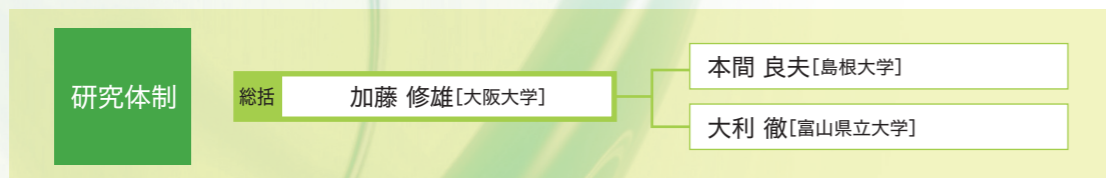


# ジテルペン配糖体をリードとした 分化誘導型新規抗がん剤の開発

研究期間 平成18年度～平成22年度(予定)



※平成21年度における研究体制

## 植物病原菌代謝産物を抗がん剤へ

Project KeyWord

### 分化誘導型抗がん剤

がんは、細胞が脱分化して増殖能のみを発揮させている状態と言え、したがって、再び分化させることで、増殖抑制やアポトーシスへ導くことが可能となるため、分化誘導剤には抗腫瘍効果を期待することができます。

### ハイポキシア

がん細胞が低酸素(ハイポキシア)・飢餓状態に対して抵抗性を獲得すると、難治性となります。逆にハイポキシアはがん特有の環境であり、ハイポキシアでの抗がん効果は、正常細胞にダメージを与えない利点があります。

### ジテルペン配糖体

炭素20個のイソプレノイド骨格に糖鎖が連結した天然有機化合物の総称であり、生理活性を有する化合物が多いです。生合成関連遺伝子群を特定できれば、それを改変することで、目的に適った化学構造賦与も可能となります。

## 1 研究の背景・意義

### シード化合物・コチレニンの抗腫瘍活性

ジテルペン配糖体・コチレニン(CN)は、子葉伸長物質として *Cladosporium* 属の1菌株の代謝産物として単離され、化学構造的に類縁で植物病原菌(*Phomopsis amygdali*)の代謝産物であるフシコクシン(FC)と同様、強力な植物ホルモン様活性を有することで知られてきました。植物細胞膜上のH<sup>+</sup>-ATPaseは、そのC末部がリン酸化され、14-3-3たんぱく質と会合することによって活性化されますが、CN/FC類は、この会合状態を安定化することで、H<sup>+</sup>-ATPaseを永続的に活性化するとされています。

リン酸化たんぱく質と14-3-3たんぱく質の会合は、真核細胞における多様な細胞内信号伝達経路の制御に広範かつ普遍的に係わっており、したがって、CN/FC類が動物細胞に対しても何らかの活性を持つことが期待されてきます。

分担研究代表者・本間らは、CNが前骨髄性白血病細胞(HL-60)に対して分化誘導活性を有することを明らかにしました。さらに、インターフェロンα(IFNα)と併用することにより、種々の固形がん細胞に対してアポトーシスを誘起し、腫瘍増殖抑制効果を示すことも明らかにしました。この効果はin vivoにおいても見られ、担癌マウスの腫瘍増殖を顕著に抑制します。薬剤投与期間中、マウスに異常は見られず、したがって、CNは新規な抗がん化学療法剤となりうるものと期待されました。



▲ヒト肺癌細胞(PC-14)を移植したマウスに対するCN+IFNαの併用効果。腫瘍増殖をほぼ完全に抑制します。

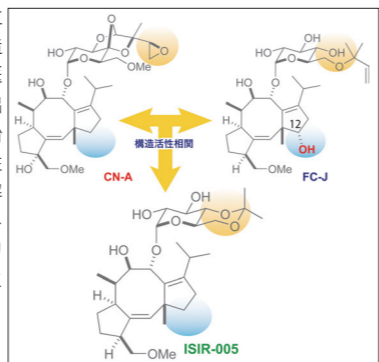
## 2 研究プロジェクトの目標

### フシコクシンを抗がん剤へ

CNとIFNαとの併用は良好な腫瘍増殖抑制効果を示しましたが、未登録のCN産生菌の増殖能が消失し、CNの供給の道が閉ざされるという問題が生じました。そこで、本プロジェクトにおいては、CNと化学構造が類似しており、植物病原菌の代謝産物として将来に互り供給可能なFC類を原料とし、CN様の活性を有する医薬候補化合物を創出することを目的としました。

しかしながら、植物に対してはCNと同等の活性を有するFCであります。HL-60に対する分化誘導活性は持ちません。当然両者の活性の相違は、両者の化学構造の相違に帰結します。そこで、構造活性相関研究を展開し、ジテルペン骨格12位の水酸基の有無が活性発現に大きく関与していることを明らかにしました。そして、天然FC類に存在する12位水酸基を除去した12-デオキシFC誘導体・ISIR-005がHL-60に対してCNに匹敵する分化誘導活性を持つことを見出しました。

本プロジェクトでは、ISIR-005を分化誘導型新規抗がん剤のリード化合物として位置づけ、さらなる構造最適化を経て最終医薬候補化合物を創出するとともに、その治療効果の評価、毒性評価、作用機序の解明研究等を展開し、トランスレーショナル・リサーチへ結びつけることを目標としています。

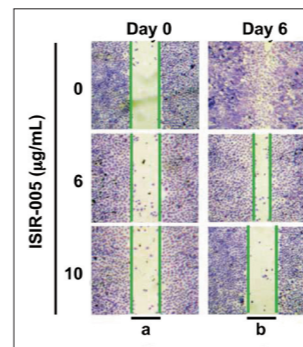


▲CNとFCの化学構造の相違と第一世代リード・ISIR-005。分化誘導活性の発現には、12位水酸基のないことが必須です。

## 3 研究プロジェクトの成果

### リード化合物の治療効果

リード化合物・ISIR-005は、HL-60に対する分化誘導活性を示すとともに、CN同様、IFNαとの併用により、固形がんに対してもin vivo(担癌マウス)で良好な腫瘍増殖抑制効果を示しました。また、単剤でもヒト肺癌細胞(A549)に対して遊走阻害活性を示し、細胞接着喪失によるアポトーシス(anoikis)を誘導することも明らかになりました。



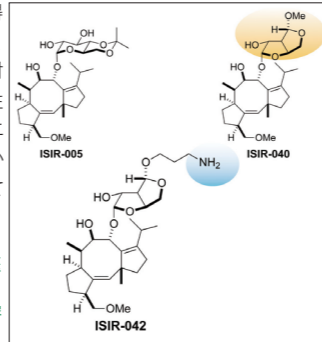
したがって、ISIR-005にはがんの転移を抑制する効果を持つことを期待できます。

ただ、脂溶性が高く水に難溶であり、非結晶性であるなど、物性には改良の余地が残りました。

▲ヒト肺癌細胞(A549)に対するISIR-005単剤の遊走阻害活性。10µg/mLの濃度でほぼ完全に遊走を阻害します。

### 最終医薬候補化合物の創出

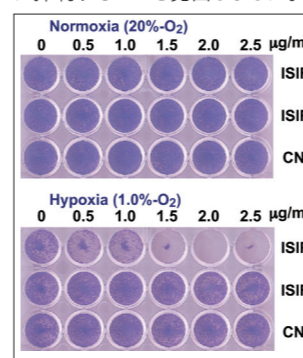
ISIR-005の治療効果は確認できましたが、特に物性改善を意図し、構造最適化を行いました。その結果、グルコース骨格の転位反応によって得られるISIR-040がHL-60に対してCNを凌駕する分化誘導活性を示すことを見出し、第二世代のリード化合物と位置づけました。転位反応によって、多様な官能化側鎖を導入できる利点を活かし、側鎖末端にアミノ基を有するISIR-042を得ました。単剤での分化誘導活性、IFNαとの併用によるマウスに対する治療効果も確認し、水溶性が向上を確認するとともに、クエン酸塩として結晶化できることから、最終医薬候補化合物として位置づけました。



▶第二世代リード・ISIR-040と最終医薬化合物・ISIR-042の構造。ISIR-042は、クエン酸塩として水溶性・結晶性を持ちます。

### Hypoxia選択的腫瘍増殖抑制活性

抗腫瘍活性の評価の過程で、最終医薬候補化合物・ISIR-042が、単剤で、低酸素状態(Hypoxia)に置かれたがん細胞の増殖を顕著に抑制することを見出しました。この活性は、CNやISIR-005には見られず、ISIR-042に特有の活性です。



▲ヒト肺癌細胞(MCF-7, ギムザ染色)に対するISIR-042(単剤)のみ、した。Hypoxia選択的に増殖抑制効果を示します。

### 参考文献

Horie A, Akimoto M, Tsumura H, Makishima M, Taketani T, Yamaguchi S, Honma Y. Induction of differentiation of myeloid leukemia cells in primary culture in response to lithocholic acid acetate, a bile derivative, and cooperative effects with another differentiation inducer, cotylenin A. *Leukemia Research* 32: 1112-1123, 2008

Ottmann C, Wayand M, Sassa T, Inoue T, Kato N, Wittinghofer A, Oecking C. A structural rationale for selective stabilization of anti-tumor interactions of 14-3-3 proteins by cotylenin A. *J. Mol. Biol.* 386: 913-919, 2009

Minami A, Tajima N, Higuchi Y, Toyomasu T, Sassa T, Kato N, Dairi T. Identification and Functional Analysis of Brassicicene C Biosynthetic Gene Cluster in *Alternaria brassicicola*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19: 870-874, 2009

## 4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

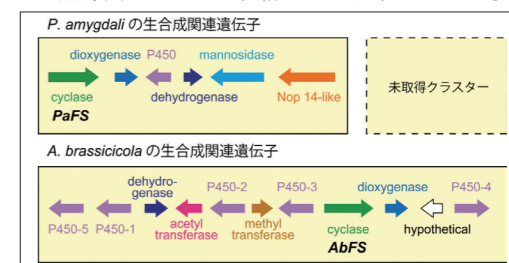
### FC生合成遺伝子の特定とその応用

トランスレーショナル・リサーチへの展開のためには、ISIR-042を大量に供給する必要があります。天然FC類は、植物病原菌・*P. amygdali*の大量培養によって、十分量取得することは可能ですが、不要な12位水酸基の除去に多段階の化学変換を要します。

そこで不要な12位水酸化を担う酵素を特定し、その欠損株を創出すべく検討しています。しかし、既に見出していたフシコクシン骨格合成酵素(PaFS)周辺に、全ての生合成遺伝子を見出すことはできず、生合成クラスターが断片化していることが判明しました。

残りのクラスターの特定を容易にするため、類縁化合物の産生菌である *Alternaria brassicicola* の生合成遺伝子クラスターの取得を試みました。その結果、PaFSと相同性の高いフシコクシン骨格合成酵素(AbFS)周辺に生合成遺伝子クラスターが存在することを見出しました。6種存在する水酸化酵素のうちの3種については、既にその機能解析を完了しています。

現在、*P. amygdali*の全遺伝子配列の解析を進めており、今後、*A. brassicicola*で得られた情報を参考に、12位水酸化酵素を特定しています。そして、その欠損株を取得し、直接12-デオキシFC類を生産させることで、効率良くISIR-042を供給する手法を確立したいと考えています。



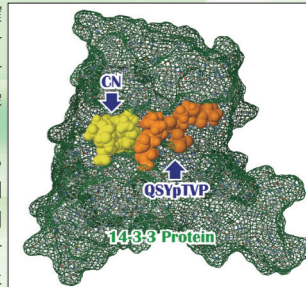
▲*P. amygdali*および*A. brassicicola*のフシコクシン骨格合成酵素(PaFS/AbFS)周辺の生合成関連遺伝子クラスター。

### 作用機序の解明

本プロジェクトにおいてはCNをシード化合物とし、同等の活性を有する化合物をFCから誘導することを目指してきました。そして、少なくとも現象論的にはCNと同等の活性を有するISIR-042を見出すに至りました。CNとIFNαの併用がDR5(Death Receptor 5)とそのリガンドであるTRAIL(TNF-related apoptosis inducing factor)の発現を誘起し、アポトーシスへ導くことが判明しています。そこで、ISIR-005/ISIR-042とIFNαの併用が同様の効果を与えるかを検証した所、予想に反し、全くDR5の発現を誘起していないことが判明しました。したがって、異なる作用機序を有すると考えるのが妥当ですので、その解明を検討する必要があります。

また、Hypoxiaでの活性もISIR-042に特有のものであります。この作用機序解明も必要であります。既に、CNとIFNαの併用効果が14-3-3に依存していることは確認しましたが、他の活性に対しても14-3-3たんぱく質が関与しているかを含め、作用機序の全容解明に取組む計画です。

一方、医薬開発の観点からは、治療効果と毒性評価の詳細な検討も必要です。これらの諸問題を克服し、トランスレーショナル・リサーチへの展開を実現したいと考えています。



▲CN/モデルリン酸化ペプチド/14-3-3たんぱく質3者会合体の結晶構造。同様の安定化機構が作用機序に介在していると想定しています。