

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460124

研究課題名(和文)新規抗がん剤素材開発を目指した海洋無脊椎動物由来のチューブリン制御分子の探索研究

研究課題名(英文) Search for tubulin regulatory molecules derived from marine invertebrates aimed at the development of novel anticancer agents

研究代表者

山田 耕史 (YAMADA, Koji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：00253469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、海洋無脊椎動物由来のチューブリン重合・脱重合阻害物質を新規抗がん剤のリード化合物として開発するために、海洋無脊椎動物の採集を行い、各動物を処理して粗抽出物を得た。更に、得られた試料について、神経成長因子存在下で、PC12細胞に対する作用を調べ、チューブリン機能に影響を与えている可能性を有する粗抽出物を見出した。次に活性を示すことが認められた、海綿動物並びにマナモコ、更に、海草の活性成分の検索を行い、セラミド、セレブロシド、asebotin類を単離することができた。更に、構造活性相関の評価を行うために必要な数種のアナログ体の合成に着手した。

研究成果の概要(英文)：In this application research, in order to develop the tubulin polymerization and the depolymerization inhibitory substance of the marine invertebrate as a seed compound of a new antineoplastic drug and to separate an active ingredient, the sea invertebrate animal was collected, each animal was processed, and the rough extract was obtained. Furthermore, the extract which has a possibility of having investigated the action on PC12 cell and having affected the tubulin function under nerve growth factor existence about the obtained sample as the first activity testing was found out. The active ingredient was searched about the sponges, sea cucumbers, and sea glass, that was accepted to be that activity will be shown. A ceramide, cerebrosides, and asebotin derivatives have been separated. Synthesis of several sorts of analog objects, required in order to evaluate structure activity relationship, was also started.

研究分野：天然資源系薬学

キーワード：チューブリン 抗がん剤 海洋無脊椎動物 棘皮動物 ナマコ 海綿動物 海洋真菌 海洋細菌

### 1. 研究開始当初の背景

神経突起伸展作用物質の探索研究に関しては、申請者らの研究 [K. Yamada, et. al., Chem. Pharm. Bull., 57 (3), 315-317 (2009), K. Yamada, et. al., Chem. Pharm. Bull., 56(5), 734 (2008), M. Kaneko, K. Yamada, et. al., Chem. Pharm. Bull., 55(3), 462 (2007)] をはじめ、分化誘導物質に関する研究例が多く報告されている。一方、チューブリン重合阻害活性物質に関する報告例としては、微生物の産生物質としては、rhizoxin [S. Iwasaki, et. al., J. Antibiot., 37, 354, (1984)], phomopsin [M. F. Mackey, et. al., J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1219 (1986)], ustiloxin [Y. Koiso, et. al., Tetrahedron Lett., 33, 4157 (1992)] 等が、更に、植物成分としては、colchicine [J. W. Cooke, et. al. "The Alkaloids II" Academic Press (1952)], や steganacin [S. M. Kupchan, et. al., J. Am. Chem. Soc., 95, 1335 (1973)] に端を発し、taxol [P. Schiff, et. al., Nature, 277, 665 (1979), J. Manfredi, et. al., J. Cell. Biol., 42, 126 (1986)] 等をはじめ多くの成分が知られている。一方、海洋生物由来のチューブリン重合阻害活性物質としては、dolastatin 10 [G. R. Pettit, et. al., J. Am. Chem. Soc., 109, 6883 (1987)], halichondrin B [D. Uemura, et. al., J. Am. Chem. Soc., 107, 4796 (1985)], laulimalide [S. L. Mooberry, et. al. Cancer Rev., 58, 653 (1998)], eleutherobine [T. Lindel, et. al. J. Am. Chem. Soc., 119, 8744 (1997)], diazomamide [N. Lindquist, et. al. J. Am. Chem. Soc., 113, 2303 (1991)] 等の報告がなされているが、抽出・分離の段階からチューブリンを分子標的として抗がん剤のリード化合物を海洋動物から極微量成分に至るまで探索する試みは、世界的にも稀である。これまで申請者は、棘皮動物より多種多様な構造を有するスフィンゴ糖脂質成分を多数分離し、その構造の解明を行ってきた。また、それら多くの成分は、ラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC12 細胞に対して顕著な神経突起伸展作用を示すことを見出してきた。更に、それら活性成分の構造と活性の相関について検討を行い、スフィンゴ糖脂質成分の活性発現に必要な構造単位を明らかにすることに成功してきた。

一方、神経細胞における神経突起の伸展現象は、主に、チューブリン分子の重合に基づく微小管の形成に依存していることが知られている。微小管は、細胞分裂等の様々な細胞機能に関与している。その構成単位であるチューブリンは、重合・脱重合を繰り返し、微小管の機能発現のための動的な構造形成を司っている。従って、がん細胞のチューブリン分子の重合・脱重合阻害剤を開発することは、微小管の機能を制御することでがん細胞の分裂を抑制する薬剤の開発につながると思われる。

### 2. 研究の目的

がん克服の実現のためには、より有効な新規抗がん剤を創出することが不可欠である。本申請研究では、新規抗がん剤開発のためのリード化合物の創製を目指した基礎研究として、(1) がん細胞の分裂等の細胞機能に大きく関与しているチューブリン分子の重合・脱重合を阻害する化学物質を九州西岸海域産海洋無脊椎動物から探索し、(2) その構造解明と構造活性相関の検討を行い、(3) 活性アナログ体開発のための基礎データとして、活性発現に必要な構造単位を解明することを目的として行った。具体的には、申請者は、これまでの海洋無脊椎動物、特に棘皮動物由来の神経突起伸展性スフィンゴ糖脂質に関する研究の経験を基に、容易に判別可能な PC12 細胞の神経突起伸展作用活性やヒト線維肉腫細胞 HT1080 の細胞質微小管に対する影響を指標にして、チューブリン分子の重合・脱重合阻害活性を示す新規抗がん剤の素材となり得る活性成分の探索を行い、更には活性発現に必要な構造単位を解明することを目的として本研究を企画した。

### 3. 研究の方法

天然有機化合物を医薬素材として開発するためには、得られた活性成分の化学構造の単純化と低分子量化が必要である。本申請研究では、九州西岸海域産海洋無脊椎動物からチューブリン重合・脱重合阻害作用を示す活性成分を検索し、得られた成分を新規抗がん剤のリード化合物として開発するために、(1) 平成 26 年度には、海洋生物の採集と活性成分の抽出・分離操作を行う。(2) 平成 27 年度には、得られた活性成分の化学構造の解明を行う。(3) 平成 28 年度には、活性発現に必要な構造単位の解明を行う。本研究は、以下の手順で行った。

(1) 平成 26 年度：海洋無脊椎動物のスクリーニングと活性成分の抽出・単離を主に行った。

九州西岸海域(五島列島、天草灘、有明海沿岸海域)に豊富に生息している海洋生物、特に、海洋無脊椎動物(棘皮動物、腔腸動物、軟体動物、海綿動物、原索動物等)の採集を行った。また、紅海産海洋無脊椎動物のエキスも入手した。

採集した各試料動物を処理して、粗抽出物(n-hexane、酢酸エチル、n-BuOH 等)を得た。

第一次活性試験として、得られた各粗抽出物について、神経成長因子(NGF)共存下で PC12 細胞に対する神経突起伸展作用を調べ、突起の伸展作用を示し、チューブリン機能に影響を与えている可能性を有する抽出物を選出した。

活性を示した抽出物について、活性を指標にしながら、微量成分に至るまで徹底的に活性成分の分離・精製を行った。活性成分の分離精製操作には、各種オープンカラムクロマ

トグラフ、中圧液体クロマトグラフ装置、高速液体クロマトグラフ装置等を用いて行った。

(2)平成27年度：活性成分のチューブリン重合・脱重合作用の検討と精密構造解析を行った。

単離した活性成分の作用点がチューブリン/微小管であることを確認するために、第二次活性試験として、ヒト線維肉腫細胞HT1080の細胞質微小管に対する作用を、抗チューブリン抗体を用いた免疫染色法を用いて解析し、高感度かつ高い特異性をもってチューブリン重合・脱重合への作用を確認した。

チューブリン重合・脱重合作用を示すことが認められた成分について、各種機器スペクトル(NMR、MS、IR、UVスペクトル)データならびに化学的手法を用いて、化学構造の解明を行った。

構造の明らかになった活性成分について、さらに詳細(定量的)にチューブリン重合・脱重合への作用を調べる。特に、チューブリンの重合/脱重合に影響を及ぼすことが知られている colchicine、vinblastine、vincristine や taxol を Positive Control として用い、活性強度を比較し、Control 物質より顕著な活性を示す成分の検索に努めた。

(3)平成28年度：活性成分の構造活性相関の検討と活性発現構造単位の解明を行った

得られた活性成分のうち、Control 物質より顕著な活性を示す化合物を出発物質として、その誘導体を調製した。

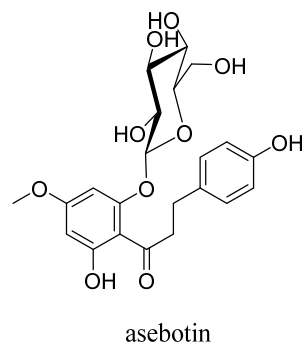
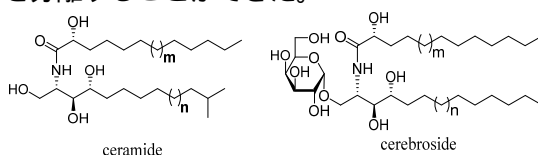
天然由来の成分並びに、調製した誘導体について、HT1080細胞を用いて、チューブリン重合・脱重合への作用を詳細に調べた。

得られた結果を基に、構造活性相関の検討と活性発現に必須な構造単位の解明を行った。

#### 4. 研究成果

(1)平成26年度には活性成分の分離を行うために、海洋無脊椎動物の採集を行い、各動物を処理して粗抽出物を得た。更に、第一次活性試験として、得られた試料について、神経成長因子(NGF)存在下で、PC12細胞に対する作用を調べ、チューブリン機能に影響を与えている可能性を有する粗抽出物を見出した。

(2)平成27年度は、26年度活性を示すことが認められた、海綿動物の活性成分の検索を行った。海綿動物からセラミド類、セレブロシド類を分離することができた。一方、海草からは asebotin を含む多くの既知物質を分離することができた。



#### 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 6件)

Angad I. M. Khedr, Sabrin R. M. Ibrahim, Gamal A. Mohamed, Hany E. A. Ahmed, Amany S. Ahmad, Mahmoud A. Ramadan, Atef E. Abd El-Baky, Koji Yamada, Samir A. Ross, New ursane triterpenoids from *Ficus pandurata* and their binding affinity for human cannabinoid and opioid receptors, Arch. Pharm. Res.7, 897-911, 2016. 査読あり

DOI.10.1007/s12272-016-0784-y

Reda Abdelhameed, Mohamed Saleh Saleh Elgawish, Amira Mira, Amany K. Ibrahim, Safwat A. Ahmed, Kuniyoshi Shimizu, Koji Yamada, Anti-choline esterase activity of ceramides from the Red Sea marine sponge *Mycale euplectellioides*, RSC Advances, 6, 20422-20460, 2016. 査読あり

DOI.10.1039/c5ra26424

EL-Shaheny R.N. and Koji Yamada, The influence of pH and temperature on the stability of flutamide. An HPLC investigation and identification of the degradation product by EI+-MS. RSC Advances 2015, 5: 3206-3214, 2015. 査読あり

DOI.10.109/C4RA13617A, Paper

Khedr Amgad I.M., Mohamed Gamal A., Orabi Mohamed A. A., Ibrahim Sabrin R. M., and Koji Yamada, Staphylopeptide A, a new cyclic tetrapeptide from culture broth of *Syaphylococcus* sp., Phytochemistry Letters, 2015, 13: 11-14, 2015. 査読あり

http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2015.05.007

Takeshi Chijimatsuab, Koji Yamadae, Hiroaki Odad, Satoshi Mochizukic (他3名、5番目): Dietary freshwater clam (*Corbicula fluminea*) extract suppresses accumulation of hepatic lipids and increases in serum cholesterol and aminotransferase activities induced by

dietary chloretone in rats , Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 79(7), 1155-1163 (2015) . 査読あり

DOI.100.1080/09168451.2015.1012147

Rania N. El-Shaheny, Koji Yamada, Stability Study of the Antihistamine Drug Azelastine HCl along with a Kinetic Investigation and the Identification of New Degradation Products, Analytical Sciences, 30(6), 691-697 (2014), 査読あり

<http://doi.org/10.2116/analsci.30.691>

〔学会発表〕(計 7件)

Ama K. Thomford, Reda F. A. Abdelhameed, Koji Yamada, Chemical Studies on the Ghanaian Plant *Thonningia sanguinea* Vahl (Part 1)、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日～2017 年 3 月 27 日、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

Reda F. A. Abdelhameed, Safwat A. Ahmed, 山田耕史、紅海産海草 *Stylissa carteri* の生物活性成分に関する化学的研究 (第 1 報)、第 33 回日本薬学会九州支部大会、2016 年 12 月 3 日～2016 年 12 月 4 日、鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市)

Reda F. A. Abdelhameed, Safwat A. Ahmed, 山田耕史、紅海産海草 *Thalassodendron ciliatum* の生物活性成分に関する化学的研究 (第 2 報)、第 32 回日本薬学会九州支部大会、2015 年 11 月 28 日～2015 年 11 月 29 日、九州保健福祉大学 (宮崎県・延岡市)

Reda F. A. Abdelhameed, Safwat A. Ahmed, 山田耕史、紅海産海草 *Thalassodendron ciliatum* の生物活性成分に関する化学的研究 (第 1 報)、日本生薬学会第 62 回年会、2015 年 9 月 11 日～2015 年 9 月 12 日、長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)

Reda F. A. Abdelhameed, Safwat A. Ahmed, 山田耕史、紅海産海綿 *Mycale euplectellioidea* の生物活性成分に関する化学的研究 (第 2 報)、第 31 回日本薬学会九州支部大会、2014 年 12 月 6 日～2014 年 12 月 7 日、第一薬科大学 (福岡県・福岡市)

山田耕史、日下世菜、出田智明、森崎弘司、岩崎一成、長崎県産トウゲンバ (*Huperzia serrata*) の成分研究 (第 1 報)、日本生薬学会第 61 回年会、2014 年 9 月 13 日～2014 年 9 月 14 日、福岡大学 (福岡県・福岡市)

Reda F. A. Abdelhameed, Safwat A. Ahmed, Koji Yamada, Bioactive Constituents from the Red Sea Sponge *Mycale euplectellioidea*, The 8th JSP-CC TCNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy, 2014 年 9 月 13 日、福岡大学 (福岡県・福岡市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/plan/t/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 耕史 (YAMADA, Koji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (薬学系)・  
准教授

研究者番号 : 00253469