

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23701108

研究課題名（和文） 水圏多細胞生物共生、寄生微生物からの抗腫瘍物質の探索

研究課題名（英文） Search for antitumor compounds from symbiotic or parasitic microbes in aquatic multicellular organisms

研究代表者

和田 俊一（WADA SHUN-ICHI）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：40450233

研究成果の概要（和文）：本研究では、新しい抗腫瘍剤の効率的な発見を目指し、各種水圏生物より約 1000 株の微生物を単離培養し、代謝産物より、がん細胞に毒性を示す物質を単離した。その結果、13 種類の既知化合物が同定され、8 種類の新規化合物の存在が確認された。また化合物の活性評価系として多種培養細胞株を用いた毒性比較、評価系を確立した。この結果、新規化合物 lentsztrehalose を発見し、protein phosphatase 2A 特異的阻害物質 rubratoxin A については、試薬としての市販化を実現させた。

研究成果の概要（英文）：In this study, the researcher aimed for efficient searching of new antitumor agents. About 1000 strains of microbes were isolated from aquatic organisms and cultured. Cytotoxic compounds against cancer cells were isolated from the metabolites. While 13 known compounds were identified, 8 compounds were estimated as novel compounds. The researcher established the evaluation and comparison system of cytotoxicity employing multiple culture cell lines. Harnessing the system, a novel compound lentsztrehalose was discovered and a protein phosphatase 2A specific inhibitor rubratoxin A was launched as a molecular probe.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：抗がん物質探索、ケミカルバイオロジー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) がんが日本人の死因第一位になってから 30 年以上経過しているものの、現在に至ってもなお、ほとんどのがんに對して決定的な治療効果を示す薬剤は存在せず、常に新しい構造、作用様式を示す薬剤の開発が求められている。天然化合物は、化学的合成が困難な構造や特殊な作用様式をもつものが多く、抗腫瘍物質の探索源として注目されてきたが、近年では発見しやすい物質は取りつくさ

れてしまったかのように、新規化合物の発見が年々困難となってきている。そのため、これまでに薬剤の探索があまりなされていなかった生物種に注目する必要があった。

(2) 天然物化学の分野においては、長い間、身近である陸上生物からの生物活性物質の探索がより多くなされ、水圏生物に関しては未開発の部分が多く残されていた。このため、近年では次第に水圏生物に対する注目が増

しており、新規天然化合物の報告例において水圏生物に由来するものの割合が年々増加傾向にある。

(3) 多細胞生物から薬剤を探索する場合、同じ生物の再現的かつ十分な量の確保が困難な場合が多いので、培養可能な微生物を探索源とする方が無理が少ない。一方、抗腫瘍物質として、真核細胞であるがん細胞の増殖や生存に影響を及ぼす物質を探索する場合、土壌中あるいは水中などに独立して生存する微生物ががん細胞の生存や増殖に影響を及ぼす物質を作り出すという生物学的な脈絡に乏しい。その点、多細胞真核生物に共生または寄生している微生物であれば、自らの生存に有利となるように宿主生物の細胞の生存や増殖に影響を及ぼす物質を生産する可能性がより高く、より効率の良い新規抗腫瘍物質探索源として注目された。

(4) 本研究者は、それまでの研究において、がん細胞株 50 種類あまりと正常細胞株数種を用いた細胞毒性評価系と、結果の比較評価系を開発していた。また、これを応用したスクリーニングシステムにより、ある種のがん細胞に選択的に毒性を発揮する物質や、10 種類程度のがん治療標的分子に対する阻害剤の探索が同時に可能となっていた。

## 2. 研究の目的

(1) 上記のような背景のもと、構造や活性に抗腫瘍剤として有望でユニークな特徴をもつ天然化合物を効率よく見出していくため、水圏多細胞生物に共生、寄生している微生物を単離し、その培養液調整物についてがん細胞および正常細胞への毒性を比較評価する。

(2) 有望な活性の見られた培養液サンプルについては、活性成分の精製、単離を行い、各種分析により化合物の同定を行い、新規抗腫瘍物質の発見を目指す。

(3) 特に有望な化合物が得られた場合は、大量精製を行い、マウスを用いた *in vivo* での抗腫瘍活性の評価を行う。また、各種細胞生物学、分子生物学、あるいは生化学的アプローチにより、その物質の作用機構の解析や標的分子の解明を目指す。

(4) 効率的な物質探索システムの確立を目指し、多種培養細胞の毒性評価、比較系も随時改良していく。

## 3. 研究の方法

(1) 魚類、無脊椎動物、および海藻類などの

多細胞生物を採集した。これらをそれぞれ生理食塩水中でホモジナイズし、その懸濁液を細菌あるいは真菌培養用の寒天培地上に播種した。5 日間の常温培養後、出現した微生物コロニーについて、外見上同種とみられる菌の重複を避けるようにしながら液体培地に移し、10 日間常温培養したのち、一部を保存用に確保し、残りに終濃度 70% エタノールを加えて遠心分離し、上清をスクリーニングサンプルとした。

(2) 各微生物培養液より調整したスクリーニングサンプルにより 52 種類の培養がん細胞株と 3～5 種類のマウス臓器由来正常細胞群を処理し、MTT アッセイにより細胞毒性の測定を行った。各細胞への毒性の強弱を比較し、正常細胞への毒性が弱く、特定の、あるいは一般的にがん細胞に毒性の強いサンプルを選び出した。また本研究者が開発した比較プログラムの利用により、市販試薬などとの類似性を計算し、がん分子標的薬の開発ソースとして期待がもてるサンプルを選び出した。

(3) 選択された各サンプルより、各種液体クロマトグラフィーと細胞毒性評価を繰り返しながら、活性成分を精製、単離した。活性成分については、精密質量分析、NMR 分析、あるいは UV 吸収分析などの結果、化合物の同定を行った。

(4) 得られた化合物の一部については、S-180 肉腫細胞や Ehrlich 細胞などを接種したマウスを用いて抗腫瘍活性の評価を行った。

(5) 市販医薬品や試薬類の評価例を蓄積し、細胞の選別を行い、さらにより正確な比較が可能となるようにアルゴリズムの適正化をはかりながら、上記の細胞毒性評価系と比較プログラムを随時改良した。

## 4. 研究成果

(1) 主に駿河湾周辺の磯域より、魚類 4 種、無脊椎動物 17 種、海藻 3 種を採取し、それらに共生あるいは寄生する細菌および真菌を中心として約 1000 株の微生物を単離した。これらの液体培養を行い、一部を凍結保存し、以降の再現的な利用が可能とした。また残りをスクリーニングサンプルとして、多種培養細胞への細胞毒性評価を行った。その結果、85 サンプルに何らかの形で細胞毒性が見られた。

(2) このうち、比較プログラムによる評価の結果、抗腫瘍物質として有望なものが含まれている可能性の高いサンプルを絞り、21 サン

プルをヒットとみなして活性成分の精製、単離を行い、各種分析により化合物の同定を行った。

(3) その結果、各ヒットサンプルより既知物として、macrolactin D, mixirin A, aurasperone C, malformin A, lucilactaene, ergochrome AA, javanicin, surfactin B1, 1,7-dihydroxy-5-isoquinolinecarboxylic acid, leucinostatin B, amicoumacin A, citreoviridin, および ferricrocin の 13 種類の化合物が同定された。

(4) 活性成分未同定のサンプルのうち、活性画分の精密質量分析の結果、281.0506、348.1089、382.1729、417.1786、575.3151、663.3544、674.3471、793.2283 と測定された 8 つの成分については、データベース (Dictionary of Natural Products, CRC Press) 検索の結果、新規物質であるものと推定された。これらについては現在、単離、構造決定を進めている。

(5) 本研究における細胞毒性評価系の改良のために、本研究所において既に充実したスクリーニングサンプルライブラリーが用意されている放線菌代謝産物や、市販医薬品、市販試薬の評価なども行ってきた。その結果、*Lentzea* 属の新種放線菌より、新規 trehalose 類縁体 lentztrehalose (図 1) を発見した。この化合物は trehalose 分解酵素 trehalase による分解を受けにくく、S-180 肉腫細胞担癌マウスにおいて顕著な抗腫瘍活性を示した (図 2)。また Ehrlich 細胞腹水担癌マウスにおける延命効果も確認された。さらに、trehalose を上回る骨強化作用や生体マウスでの肥満予防作用が確認された。これらのことから、lentztrehalose は生体内で安定で、trehalose を上回る生理活性を発揮する物質として今後の開発、利用が期待された。

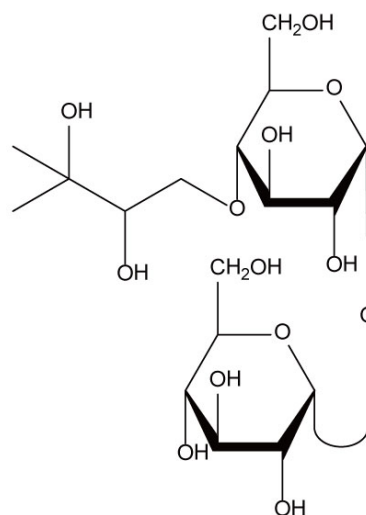


図 1. Lentztrehalose の構造

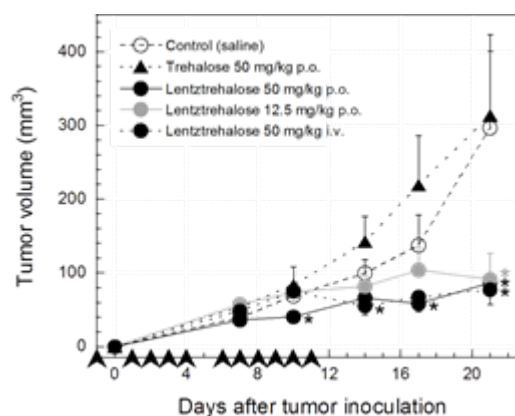


図 2. Lentztrehalose の抗腫瘍効果

(6) また、本研究者が作用機構について以前明らかにしていた protein phosphatase 2A 特異的阻害剤である rubratoxin A について、本研究における細胞毒性評価系での評価をもとにして利用法を検討した結果、市販化の実現につなげ、一般に入手可能な状態とすることが出来た。今後、一般に広く利用されるものと期待される。

## 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)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：新規化合物レンツトレハロース、その製造方法、及びその用途、並びに、新規微生物

発明者：和田俊一、大庭俊一、染野哲也、波多野和樹

権利者：公益財団法人微生物化学研究会

種類：特許

番号：特願 2013-110521 号

出願年月日：2013 年 5 月 27 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田俊一 (WADA SHUN-ICHI)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：40450233