

Title	海綿由来プロモチロシン誘導体bastadin類の腫瘍血管新生阻害
Author(s)	趙, 碩煥
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45679
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 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	趙 碩 煥
博士の専攻分野の名称	博士 (薬学)
学位記番号	第 19428 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	海綿由来プロモテロシン誘導体 bastadin 類の腫瘍血管新生阻害
論文審査委員	(主査) 教授 小林 資正 (副査) 教授 田中 徹明 教授 今西 武 教授 松田 敏夫

論文内容の要旨

血管新生は、正常個体では創傷の治癒時や女性の性周期など限られた時にしか亢進しない現象だが、固形がん腫がある程度の大きさに達すると、血管新生促進物質を放出し周辺組織から血管を誘引し栄養分を獲得して増殖する。したがって、血管新生を選択的に阻害する物質は、正常細胞に毒性を示さず固形がんの成長を特異的に抑制することが出来ると考えられており、副作用が少ない新しい抗がん剤として期待されている。

そのような背景から、新しい抗がん剤として期待される血管新生阻害剤を探索する目的で、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) に対して選択的増殖抑制を示す化合物を底生海洋生物成分より探索した。ヒト咽頭上皮がん細胞 KB と HUVECs に対する増殖抑制試験を行い、HUVEC に対して選択的に増殖抑制を示す化合物の探索を行った。種々の底生海洋生物の抽出エキスについて検討し、活性の見られた海綿 *Ianthella basta* から、活性物質として bastadin 類を単離した。Bastadin 類は、大環状構造を有するプロモテロシン四量体であり、エーテルの架橋構造の違いから bastarane 骨格と isobastarane 骨格の 2 種に大別される。また、bastadin-3 は、大環状構造が開環した構造を有している。Bastadin 類に対して血管新生促進因子 VEGF または bFGF 依存性の条件下で増殖抑制活性実験を行った結果、bastarane 骨格を有する bastadin 類は他の細胞と比較して HUVECs に対して約 20~100 倍の選択的増殖抑制を示したのに対して、isobastarane 骨格を有する bastadin 類は、選択性の低下が見られた。この活性の低下は、両基本骨格間のコンフォメーションの違いに起因するものと考えられた。また、大環状構造が開環した bastadin-3 は、増殖抑制効果がさらに低下した。

さらに、強い作用を有し主成分である bastadin-6 を用い、HUVECs の管腔形成 (tube formation) 及び遊走性 (migration) の活性化に対する阻害活性を調べた結果、bastadin-6 は $0.1 \mu\text{M}$ 以上の濃度で 6 時間処置することで血管新生促進因子 VEGF 及び bFGF によって誘導される HUVECs の管腔形成を濃度依存的に阻害し、 $1 \mu\text{M}$ 、4 時間処置で VEGF によって誘導される HUVECs の遊走性も約 50% 阻害した。

また、マウス角膜法を用いて *in vivo* での bastadin 類の効果を検討した。マウス角膜に血管新生因子を含有するペレットを挿入し、5 日後に角膜に誘導された新生血管の有無により効果を判定した。その結果、ペレット挿入後 1 日目から 3 日目まで bastadin-6 を 100 mg/kg/day 腹腔内投与したマウスにおいては血管新生が完全に抑制されており、*in vivo* での bastadin 類の血管新生阻害作用が確認された。血管新生促進因子を活発に生産・分泌することが報告されているヒト扁平上皮癌細胞 A431 をヌードマウス皮内に移植し、移植後 1 日目から bastadin-6 を投与した群と 7 日

目から投与した群における抗腫瘍効果を評価した。その結果、両群ともに 100 mg/kg の bastadin-6 を一日おきに七回腹腔内投与したマウスにおいて抗腫瘍効果が確認され、体重減少などの毒性も見られなかった。

また、bastadin 類の腫瘍血管新生阻害活性における作用機序を明らかにする目的で、VEGF 受容体である VEGF-1、VEGF-2 を過剰発現させた NIH3T3-Flt-1 及び NIH3T3-KDR 細胞を用い、VEGF 刺激による自己リン酸化に対する bastadin-6 の効果を検討した。その結果、bastadin-6 は VEGF-1、VEGF-2 受容体の自己リン酸化を阻害しないことが明らかとなり、VEGF 受容体の活性化には影響を与えないことが確認された。一方、bastadin 類は癌細胞や他の正常細胞より低濃度で血管内皮細胞を細胞死に導くことから、bastadin 類の選択増殖抑制が HUVECs に対する apoptosis 誘導によるものであるかどうかを検討した。apoptosis 検出には、DNA 断片化を観察するための TUNEL 染色やクロモソーム分解酵素である caspases の活性化を用いた。その結果、bastadin-6 を HUVECs に作用させたところ 0.1 μ M 以上の濃度で TUNEL 陽性を示した。さらに、bastadin-6 は HUVEC に対して用量依存的に caspase 3 を活性化した一方、KB3-1 細胞に対しては 0.1-1 μ M 処理においては caspase 3 の活性化がまったく見られなかった。これらの結果から bastadin-6 は血管内皮細胞に対して選択的に apoptosis を誘導することが明らかになり、この作用が腫瘍血管新生を阻害し抗腫瘍効果を示す要因であると考えられた。さらに、bastadin 類の血管内皮細胞選択的な apoptosis 誘導に関与するターゲット分子を解明するために、bastadin 類のプロープ分子の設計・合成を検討した。Bastadin-6 より Br 基が 1 個少ない bastadin-5 を用い、フェノール性水酸基に、エステル結合を介して光親和性基と 125 I を導入した芳香環を結合させた RI 標識型フォトアフィニティープローブを設計し、一個のフェノール性水酸基に選択時にエステル化されたフォトアフィニティープローブ前駆体及び非放射性のフォトアフィニティープローブを得た。合成した非放射性プローブは HUVECs に対する選択的増殖抑制効果において、bastadin-5 に比較して選択性や増殖抑制活性の減弱が見られたが活性を維持しており、標的タンパクに対するアフィニティーを保持していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

固形がん腫はある程度の大きさに達すると、血管新生促進物質を放出し周辺組織から血管を誘引し栄養分を獲得して増殖する。血管新生は、正常個体では創傷の治癒時や女性の性周期など限られた時にしか亢進しない現象であることから、血管新生を選択的に阻害する物質は、副作用が少ない新しい抗がん剤として期待されている。

申請者は、新しい血管新生阻害剤を探索する目的で、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) に対して選択的増殖抑制を示す化合物を底生海洋生物成分より探索した。種々の底生海洋生物の抽出エキスをスクリーニングし、活性の見られた海綿 *Ianthella basta* から、活性物質として大環状構造を有するプロモチロシン四量体 bastadin 類を見出した。Bastadin 類は、他の細胞と比較して HUVECs に対して約 20~100 倍の選択的増殖抑制を示し、主成分である bastadin-6 は、血管新生促進因子 VEGF 及び bFGF によって誘導される HUVECs の管腔形成を濃度依存的に阻害し、VEGF によって誘導される HUVECs の遊走性も阻害した。また、マウス角膜法を用いて *in vivo* での効果を検討した結果、bastadin-6 は腹腔内投与したマウスにおいて血管新生を完全に抑制した。さらに、血管新生促進因子を活発に生産・分泌することが報告されているヒト扁平上皮癌細胞 A431 をヌードマウス皮内に移植し、抗腫瘍効果を評価した結果、bastadin-6 は顕著な抗腫瘍効果を示すことが確認された。

また、bastadin 類の腫瘍血管新生阻害活性における作用機序を解析した結果、bastadin-6 は VEGF-1、VEGF-2 受容体の自己リン酸化を阻害しないこと、血管内皮細胞に対して選択的に apoptosis を誘導することを明らかにし、この apoptosis 誘導作用が腫瘍血管新生を阻害し抗腫瘍効果を示す要因であると明らかにしている。

以上の研究成果は、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。