

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350975

研究課題名(和文)新規骨格を有するNF-kappa B阻害剤の探索と難治性がん治療への応用

研究課題名(英文) Screening of NF-kappa B inhibitors having new core structure and application to aggressive cancer treatment

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：転移の抑制剤は副作用の少ない抗がん剤として期待される。私たちの発見したNF-kappa B阻害剤DHMEQは動物実験で多くの疾患モデルを抑制するが、不安定性の問題点がある。今回、より安定で、新規骨格のDHMEQ誘導体SEMBLをデザイン・合成した。SEMBLは卵巣がん細胞の遊走・浸潤をDHMEQよりより強く抑制した。(2017論文発表)。植物の葉から得られる新規フラボノイドdesmalもNF-kappa Bを阻害し、卵巣がん細胞の遊走・浸潤を阻害することを見出した(2016論文発表)。これらの化合物は転移の機構解析や新しい抗がん剤のリードとして有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Metastasis inhibitors are expected as new chemotherapeutic agents with little side effects. We previously discovered DHMEQ as an NF-kappa B inhibitor. It shows various anti-inflammatory and anticancer activities in animal experiments, but it contains epoxide moiety that causes instability. In the present research, we designed and synthesized an epoxide-free DHMEQ analog called SEMBL. SEMBL inhibited NF-kappa B as DHMEQ. It also inhibited cellular migration and invasion in ovarian carcinoma cells more strongly than DHMEQ. Moreover, it was shown to be more stable than DHMEQ in aqueous solution (published in 2017). In one hand, we previously discovered a novel plant-derived flavonoid desmal. In the present research, desmal was found to inhibit NF-kappa B. It also inhibited cellular migration and invasion in ovarian carcinoma cells (published in 2016). These inhibitors will be useful for the mechanistic study of metastasis and for the development of new chemotherapeutic agents.

研究分野：生物化学

キーワード：NF-kappa B 分子デザイン 天然物 がん 転移 炎症 DHMEQ desmal

## 1. 研究開始当初の背景

悪性疾患に対する治療法は進歩したが、なおホルモン非感受性固形がん、腹腔内転移が活発な卵巣がんなど多くは難治性である。NF-kappa Bはがん細胞のアポトーシスを阻害し、転移促進因子の発現を促進し、微小環境細胞の炎症を促進することから、阻害剤は抗がん活性を示す。私たちは2000年ごろに特異的NF-kappa B阻害剤(-)-DHMEQを天然物からの分子デザインにより発見した(図1)。光学活性体を(-)-DHMEQ、ラセミ体をDHMEQと表示する。(-)-DHMEQのNF-kappa B阻害機構を明らかにし、分子内epoxideがp65などNF-kappa B構成因子の特異的なcysteineに反応し、共有結合することがわかった(J. Med. Chem., 51: 5780-5788, 2008)。DHMEQは多くの動物実験に使われ、多彩で強力な抗炎症作用、抗がん作用を示し、疾患モデルの実験において今まで毒性は全く出ていない。選択的にがん幹細胞の増殖を抑制することも報告されている(雑誌論文7)一方、(-)-DHMEQはepoxideを有し、非特異的に生体分子に結合する可能性があり、血液中の不安定性をもたらす。そこで、難治性がんの克服のため、epoxideのないDHMEQ誘導体、そのほか新しい骨格のより安定性の優れたNF-kappa B阻害剤が必要とされている。

## 2. 研究の目的

本研究では血液中で安定な新しい骨格のNF-kappa B阻害剤を微生物、植物からの天然物スクリーニング、および(-)-DHMEQの一部骨格を利用した分子デザインから探索する。そして、得られた化合物の阻害の機構、抗がん活性、安定性を、主に培養細胞を使った実験で調べる。がん細胞の浸潤を阻害する毒性

の低い化合物は有用な転移抑制剤になり得るので、細胞遊走・浸潤阻害物質も微生物、植物からスクリーニングする。化学と生物学を融合させたケミカルバイオロジーを駆使して、新しい機構で働く抗がん剤を見出し、開発基礎研究を行うことが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 新規骨格 NF-kappa B 阻害剤の分子デザインとスクリーニング：NF-kappa B 阻害剤 DHMEQ の epoxide を除いた類似構造を分子デザインして、化学合成する。一方、放線菌の培養液や植物抽出液からマクロファージにおいて LPS-誘導 NO 産生阻害をスクリーニングする。クロマトグラフィーで精製し、NMR, MS などで構造を決定する。一方、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測定：細胞遊走能は wound healing assay で評価し、細胞浸潤能は Matrigel invasion chamber assay を用いて評価する。

(3) NF-kappa B 阻害剤の安定性の評価：水溶液中での安定性を調べるために、化合物を PBS に溶解し、その後、抽出して、HPLC で残量を測定する。残存生物活性は、処理後、PBS 溶液の LPS-誘導 NO 産生の阻害度で測定する。

## 4. 研究成果

(1) 安定な epoxide-free DHMEQ 誘導体 SEMBL の分子デザイン・合成および生物活性：(-)-DHMEQ は NF-kappa B 構成因子 p65、RelB、cRel、p50 の特異的 cysteine に共有結合して DNA 結合能を消失させる。cysteine SH は(-)-DHMEQ 分子内の epoxide を親核的に攻

撃して結合する。そこで、SH 基と結合できる exomethylene carbonyl を epoxide のかわりに導入し、そのほかは(-)-DHMEQ となるべく類似の構造を保つように設計した。このようにして設計した化合物は (S)-beta-salicyloylamino-alpha-exo-methylene-gamma-butyrolactone (SEMBL, 図 1)であり、合成は N-t-Boc-aspartic acid, beta-benzyl ester を出発原料として、そのカルボン酸を還元してアルコールとした後に、ラクトンに導いた。exomethylene 基を導入した後、加水分解により alpha-methylene-gamma-butyrolactone を得て、最後にサリチル基を導入して SEMBL が得られた。Cysteine SH は SEMBL の exomethylene 部位に結合すると考えられる (図 1)。

SEMBL は(-)-DHMEQ と同等に p65 の in vitro DNA 結合を阻害した。マウスマクロファージ様 RAW264,7 細胞においては、(-)-DHMEQ より強く、LPS に誘導される NF-kappa B 活性、および NO 産生を阻害した。さらに、LPS に誘導される IL-6、IL-1 beta、TNF-alpha の分泌も抑制した。さらに明細胞卵巣がん ES-2 細胞において SEMBL は毒性を示さない濃度で、細胞遊走と浸潤を抑制した。

SEMBL と(-)-DHMEQ を PBS に溶解し、安定性を比較したところ、残存する量と活性は SEMBL の方が高かった。

SEMBL は(-)-DHMEQ より合成が容易であり、安定性に優れ、第二世代の DHMEQ として、開発候補物質の可能性がある (雑誌論文 1)。

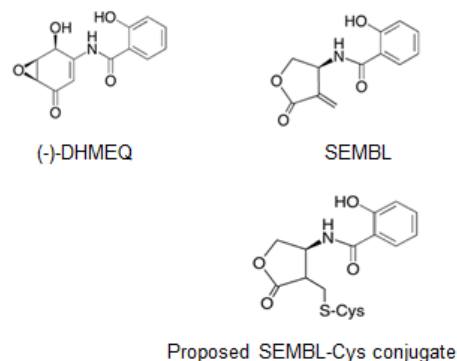


図 1 epoxide-free DHMEQ 誘導体 SEMBL

(2) 植物由来新規フラボン化合物 desmal による NF-kappa B の阻害：約 2000 株の放線菌培養液 ethyl acetate extract から LPS による NO 産生の阻害物質をスクリーニングした。その結果、genistein, genistein 7-O-a-L-rhamnoside および daidzein 7-O-a-L-rhamnoside が得られた。しかし、これらの化合物は既知であり、次に、私たちの発見した新しいフラボン化合物 desmal (図 2)に注目した。

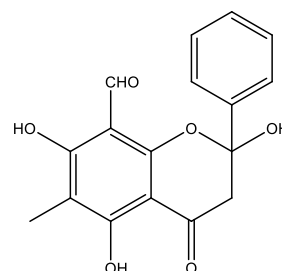


図 2 植物由来 desmal

desmal はタイの植物 *Desmas chinensis* の葉から protein-tyrosine kinase 阻害剤として単離された(FEBS Lett. 320: 169-172, 1993)。desmal は RAW264.7 細胞において LPS に誘導される NO 産生と NF-kappa B 活性化を阻害した。さらに明細胞卵巣がん ES-2 細胞において、恒常的に活性化している NF-kappa B 活性を低下さ

せ、細胞の遊走と浸潤を阻害した。浸潤阻害機構として urokinase-type plasminogen activator (uPA) mRNA の発現を低下させることがわかった (雑誌論文 2)。

(3) 放線菌由来新規がん細胞遊走阻害物質 migracin A による IGF-1 を介した卵巣がん細胞浸潤の抑制：細胞の遊走能はすべてのがん転移機構に含まれ、遊走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。私たちは乳がん細胞の遊走を阻害する新規物質として放線菌から migracin A および B を発見した (J. Antibiot. 66: 225-230, 2013)。migracin A と B は同等のがん細胞遊走阻害活性を示す。

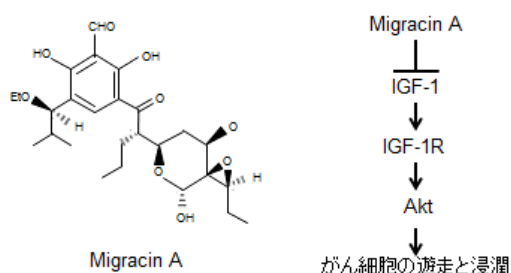


図 3 新規がん細胞浸潤阻害剤 migracin A の構造と作用機構。

本研究で私たちは明細胞卵巣がん ES-2 細胞において migracin A が遊走と浸潤を阻害することを示した。さらに、ES-2 細胞遊走の阻害機構を解析したところ、motility array において migracin A は IGF-1 の発現を低下させることがわかった。IGF-1 のノックダウンは遊走・浸潤能を低下させた。以上の結果から、migracin A は IGF-1 発現阻害を介して遊走を阻害すると考えられる (図 3)。一方、ES-2 細胞の寒天内増殖を阻害しないこと、VEGF に誘導される HUVEC の管腔形成を阻害するこ

とがわかった。migracin A は細胞毒性が低く、転移を抑制する新しい分子標的医薬の候補として可能性がある (雑誌論文 6)。

(4) DHMEQ によるヒト腹腔内細胞の炎症反応抑制および conophylline の抗炎症活性：DHMEQ は腹腔内投与の場合、腹腔内炎症性細胞の NF-kappa B を阻害することが抗炎症。抗がん作用に重要と考えられる (Forum of Immunopathological Diseases and Therapeutics 4: 63-77, 2013)。今回、Poznan 大学との共同研究により、DHMEQ がヒト初代培養 peritoneal mesothelial 細胞の IL-6 産生などを抑制することがわかった (雑誌論文 3)。DHMEQ は軟膏としてアトピー等皮膚炎症抑制効果もある (雑誌論文 5)。一方、がん細胞浸潤阻害活性のある植物由来 conophylline が破骨細胞の分化を抑制することを示した (雑誌論文 4)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (関連の論文は計 40 件、うち 7 件を表示。Ref. 7 以外すべて査読あり。

1. K. Sidthipong, J. Ma, W. L. Yu, Y. F. Wang, S. Kobayashi, S. Kishino, N. Koide, T. Yokochi, K. Kato, S. Okada and K. Umezawa: Rational design, synthesis and in vitro evaluation of novel exo-methylene butyrolactone salicyloylamide as NF-κB inhibitor. Bioorg. Med. Chem. Lett. 27: 562-566, 2017.
2. L. Wang, Y. Lin, K. Sidthipong, J. Tang, M. Li, T. Koyano, T. Kowithayakorn, K. Sumiyoshi, T. Ukaji, and K. Umezawa: Inhibition of NF-κB and cellular invasion by novel flavonoid desmal in ovarian carcinoma cells. Heterocycles 92: 353-360, 2016.

3. P. Sosinska, B. Mackowiak, R. Staniszewski, K. Umezawa and A. Bręborowicz: Inhibition of NF- $\kappa$ B with dehydroxyepoxyquinomicin modifies function of human peritoneal mesothelial cells. American Journal of Translational Research 8: 5756-5765, 2016.

4. N. Koide, Y. Kondo, E. Odkhuu, J. Ulziisaikhan, T. Ukaji, T. Yokochi and K. Umezawa: Inhibition of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) or lipopolysaccharide-induced osteoclast formation by conophylline (CNP) through downregulation of CREB. Immunology Letters 161: 31-37, 2014.

5. N. Noma, M. Asagiri, M. Takeiri, S. Ohmae, K. Takemoto, K. Iwaisako, S. Simizu and K. Umezawa: Inhibition of MMP-2-mediated mast cell invasion by NF- $\kappa$ B inhibitor DHMEQ in mast cells. International Archives of Allergy and Immunology 166: 84-90, 2015.

6. T. Ukaji, Y. Lin, K. Banno, S. Okada and K. Umezawa: Inhibition of IGF-1-mediated cellular migration and invasion by migracin A in ovarian clear cell carcinoma cells. PLOS One 10(9): e0137663, 2015  
DOI:10.1371/journal.pone.0137663.

7. T. Ukaji and K. Umezawa: Novel approaches to target NF- $\kappa$ B and other signaling pathways in cancer stem cells. Advances in Biological Regulation 56: 108-115, 2014.

[学会発表] (関連の学会発表は計 27 件、うち 3 件を表示)

1. Kulrawee Sidthipong and Kazuo Umezawa: NF-kappa B inhibitor, (-)-DHMEQ, as an anti-inflammatory agent in cosmetics. (第 1 席ポスター賞受賞) 10<sup>th</sup> World Congress of the International Academy of Cosmetic Dermatology

2015.11.14-16, Rio de Janeiro, Brazil.

2. Kazuo Umezawa: Screening of signal transduction modulators that inhibit cancer cell growth and spread. (invited speaker) DSK Mini-Symposium-Perspectives in Anticancer Drug Discovery and Development. 2014.11.11 Kyoto.

3. 梅澤一夫: 低分子シグナル伝達阻害剤の探索とマトリクス修飾への応用。(招待講演) 第 46 回日本結合組織学会学術大会 第 61 回日本マトリクス研究会大会 合同集会 2014.6.5-7 名古屋。

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: 脂肪肝および脂肪性肝炎治療剤。発明者: 梅澤一夫、米田政志、中出幸臣。権利者: 学校法人愛知医科大学。番号: 特願 2014-254131。出願年月日: H26. 12. 16。

[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

須貝 威 (SUGAI Takeshi)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号: 60171120