



Title	天然薬物由来の血管新生阻害物質の探索とその作用メカニズムの解析
Author(s)	林, 亜紗実
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57957
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、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

【17】	
氏名	林 亜紗実
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 23760 号
学位授与年月日	平成22年3月23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	天然薬物由来の血管新生阻害物質の探索とその作用メカニズムの解析
論文審査委員	(主査) 教授 小林 資正 (副査) 教授 藤岡 弘道 教授 宇野 公之 教授 田中 徹明

論文内容の要旨

がんは本邦における死因の第一位を占めている。これまでの抗がん剤の開発研究はがん細胞が正常細胞よりも活発に分裂するという性質を利用するものがほとんどであるが、正常細胞でも骨髄細胞、毛根細胞や粘膜細胞などのように活発に分裂を行っている細胞や組織に対して、同様の毒性を示し、副作用の大きな原因となってきた。

しかしながら、近年、がんに関する分子生物学の飛躍的な進歩により、抗がん剤の開発研究の流れは大きく変化しており、がん細胞のみが有する特徴を分子レベルで捉え、がん細胞特異的な代謝、シグナル伝達経路や微小環境を標的とする『がん分子標的治療薬』の開発が主流となっている。その中の一つに『血管新生を標的とする抗がん剤の開発』が挙げられる。

がん血管新生は、1) がん細胞が生産する血管新生促進因子が血管内皮細胞上のレセプターへ結合することによる血管内皮細胞の活性化、2) 血管内皮細胞から生産されるプロテアーゼによる基底膜の消化、3) 血管内皮細胞の増殖および遊走、4) 管腔形成の4段階を経て誘導される。これらの過程はそれが血管新生に重要な役割を担っていることから、いずれの過程を阻害しても血管新生は阻害されると考えられている。そして、新生血管からの栄養や酸素の獲得は、固形がんの増殖に不可欠であることから、血管新生を阻害する化合物はがん細胞特異的にその増殖を抑制することができる副作用の少ない薬剤となることが期待される。

このような中、現在まで数多くの血管新生阻害剤の臨床試験が行われ、近年本邦においても血管新生促進因子VEGFに対するモノクローナル抗体bevacizumab、VEGFレセプターのチロシンリン酸化活性を阻害するsorafenibやsunitinibが承認され、臨床で使用されている。しかしながら、これらの医薬品はいずれもVEGF由来のシグナル伝達を阻害するものであり、現在もなお作用メカニズムの異なる新しい血管新生阻害剤の創製が望まれている。

以上のような背景のもと、著者は新しい作用メカニズムを有する血管新生阻害剤のリード化合物創製を目的に、海洋由来微生物の培養抽出物や薬用植物の抽出エキスを探査源として、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)に対する選択的増殖抑制活性を指標にスクリーニングを行った。その結果、2002年三重県五ヶ所湾の海底土壤より分離したAspergillus fumigatus GF5株の培養抽出物および生葉セネガ *Polygala senega* のメタノール抽出エキスに、

HUVECs選択的増殖抑制活性を見出した。

まずGF5株の培養物を活性試験の結果を指標に分画精製を進め、活性成分として3種のセスキテルペンpyripyropenes A、BおよびDを単離した。さらに類縁化合物を精査した結果、pyripyropene J、KおよびLの3種の化合物を単離した。Pyripyropene A、BおよびDはHUVECsに対し、0.13~1.5 μMのIC₅₀値を示し、ヒト咽頭上皮がん細胞(KB3-1 cells)等3種のがん細胞に対するIC₅₀値と比較して、最大770倍以上の細胞種選択性を有していた。また前述の通り、がん血管新生では血管新生促進因子による血管内皮細胞の活性化の後、血管内皮細胞の遊走と管腔形成が誘導される。そこで、血管新生促進因子vascular endothelial growth factor (VEGF)の刺激によるHUVECsの遊走および管腔形成に与えるpyripyropene類の影響を検討したところ、pyripyropene Aは血管新生促進因子VEGF刺激によるHUVECsの遊走・管腔形成を阻害することを明らかにした。さらにMatrigel Plug Assay法および腫瘍移植モデルマウスでの評価により、血管新生阻害活性および抗腫瘍活性を有することを *in vivo* 評価においても明らかにした。

次にその作用メカニズムの解析を行った結果、pyripyropene Aは既存の血管新生阻害剤と異なり、VEGFレセプターの下流に位置するMAPKおよびPI3K経路に影響を与えたなかった。また既に報告されているpyripyropene AのAcyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) 阻害活性との関係性を検討するために、HUVECs等の各種細胞におけるACAT発現量と増殖抑制活性を比較したが、pyripyropene Aの各種細胞に対する増殖抑制活性とACAT発現量に相関は見られなかった。

一方、生葉セネガ *P. senega* の抽出エキスを活性試験の結果を指標に分画精製を進め、HUVECsに対し0.59~6.2 μMのIC₅₀値を示し、他の細胞と比較して最大100倍以上の細胞種選択性を有する5種のsenegasaponin類を活性成分として単離した。その中でも主成分であるsenegin IIIは、血管新生促進因子VEGFによって誘導されるHUVECsの遊走や管腔形成を阻害し、*in vivo* 評価においても血管新生阻害作用を示すことを明らかにした。さらに腫瘍移植モデルマウスを用いて検討した結果、抗腫瘍効果が確認された。続いて、血管新生因子VEGFのシグナル伝達経路に対するsenegin IIIの影響を検討したが、VEGFのシグナル伝達経路にsenegin IIIは影響を与えていないことが明らかになった。一方、senegasaponin類と同様にサボニンとして広く知られている人参サボニンのひとつであるginsenoside Rb1には内因性の血管新生抑制因子Pigment Epithelium-derived factor (PEDF)の生産を増加させ、血管新生阻害作用を示すことが報告されていることから、senegin IIIのPEDF産生への影響を検討した。その結果、senegin IIIはHUVECsのPEDF産生を増加させ、濃度依存的に細胞外に放出することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

近年、分子生物学の飛躍的な進歩により抗がん剤の開発研究の流れは大きく変化しており、がん細胞のみが有する特徴を分子レベルで捉え、がん細胞特異的な代謝、シグナル伝達経路や微小環境を標的とする『がん分子標的治療薬』の開発が主流となっている。申請者は、その中の一つの『血管新生』に注目して以下の研究を行なった。

がん血管新生は、1) がん細胞が生産する血管新生促進因子が血管内皮細胞上のレセプターへ結合することによる血管内皮細胞の活性化、2) 血管内皮細胞から生産されるプロテアーゼによる基底膜の消化、3) 血管内皮細胞の増殖および遊走、4) 管腔形成の4段階を経て誘導されるが、いずれの過程を阻害しても血管新生は阻害されると考えられている。また、新生血管からの栄養や酸素の獲得は、固形がんの増殖に不可欠であることから、血管新生を阻害する化合物はがん細胞特異的にその増殖を抑制することができる副作用の少ない薬剤となることが期待される。そこで申請者は、新しい作用メカニズムを有する血管新生阻害剤のリード化合物創製を目的に、海洋由来微生物の培養抽出物や薬用植物の抽出エキスを探索源として、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)に対する選択的増殖抑制活性を指標にスクリーニングを行った。その結果、2002年三重県五ヶ所湾の海底土壤より分離したAspergillus fumigatus GF5株の培養抽出物活性成分として3種のセスキテルペンpyripyropenes A、BおよびDを、また、生葉セネガ *Polygala senega* からは5種のsenegasaponin類をHUVECs選択的増殖抑制活性物質として見出した。

Pyripyropenes A、BおよびDは、ヒト咽頭上皮がん細胞 (KB3-1 cells) 等3種のがん細胞に対するIC₅₀値と比較して、HUVECsに対して最大770倍以上の細胞種選択性を有していた。また、pyripyropene Aは血管新生促進因子VEGF刺激によるHUVECsの遊走・管腔形成を阻害することを明らかにした。さらにMatrigel Plug Assay法および腫瘍移植モデルマウスでの評価により、血管新生阻害活性および抗腫瘍活性を有することをin vivo評価においても明らかにした。さらに、pyripyropene Aは既存の血管新生阻害剤と異なり、VEGFレセプターの下流に位置するMAPKおよびPI3K経路に影響を与ず、既に報告されているAcyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) 阻害活性との相関は見られないことを明らかにした。

一方、生薑セネガ*P. senega*の主成分であるsenegin IIIは、血管新生促進因子VEGFによって誘導されるHUVECsの遊走や管腔形成を阻害し、in vivo評価においても血管新生阻害作用を示すことを明らかにし、さらに腫瘍移植モデルマウスを用いて抗腫瘍効果を有することを明らかにした。さらに、senegin IIIは、VEGFのシグナル伝達経路に影響を与えず、人参サポニン ginsenoside Rb1と同じく、内因性の血管新生抑制因子Pigment Epithelium-derived factor (PEDF) の生産を増加させ、濃度依存的に細胞外に放出することを明らかにした。

以上の成果は、博士（薬学）の学位論文として十分価値のあるものと認められる。