

Title	細胞周期制御を標的とする海洋生物由来抗癌活性物質 の探索
Author(s)	孔, 徳新
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45670
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、〈a href="https://www.library.osaka- u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏 名 **孔 徳** 新

博士の専攻分野の名称 博士(薬学)

学位記番号第 19427 号

学位授与年月日 平成17年3月25日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

薬学研究科応用医療薬科学専攻

学 位 論 文 名 細胞周期制御を標的とする海洋生物由来抗癌活性物質の探索

論 文審 査委員 (主査)

教 授 小林 資正

(副査)

教 授 田中 徹明 教 授 田中 慶一 教 授 土井 健史

論文内容の要旨

細胞の癌化に関わる大きな因子の一つが、細胞周期におけるチェックポイントの破綻である。すなわち、未成熟な細胞は、独自の機能を有する成熟細胞へと分化する際には細胞周期を停止する。また、正常細胞は、軽度の障害を受けた際には細胞周期を停止し自身の修復を行ったり、過度の障害を受けた際には自身をアポトーシスによる細胞死へと導くことによって生体機能を制御している。しかしながら、癌細胞は、細胞周期におけるチェックポイントが機能しないため、未分化の状態で無限増殖を続けてしまう。従って、癌細胞の細胞周期を停止しチェックポイントの機能を回復させる化合物は、正常細胞に対する副作用の少ない抗癌剤として期待される。現在、臨床においてレチノイン酸(ATRA)が通常の抗癌剤に対して難治性を示すことの多い急性前骨髄性白血病(APL)に対する分化誘導剤として著効を示すことが確認されている。しかし、各種癌細胞の分化誘導剤に対する感受性は多様であることから、新たな分化誘導剤の開発が求められている。

一方、慢性骨髄性白血病(CML)は、多能性幹細胞の段階での染色体異常に起因する骨髄増殖性疾患である。この 染色体異常として報告されたのが、9番と 22番染色体の相互転座によって生じる Philadelphia (Phl) 染色体である。 この転座は、CML の 90%以上の症例で認められ、Phl 染色体の遺伝子産物である Bcr-Abl が病態発症の本体である ことが明らかになっている。

以上のような背景から、著者は、慢性骨髄性白血病細胞 K562 細胞を赤芽球へと分化誘導する化合物を探索するアッセイ法を用いて種々の海洋生物抽出エキスをスクリーニングした結果、2001 年インドネシアで採集した海綿 Dactylospongia elegans の抽出エキスに顕著な分化誘導活性を見出した。各種クロマトグラフィーおよび HPLC によりこのエキスを精製した結果、活性成分として smenospongine を含む数種の sesquiterpene aminoquinone を単離した。構造活性相関研究の結果、これら sesquiterpene aminoquinone の活性発現にはキノン骨格が必須であり、側鎖のアミノ基も重要であることが明らかになった。一方、5位の立体異性体同士では活性に全く差がないことから、デカリン環の立体化学的活性に影響を与えず、また、アミノ基上の置換基も活性に影響しないことが判明した。さらに、smenospongine を K562 細胞に作用させたところ、赤芽球前駆細胞に特異的に発現する膜糖蛋白の glycophorin A の発現を検出したことから、その分化誘導活性を確認できた。また、細胞周期制御における作用を検討したところ、smenospongine は K562 細胞に対し、CIP/KIP family の Cdk inhibitor (CKI) である p21 の発現上昇を誘導し、細胞周期を G1 期で停止させることが明らかになった。一方、CML の発症原因である Bcr-Abl tyrosine kinase に対す

る smenospongine の作用を調べる目的で、Bcr-Abl の基質として知られる Crkl のリン酸化に対する smenospongine の影響を検討した結果、smenospongine を作用させるとリン酸化 Crkl 量が顕著に減少し、smenospongine が Bcr-Abl による Crkl のリン酸化を阻害していることが示唆された。

一方、細胞周期の制御には、主にアクセルの役目を果たす Cdk/cyclin とブレーキの役目を果たす CKI と呼ばれる タンパク質が関わっており、ブレーキの役目を果たす CKI の発現制御の異常が、細胞周期の暴走、すなわち癌化と大きな関わりがあると言われている。 CKI の一つである p21 は、転写因子 p53 によって発現が誘導され、細胞周期を止めるうえで重要な役割を担っている。しかしながら、P53 は半数以上のヒト癌細胞において変異が認められ、そのため p21 の発現は低く抑えられており、これが多くの癌細胞の無限増殖性の一因になっていると考えられる。それに対して、p21 の変異は癌細胞においてほとんど発見されていない。したがって、p53 非依存的に p21 の発現を誘導させる化合物は、多くの癌細胞の細胞周期を停止させ、無限増殖性を抑制できると考えられる。このような概念のもと、著者は p53 非依存的に p21 の発現を誘導する化合物の探索に着手した。

P53 ネガティブ細胞であるヒト骨肉腫 MG63 に、p21 promoter 遺伝子および luciferase レポーター遺伝子を導入した細胞(MG63 Iuc^t)を用い、p21 promoter の転写活性を化学的に検知できるアッセイ系を構築した。このアッセイ系を用いて種々の海洋生物抽出エキスをスクリーニングした結果、2003 年インドネシアで採集した海綿 Aaptos suberitoides の抽出エキスに活性が見られた。そこで、活性試験の結果を指標に分画精製を行い、活性本体として naphthyridine type のアルカロイド aaptamine を単離した。Aaptamine は、野生型 MG63 細胞に対して細胞周期を G2/M 期で停止させることが明らかになり、また、ウエスタンブロッティングや RT-PCR で解析したところ、p21 発 現誘導作用が確認された。さらに、aaptamine の p21 promoter の転写活性化作用を解析した結果、p21 promoter の $-82\sim-50$ bp に存在する Sp1 サイトが aaptamine の転写活性化作用に重要であることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

正常細胞は、DNA に軽度の障害を受けた際には細胞周期を停止し自身の修復を行ったり、過度の障害を受けた際には自身をアポトーシスへと導くことによって生体機能を制御している。一方、癌細胞は、細胞周期におけるチェックポイントが機能しないため、未分化の状態で無限増殖を続けてしまう。従って、癌細胞の細胞周期を停止しチェックポイントの機能を回復できる化合物は、副作用の少ない抗癌剤として期待される。

申請者は、慢性骨髄性白血病細胞 K562 細胞を赤芽球へと分化誘導する化合物を探索するアッセイ法を構築し、種々の海洋生物抽出エキスをスクリーニングした結果、海綿 *Dactylospongia elegans* から活性成分として smenospongine を含む数種の sesquiterpene aminoquinone 類を見出した。構造活性相関研究の結果、これら sesquiterpene aminoquinone の活性発現にはキノン骨格とアミノ基が重要であることを明らかにしている。 Smenospongine は K562 細胞に膜糖蛋白 glycophorin A の発現を亢進し、CIP/KIP family の Cdk inhibitor (CKI) である p21 の発現上昇を誘導し、細胞周期を G1 期で停止させることを明らかにした。

また、p53 非依存的に p21 の発現を誘導させる化合物は、多くの癌細胞の細胞周期を停止させ、無限増殖性を抑制できると考えられる。そこで、申請者は p53 非依存的に p21 の発現を誘導する化合物の探索に着手した。p53 ネガティブ細胞であるヒト骨肉腫MG63に、p21 promoter 遺伝子およびluciferase レポーター遺伝子を導入した細胞(MG63 luc^t) を用いるアッセイ系を構築し、種々の海洋生物抽出エキスをスクリーニングした結果、海綿 Aaptos suberitoides から活性物質として naphthyridine type のアルカロイド aaptamine を見出した。 Aaptamine は、野生型 MG63 細胞に対して細胞周期を G2/M 期で停止させ、p21 の発現を誘導した。 さらに、 aaptamine の p21 promoter の転写活性化作用には、p21 promoter のpromoter のpromoter

以上の研究成果は、は博士(薬学)の学位論文として充分価値あるものと認められる。