見した。抗 PCA-1 抗体を用いて種々の癌病理組織標本における免疫組織化学的解析を行った結果、PCA-1 は前立腺癌で極めて高頻度で高発現するが、非癌部や良性腫瘍である前立腺肥大においては発現上昇がまったく検出されないことを明らかにした (Clin. Cancer Res., 11, 5090-5097, 2008)。さらに、前立腺癌の前癌病変である前立腺上皮内腫瘍においても PCA-1 の高発現が認められ、PCA-1 の高発現が癌化に関連することを推測させた。さらに前立腺癌病理組織の詳細な免疫組織化学解析により、PCA-1 を特に高発現している癌患者は、それに比べ発現が弱いと診断された患者に比べ、非常に早期にホルモン療法抵抗性前立腺癌を再燃することが明らかになった。この結果は、PCA-1 の発現レベルとホルモン療法抵抗性前立腺癌の出現とが相関することを示す非常に重要な知見である (Cancer Sci., 99, 39-45, 2008)。そこで PCA-1 が前立腺癌の治療標的分子となるか検討を進めた。前立腺癌細胞の PCA-1 を、siRNA を用いてノックダウンし、その細胞増殖を検討した結果、Ras-MAP キナーゼ経路の活性化抑制による細胞増殖抑制とアポトーシス誘導が認められた。さらに PCA-1 mRNA をノックダウンさせたヒトホルモン抵抗性前立腺癌細胞をヌードマウスに移植する xenograft 解析を行い、その腫瘍形成能を評価した。その結果、PCA-1 ノックダウン前立腺癌細胞は腫瘍形成が顕著に抑制さ

れることが明らかになった (図 1)。また、PCA-1 は DNA 脱メチル化酵素活性を有することが明らかになっているが (Nature 421 859-863 2003, Mol. Cell 16, 107-116, 2004)、この酵素活性が腫瘍増悪化に必須であることも判明した。

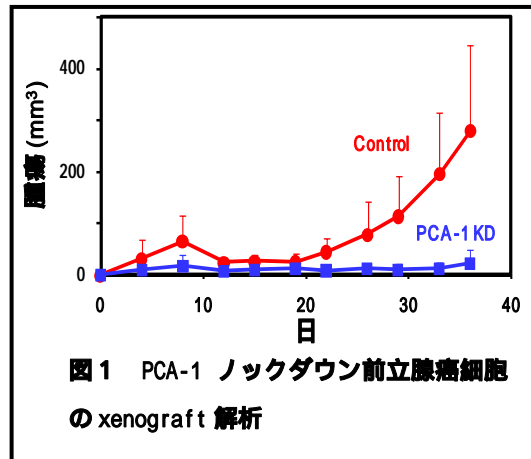


図 1 PCA-1 ノックダウン前立腺癌細胞の xenograft 解析

2. 研究の目的

本研究では、副作用の少ない難治性前立腺癌および膵臓癌に対する分子標的抗がん剤リード化合物を探索する目的で、

(1) ホルモン抵抗性前立腺癌および膵臓癌に高発現する DNA 脱メチル化酵素 PCA-1 の酵素活性阻害物質を、3-メチルシトシン含有オリゴ DNA と real-time PCR を用いる PCA-1 酵素反応阻害活性評価系により天然由来の低分子化合物から探索する。

(2) 発見した活性物質は、その抗腫瘍作用を、培養細胞を用いる足場依存および足場非依存 in vitro 増殖阻害活性や in vivo xenograft モデルで抗腫瘍効果を詳細に評価する。

(3) 天然から得られる活性物質の大量供給法を確立するとともに、類縁化合物やモデル化合物合成により構造活性相関を解析する。さらに、これらの知見をもとにより簡便に合

成できる活性類縁体の設計・合成など合成化学的な検討を加え、新たな分子標的抗がん剤としての展開をはかる。また、発見した活性物質を細胞に作用させた時に起こる変化についても解析し、PCA-1 に関わるシグナル伝達系の解明にも寄与する。

3. 研究の方法

(1) PCA-1 酵素活性阻害物質の探索

3-メチルシトシン含有オリゴ DNA (5'-GGAAACAGCTATGACCATGATTACTAGACATTGCCA - TTC TCGATAGGATCCGGTCAAACCTAGACGAATTCCGGT-3-methylC-GTGACTGGGAAAACCTGGCG -3') を基質として含む PCA-1 酵素反応溶液に蚕リコンビナント FLAG-PCA-1 を添加し、脱メチル化酵素反応を行う。反応終了後、酵素反応溶液を用いて real-time PCR を行い、非メチル化オリゴ DNA の希釈系列を用いて作成した検量線から酵素活性阻害率を計算する(図2)。上記アッセイ系を導入・確率し、これまでに収集している海綿を中心とする海洋生物の抽出エキスをライブラリーや生薬の抽出エキスをライブラリーから活性を示すエキスを探索する。活性が確認されたエキスについては活性試験の結果を指標に分画精製して活性物質を単離する。単離した活性物質については、NMRをはじめとする機器分析を中心に解析し化学構造を決定する。

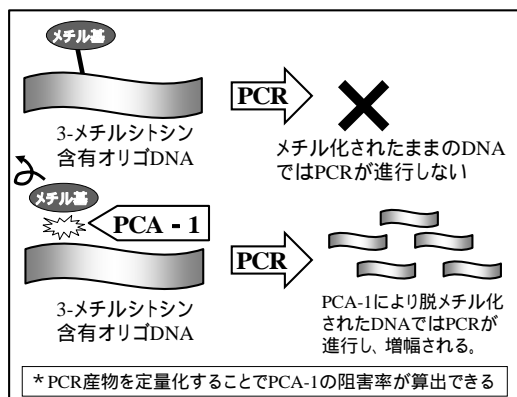


図2. PCA-1阻害剤探索のためのアッセイ系概略

(2) 類縁体の探索および誘導体の合成
得られた活性物質についてはさらに類縁体の探索や化学変換による誘導体を作成し、その活性を比較することで構造活性相関についての知見を得る。また、PCA-1 の X 線結晶構造解析が報告され、PCA-1 は 2-oxoglutarate と 2 価鉄依存的に酸化的脱メチル化によりメチル化 DNA を脱メチル化することが構造解析からも明らかとなった (EMBO Journal, 25, 3389-3397, 2006)。この 3 次元構造を参考に活性ドメインへの親和性がより高い酵素活性阻害物質の設計も考察する。

(3) 足場依存および非依存条件における in vitro 増殖抑制活性の評価

ホルモン非依存性前立腺癌細胞株 (DU145、PC3) と膵臓癌細胞 (PANAC、PK1、MIAPaCa-2) を用いて、足場依存的増殖条件下における化合物の増殖阻害活性を WST-1 アッセイにより評価する。

がん細胞の悪性度の指標として足場非依存性増殖が可能ながあげられる。そこで、足場非依存性増殖に対する作用解析に連携研究者が DU145 細胞から樹立することに成功した亜株 (DU145-8-10) を使用する。この細胞は、polyHEMA 試薬により表面加工された培養皿に播くと、親株に比べ非常に高率かつ早期にスフェロイドを形成し増殖する。また、ヌードマウスへの移植でも腫瘍形成率が非常に高く、CD44 の発現も高いことから癌幹細胞のヒエラルキーの上位の細胞と考えられる。そこでこの細胞を足場非依存性増殖評価細胞として用い、化合物の増殖阻害活性を WST-1 アッセイにより評価する。

(4) Xenograft モデルを用いた in vivo 増殖抑制活性の評価

大量供給法を確立できた活性物質について、前立腺癌細胞 (DU145、PC3) や膵臓癌細胞

(PANAC、PK1、MIAPaCa-2) をヌードマウスの脇腹皮下に移植し作成した Xenograft モデルを用いて *in vivo* 増殖抑制活性を評価する。

4. 研究成果

PCA-1 の脱メチル化活性を阻害する化合物のスクリーニングを行った結果、アスナロ、ゴシュユ、オトギリソウ、チョウジ、コウボク、タケニグサといった生薬の抽出エキスに活性を見いだした。活性の見られたエキスは試験の結果を指標に各種クロマトグラフィーにより分画を行い、最終的には HPLC を用いて精製することで活性物質を単離した。単離した活性物質は、NMR をはじめとする各種スペクトルを解析することで同定した。アスナロから活性物質としてフラボノイド二量体・putraflavone を単離した。Putraflavone は、比較的強い PCA-1 阻害活性 ($IC_{50} = 0.9 \mu M$) を示し、また前立腺がん細胞 DU-145 に対しても増殖抑制活性 ($IC_{50} = 6.0 \mu M$) を示した。ゴシュユからは、活性物質としてインドール型アルカロイド・evocarpine を単離したが、弱い PCA-1 阻害活性しか認められなかった ($IC_{50} > 10 \mu M$)。オトギリソウとチョウジからは、フラボノイドの quercetin と isorhamnetin をそれぞれ単離したが弱い PCA-1 阻害活性しか認められなかった ($IC_{50} > 10 \mu M$)。コウボクからは、アポルフィン型アルカロイド lirioidenine を単離した。lirioidenine は、比較的強い PCA-1 阻害活性 ($IC_{50} = 1.1 \mu g/ml$) を示し、また前立腺がん細胞 DU-145 に対しても増殖抑制活性 ($IC_{50} = 5.0 \mu g/ml$) を示した。また、タケニグサからはイソキノリン型アルカロイド 8-methoxydihydrosanguinarine および 8-Hydroxydihydrochelerythrine を単離した。8-methoxydihydrosanguinarine は、比較的強い PCA-1 阻害活性 ($IC_{50} = 1.1 \mu g/ml$) を示

し、また前立腺がん細胞 DU-145 に対しても強い増殖抑制活性 ($IC_{50} = 0.1 \mu g/ml$) を示した。一方、構造類縁体である 8-Hydroxydihydrochelerythrine は、弱い PCA-1 阻害活性 ($IC_{50} = 10 \mu g/ml$) しか示さず、前立腺がん細胞 DU-145 に対する増殖抑制活性も弱かった ($IC_{50} = 7.0 \mu g/ml$)。

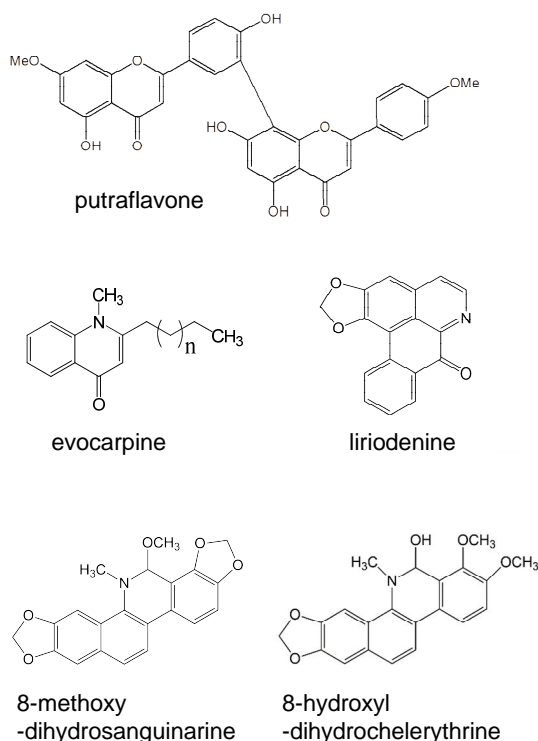


図3 活性化合物の化学構造

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- (1) E. Iwaoka, S. Wang, N. Matsuyoshi, Y. Kogure, S. Aoki, S. Yamamoto, K. Noguchi, Y. Dai. Evodiamine suppresses capsaicin-induced thermal hyperalgesia through activation and subsequent desensitization of the transient receptor potential V1 channels. *J Nat Med*, **70**, 1-7 (2016), 査読有, DOI: 10.1007/s11418-015-0929-1.
- (2) S. Nakao, M. Mabuchi, T. Shimizu, Y. Itoh, Y. Takeuchi, M. Ueda, H. Mizuno, N. Shigi, I.

Ohshio, K. Jinguji, Y. Ueda, M. Yamamoto, T. Furukawa, S. Aoki, K. Tsujikawa, A. Tanaka. Design and synthesis of prostate cancer antigen-1 (PCA-1/ALKBH3) inhibitors as anti-prostate cancer drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 1071-1074 (2014), 査読有, DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.01.008.

〔学会発表〕(計5件)

梁川稔規、岩岡恵実子、田中明人、辻川和丈、青木俊二
タケニグサ (*Macleaya cordata*) 由来の Prostate cancer antigen-1 (PCA-1) 酵素阻害物質の探索、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

田鍋絵里、藤垣俊介、岩岡恵実子、田中明人、辻川和丈、青木俊二
コウボク由来の Prostate Cancer Antigen-1 (PCA-1) 酵素阻害物質の探索、日本薬学会第 135 年、2015 年 3 月 28 日、神戸サンポートホール (兵庫県神戸市)

吉川茂男、岩岡恵実子、田中明人、辻川和丈、青木俊二
タケニグサ (*Macleaya cordata*) 由来の Prostate cancer antigen-1 (PCA-1) 酵素阻害物質の探索、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本大学 (熊本県熊本市)

長谷川英利、岩岡恵実子、田中明人、青木俊二、辻川和丈
天然物由来の Prostate cancer antigen-1 (PCA-1) 酵素阻害物質の探索、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、北海道大学 (北海道札幌市)

川眞田将貴、穂満菜里、田中明人、岩岡恵実子、辻川和丈、青木俊二
アスナロ (*Thujopsis dolabrata*) 由来の Prostate cancer antigen-1 (PCA-1) 酵素阻害物質、日本薬学会第 132 年、2012 年 3 月 30 日、北海道大学 (北海道札幌市)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 2 件)

名称：新規ベンズイミダゾール誘導体及びその用途
発明者：辻川和丈、田中明人、青木俊二、水

野裕章、所美雪、古川龍彦
権利者：学校法人兵庫医科大学、国立大学法人鹿児島大学、国立大学法人大阪大学
種類：特許権
番号：特許第 5854390 号
出願年月日：2012 年 3 月 10 日
取得年月日：2015 年 12 月 18 日
国内外の別：国内

名称：新規ベンズイミダゾール誘導体及びその用途
発明者：辻川和丈、田中明人、青木俊二、水野裕章、所美雪、古川龍彦
権利者：学校法人兵庫医科大学、国立大学法人鹿児島大学、国立大学法人大阪大学
種類：特許権
番号：US9,212,169B2
出願年月日：2013 年 3 月 1 日
取得年月日：2015 年 12 月 15 日
国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 俊二 (AOKI SHUNJI)
兵庫医療大学・薬学部・教授
研究者番号：60252699

(2) 連携研究者

辻川 和丈 (TSUJIKAWA KAZUTAKE)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：10207376