

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592962

研究課題名(和文) 海洋生物由来生理活性物質の探索と口腔癌幹細胞をターゲットとした分子標的薬への応用

研究課題名(英文) Purification, structure characterization of bioactive substances from marine organisms and application them to the novel targeting oral cancer drugs

研究代表者

吉岡 幸男 (Yukio, YOSHIOKA)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：20335665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：日本近海に生息する海洋生物から抽出された化学物質を精製する。精製された化学物質に対しBio assayを行い、活性のある画分の精製を進める。分離された溶解物を構造解析装置にて構造決定し、既知の物質か新規の物質か確認し、新規の物質であれば機能解析や動物実験に必要な量を大量合成するとともに新規の誘導体を化学合成する。口腔扁平上皮癌の幹細胞の表面マーカーとしてCD133は有用である。口腔扁平上皮癌細胞よりCD133陽性細胞を分離し、その幹細胞としての特徴を解析するとともに、新規生理活性物質のCD133陽性細胞の抗腫瘍効果を予定する。

研究成果の概要(英文)：Marine organisms from Japanese adjacent Sea is collected and freeze-dried. They are homogenized in EtOH-MeOH(4:1) and distributed by HPLC into hexane layer and C₂H₅OCH₃CO layer and aqueous layer. Following it, the extracted compounds are investigated their activity by bio-assay and are purified and decided their structure by LC/MS. Their analogues improving the structure of their branches are produced and massively synthesized them. The anti-tumor activity is investigated by the inoculated tumor cell on nude mouse. CD133 is a useful marker of the oral squamous cell carcinoma cells. The oral cancer stem cells were isolated from the oral squamous cell carcinoma cell line with index of CD133 and analyzed the character of a stem cell. The mechanism of the novel anti-tumor agents against not only the oral cancer but also the oral cancer stem cells is analyzed in vitro.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：海洋生物 生理活性物質 抗腫瘍効果 口腔がん 癌幹細胞 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

地球上の大半を占める海洋をすみかとする海洋生物は地上の生物と異なった代謝システムや生理機能を有する。海洋生物由来生理活性物質のがん細胞に対する増殖抑制効果を指標に活性の高い物質を精製し口腔がんに対する新規抗がん剤への応用を目指す (名古屋大学 小鹿研究室との共同研究)

2. 研究の目的

海洋生物より抽出された生理活性物質を口腔扁平上皮癌細胞に対する細胞毒性を指標に精製、抽出する。活性の高い生理活性物質は構造解析による同定を行い、新規物質であればその抗腫瘍効果を検討する。

口腔がん幹細胞の表面マーカーである CD133(prominin1)の発現を指標に口腔扁平上皮癌細胞より幹細胞を selection し、新規物質の効果を検討する。

3. 研究の方法

日本近海に生息する海洋生物を収集し凍結乾燥後、HPLCにてエタノール/メタノール(4:1)抽出をおこない、ヘキサン画分、酢酸エチル画分、水画分に分配する。得られた画分から抽出された化学物質に対し Bio Assay を行い、がん細胞に対する細胞毒性を指標に活性の高い物質の構造を LC/MS を用いて構造を決定するとともに側鎖を改良した誘導体を合成する。ヌードマウス移植腫瘍に対する抗腫瘍効果を検討する。

癌細胞や癌幹細胞に対する新規生理活性物質の抗腫瘍効果のメカニズムを解析する。

当教室で樹立した口腔扁平上皮癌細胞より磁気カラムを用いて CD133 陽性細胞を分離し、sphere 形成能を解析する。また EGF や SHH (ソニックヘッジホッグ) の CD133 陽性細胞の sphere 形成能に及ぼす検討を行う。また低酸素下での CD133 陽性細胞の sphere 形成に及ぼす影響を検討する。以上の検討から口腔扁平上皮癌細胞より CD133 陽性細胞を分離し、口腔癌幹細胞の特徴としての解析を進め、新規生理活性物質の口腔癌幹細胞に及ぼす効果を検討する。

4. 研究成果

①海洋生物抽出物 320 検体 (OPB080201-1 ~ 320) の細胞毒性試験を行い、活性が顕著で、且つ量的確保が可能なサンプル3つについて、活性物質の探索を行い、以下の結果を得た。活性本体はいずれも既知物質であった。(1) OPB080201-35 (沖縄産ソフトコーラル酢酸エチル画分)

シリカゲル画分 AK-I-155-3 から3種のプロスタノイドを得たが既知物質であった。155-2, 155-4 にも複数の類縁プロスタノイドが含まれているようだが、過去にソフトコ

ーラルから多数の細胞毒性プロスタノイドが発見されていることから、これらの類縁体も既知物質であると思われる。

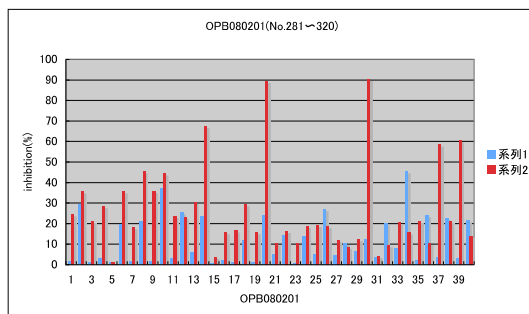
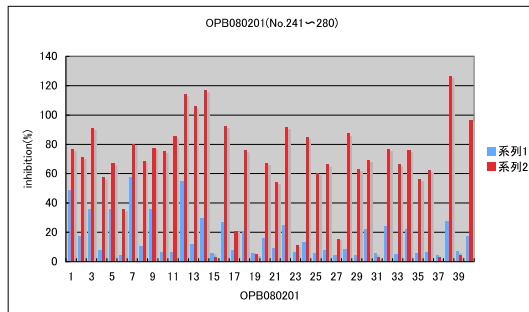
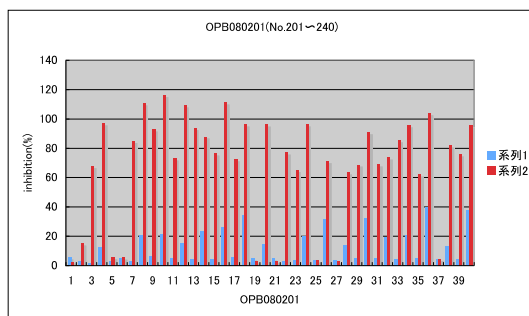
(2) OPB080201-93 (沖縄産海綿 *Cliona solida* 酢酸エチル画分)

強い活性画分 GS-I-10-3 は、海綿由来既知物質 aragusterol C であり、1桁弱い活性画分は既知物質 aragusterol B と C を含む混合物であった。

(3) OPB080201-23 (沖縄産海綿 *Petrosia* sp. 酢酸エチル画分)

活性画分 AK-I-192-3, 192-4 を、上記の No.93 から得られた aragusterol 類と TLC で比較することにより、これらは aragusterol 類と考えられた。

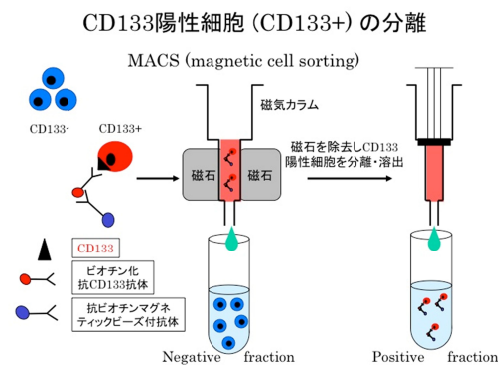
現在も活性のある物質は構造解析を行っている途中である。



②口腔扁平上皮癌細胞から CD133 を指標に口腔癌幹細胞を分離する。

各細胞株からの CD133 陽性細胞の分離は Indirect CD133 MicroBead Kit (Miltenyi) を用いた。増殖飽和状態の各細胞を Trypsin/EDTA で分散後、単一細胞とし、running buffer に浮遊させた。細胞浮遊液に 10 倍希釈になるようにビオチン化マウス抗ヒト CD133 抗体を加え、氷上で 10 分間反応させた。遠心後細胞を回収し running buffer

に浮遊させ、5倍希釈になるようにマグネティックビーズ付き抗ヒトCD133抗体を加え、氷上で15分反応後させた。遠心後細胞を回収し、running bufferに浮遊させ、AUTO MACS (Miltenyi)にて細胞を分離した。すなわち、磁気カラムを用いて、まずCD133陽性細胞をカラムに吸着させ、磁気カラムに吸着しない溶出画分をCD133陰性細胞とし、カラムから磁石を取り除いた後に溶出した画分をCD133陽性細胞とした。

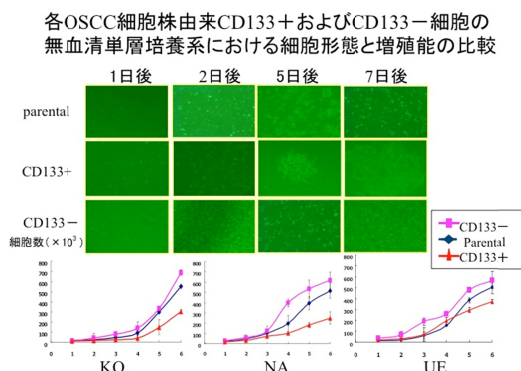


各口腔扁平上皮癌細胞における分離直後のCD133陽性細胞の比率は0.5%であった。

分離直後のCD133+細胞の全細胞中の比率

	全細胞数	陽性細胞数	%
KO	1.088×10^6	5.6×10^4	0.50
NA	1.176×10^6	6.6×10^4	0.55
UE	1.057×10^6	5.3×10^4	0.52

各口腔扁平上皮癌細胞株由来CD133陽性細胞および陰性細胞の細胞形態および増殖能を比較検討した結果、いずれの細胞株においても、CD133陽性細胞の増殖能は陰性細胞や親細胞と比較して低下していた。



今回の申請期間で同定した活性の高い海洋生物由来生理活性物質はすべて既知の物質であった。口腔癌細胞より分離したCD133陽性細胞を口腔癌幹細胞として未知の物質が

同定されればその毒性効果につき検討を予定していた。

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4件)

1. Petrosiols A-E, neurotrophic diyene tetraols from the Okinawan sponge *Petrosia strongylata*

Kouhei Horikawa, Takuya Yagyū, Yukio Yoshioka, Takeshi Fujiwara, Akihiko Kanamoto, Tetsuji Okamoto, Makoto Ojika
Tetrahedron 69 (2013) 101-106
査読あり

2. Ectomesenchymal chondromyxoid tumor of the tongue: insights on histogenesis.

Yoshioka Y, Ogawa I, Tsunematsu T, Sakae T, Yamasaki S, Fukui Y, Hayashido Y, Toratani S, Okamoto T.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.115 (2)230-240, 2013
doi: 10.1016/j.oooo.2012.11.008
査読あり

3. Ameloblastic carcinoma, secondary type, of the mandible: a case report

Yoshioka Y, Toratani S, Ogawa I, Okamoto T.
J Oral Maxillofac Surg.71(1)e58-e62,2013
doi: 10.1016/j.joms.2012.09.005. Epub 2012 Oct 23.
査読あり

4. 多科連携により初期治療と欠損部の再建をなし得た重症口腔顎顔面外傷の一例

吉岡幸男 虎谷茂昭 伊藤翼 山崎佐知子 藤井良典 小泉浩一 久保隆靖 林堂安貴 岡本哲治
日本口腔顎顔面外傷学会雑誌 12(1)37-43, 2013
査読あり

〔学会発表〕(計6件)

1. 当科における唾液腺腫瘍の臨床的検討
鍋島巧, 濱田充子, 吉岡幸男, 小泉浩一, 谷亮治, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治
第58回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会

平成25年10月11日(金)~13日(日) 福岡

2. 下顎粉碎骨折を伴った広範囲な重症顔面外傷の治療の一例

~一次救命処置から欠損部再建へ~
吉岡幸男, 虎谷茂昭, 林堂安貴, 伊藤奈七子, 伊藤翼, 久保隆靖, 高本宗男, 廣橋伸之, 谷川攻一, 岡本哲治

第66回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会
平成24年5月17日(木), 18日(金)
広島

3. 口腔内に生じた MALT リンパ腫の3例
赤木恵理, 吉岡幸男, 岡本康正, 小泉浩一,
小川郁子, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治
第41回(社)日本口腔外科学会 中・四国
地方会
平成24年4月28日(土) 愛媛

4. Ectomesenchymal chondromyxoid tumor
の1例
坂上泰士, 吉岡幸男, 山崎佐知子, 小川郁子,
林堂安貴, 虎谷茂昭, 岡本哲治
第56回(社)日本口腔外科学会総会・学術
大会 大阪
平成23年10月21日(金)~23日(日)

5. 上唇粘膜下に生じた筋上皮腫の一例
木村直大, 吉岡幸男, 小泉浩一, 小川郁子,
虎谷茂昭, 岡本哲治
第40回(社)日本口腔外科学会 中・四国
地方会 島根
平成23年5月28日(土)

6. 左側顎下部にみられた石灰化リンパ節の
1例
藤井良典, 吉岡幸男, 新谷智章, 常松貴明,
小川郁子, 虎谷茂昭, 岡本哲治
第40回(社)日本口腔外科学会 中・四国
地方会 島根
平成23年5月28日(土)

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉岡 幸男 (Yoshioka yukio)
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号: 20335665

(2)研究分担者

岡本 哲治 (Okamoto tetsuji)
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号: 00169153

小鹿 一 (Ojika makoto)
名古屋大学・生命農学研究科・教授
研究者番号: 50152492

林堂 安貴 (Hayashido yasutaka)
広島大学・病院・講師
研究者番号: 70243251

新谷 智章 (Shintani tomoaki)
広島大学・病院・助教
研究者番号: 90403518