



Title	抗がんリード化合物を海洋天然物に求めて
Author(s)	青木, 俊二
Citation	大阪大学低温センターだより. 2004, 127, p. 14-18
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/5851
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

抗がんリード化合物を海洋天然物に求めて

薬学研究科 青 木 俊 二 (内線8217)

E-mail: aoki @phs.osaka-u.ac.jp

1. はじめに

がん細胞は、細胞の分化過程に異常が生じ、未成熟で増殖が活発な段階で分化が停止した細胞である。したがって、この分化における基本的な制御機構の破綻に働きかけて分化の停止したがん細胞を成熟細胞へと分化させ、増殖停止を引き起こすことができる化合物（分化誘導物質）は、がん細胞の悪性形質を解除させ、結果的にがん細胞を特異的に死滅させることができると考えられている。このような背景から、私達は白血病細胞や神経芽細胞腫を用いて海洋生物由来のがん分化誘導物質の探索を行っている。

2. 慢性骨髄性白血病細胞 K562に対する分化誘導物質 smenospongine 類

慢性骨髄性白血病細胞 K562を赤芽球様に分化誘導する化合物を探索するアッセイ法（ヘモグロビン産生能を指標に探索）を構築し、海綿類の抽出エキスについてスクリーニングを行った。活性のみられたインドネシア産海綿 *Dactylospongia elegans* の MeOH エキスから分化誘導活性を有する smenospongine (1) など数種の sesquiterpene quinone 類 (1 ~ 5) を単離した。1 および 2 は、3 μ M の濃度で分化誘導活性を示し、K562細胞に対する分化誘導活性物質として知られている aphidicolin (15 μ M) より低い濃度で活性を示すことが明らかとなった¹⁾。一方、キノン骨格を持たない類縁体 4, 5 はまったく活性を示さなかったことより、キノン骨格が活性発現に必須であり

20位のアミノ基がメトキシ基に置換された 3 は、1 と比較して弱い活性しか示さなかったことから、20位のアミノ基が活性発現に重要であることが示唆された (図1)²⁾。また、1 を K562 細胞に作用させると 6 日後には赤芽球細胞膜上の特異的抗原である glycophorin A の発現が誘導されたこと

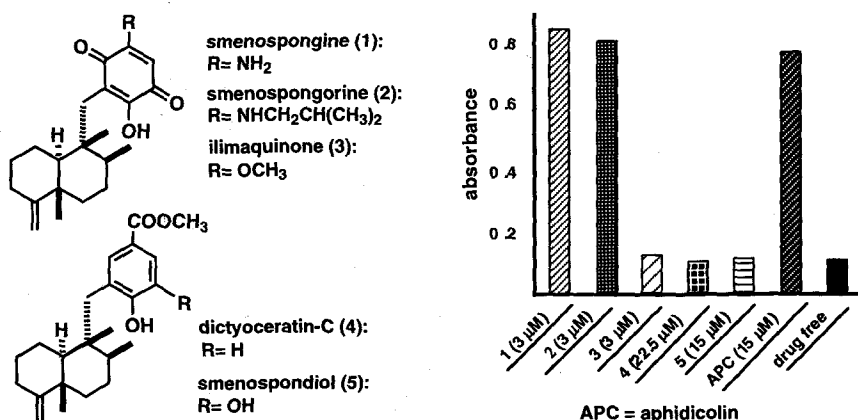


図1 Smenospongine 類の化学構造と赤血球への分化誘導活性。より低い濃度の化合物を作用させたとき、グラフの absorbance の値が大きいほど分化誘導活性が強いことを示す。

から、K562細胞の機能的分化が確認できた(図2)。さらに、**1**はG1チェックポイント制御因子であるCDK inhibitor, p21の発現上昇を誘導してK562細胞の細胞周期をG1期で停止させた(図3)。

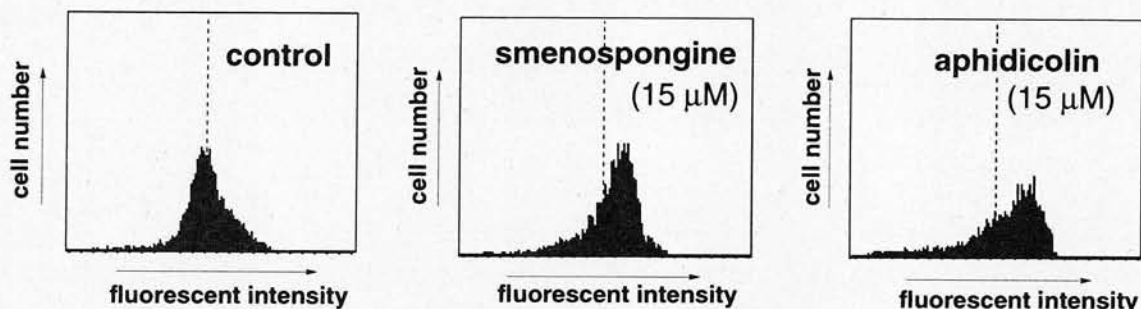


図2 Smenospongine を作用させたときの K562細胞における glycyphorin A の発現上昇。Glycyphorin は、赤血球膜上の特異的抗原であり、この発現上昇は、細胞の赤血球への分化を確認する指標となる。ヒストグラムの山がより右に移動しているほど、glycyphorin A の発現が上昇していると考えられる。

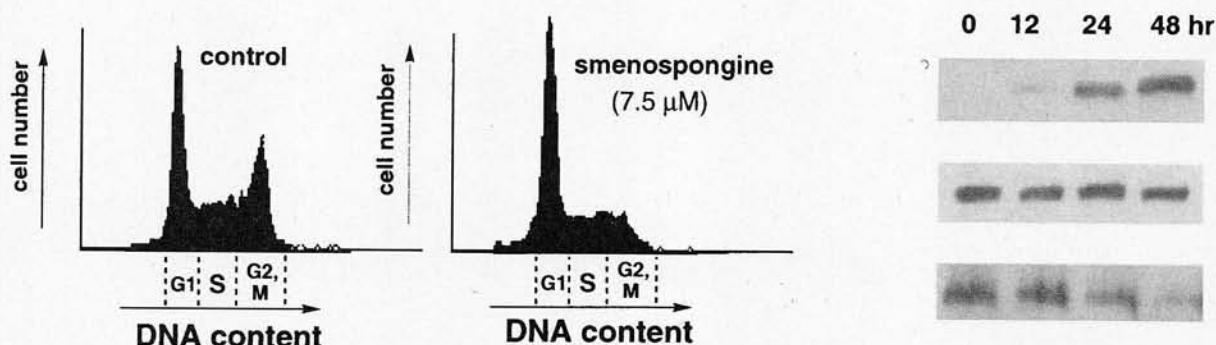


図3 Smenospongine を作用させたときの K562細胞の細胞周期解析。Smenospongine を作用させることによってヒストグラムの山がG1期に集積していることによって、K562細胞の細胞周期がG1期に停止していることがわかる。また、CDK inhibitor である p21の発現が上昇していることがわかる。

3. 神経芽細胞腫に対する分化誘導物質 lembhehylene 類の活性とその標的タンパク質

ラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12やマウス神経芽細胞腫 Neuro 2A のようながん細胞を正常な神経様細胞へと分化させる活性物質を探索するアッセイ系を用いて、種々の海洋生物エキスをスクリーニングし、インドネシア・レンベ島で採集した *Halictolona* 属海綿から、活性成分として新規長鎖アセチレン化合物 lembhehylene 類を単離してそれらの化学構造を決定した³⁾。さらに、lembhehylene 類の作用機序についても検討し、lembhehylene A (**1**)が Neuro 2A 細胞に対し、G1チェックポイント制御因子である p21の発現を誘導し、細胞周期をG1期で停止させることを明らかにしている⁴⁾。

i) Lembhehylene 類の構造活性相関

Lembhehylene 類が神経分化誘導作用を発現するための必須構造を明らかにするために、いくつかのアナログを設計・合成し、それらの活性を評価することとした。まず、lembhehylene A (**1**)から末端の1-yn-3-ol 構造が変換されたメチルエーテル体**2**、ケトン体**3**、末端アセチレンプロトンがメチル基へと変換されたアナログ**4**の3つのアナログを合成した。さらに脂肪鎖のタイプの異なる種々のアナログとしてオクタン酸、パルミチン酸あるいはリノレン酸を出発物質とする、

炭素数10のアナログ **5**、炭素数18のアナログ **6**、炭素数20でシスオレフィンを3つ含んだアナログ **7** 合成した。また、アナログ **6** とは3位水酸基の立体配置が逆のアナログ **8** を合成した (図4)。これらのアナログの Neuro 2A 細胞に対する神経突起伸展活性試験の結果を検討したところ、lembehyne A (**1**) が $1 \mu\text{M}$ で50%以上の細胞に対し神経突起伸展作用を示したのに対し、アナログ **2** ~ **4** のように末端の1-yn-3-ol 構造を変換したアナログは活性が完全に消失するか大幅に減弱し、この部分構造が活性発現に必須であることが明らかになった。また、脂肪鎖のタイプの異なるアナログのうち、C10のアナログ **5** は活性が完全に消失したが、C18、C20のアナログ **6**、**7** は **1** よりも強力な活性を示した。この結果から、脂肪鎖の長さは活性発現には重要であるが、脂肪鎖中の不飽和結合の有無はあまり影響を及ぼさないということが明らかになった。さらに、強い活性を示したアナログ **6** とは3位の水酸基の立体配置が逆のアナログ **8** は非常に弱い活性しか示さず、この部位の立体化学の重要性が明らかになった (図4)³⁾。

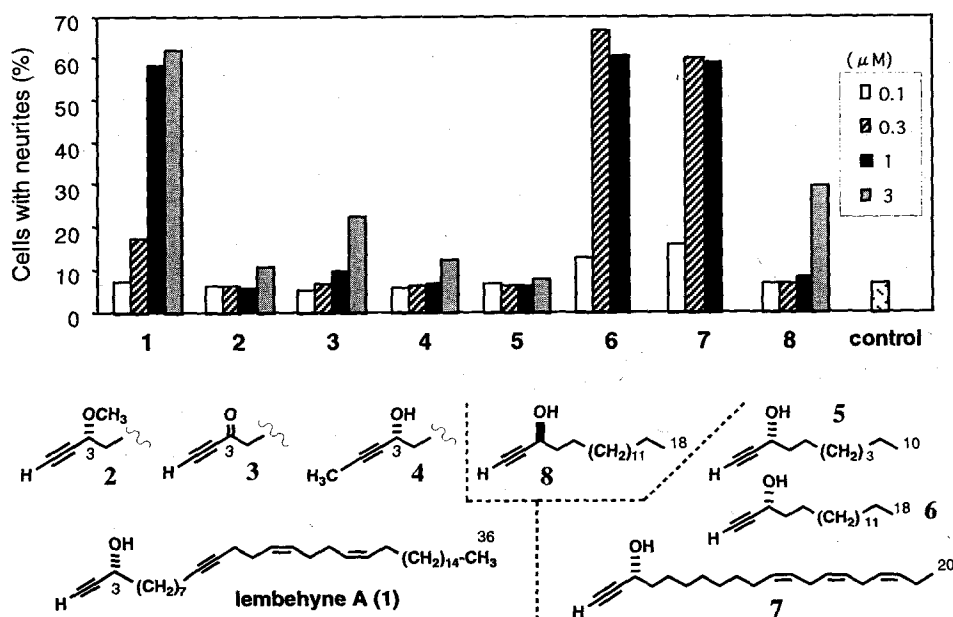


図4 Lembehyne 類の構造活性相関。グラフの値がより低濃度で大きい化合物が、活性が強いと考えられる。

ii) 光親和性放射性標識体を用いた lembehyne A 標的タンパクの標識⁵⁾

Lembehyne 類が、Neuro 2A 細胞に対し G1 チェックポイント制御因子である p21 の発現上昇を誘導して細胞周期を G1 期で停止させるという作用を有しており、また、化学構造が既存の分化誘導物質とは大きく異なることから、その作用機序に興味を持たれた。そこで、lembehyne A (**1**) の活性アナログから光親和性放射性標識体を合成し、標的タンパク質のラベル化を試みた。プローブ分子を Neuro 2A 細胞に直接投与して一定時間後に 366 nm の UV ランプを照射することにより細胞レベルで光親和性標識を行い、細胞を破碎して得た破碎液を SDS-PAGE で分離し、ゲル上の放射活性をオートラジオグラフィーにより検出した。その結果、分子量約 3 万のタンパク質が特異的にラベル化された⁵⁾。このラベル化は、プローブ分子の約 20~100 倍量の **3** あるいは活性アナログである **6**、**7** で細胞を前処理した場合には拮抗阻害されたが、不活性アナログである **5**、**8** で前処理した場合は拮抗阻害されなかった (図5)。また、既存の Neuro 2A 細胞に

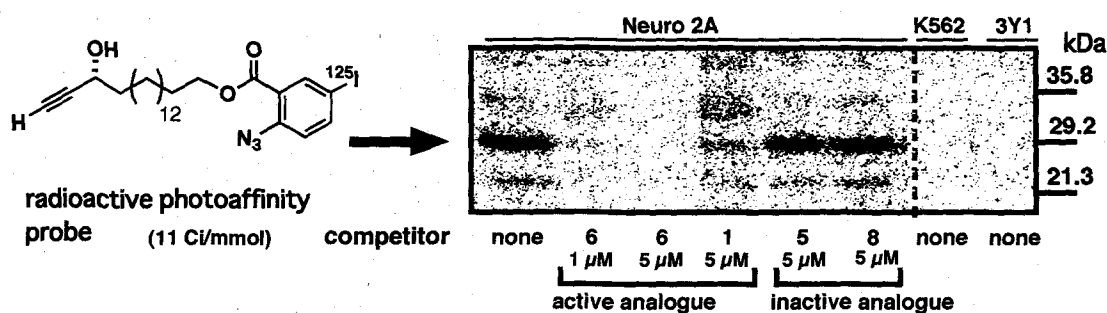


図5 Lembehyne A 光親和性放射性標識体による標的タンパク質のラベル化。

対する分化誘導物質である lactacystin、レチノイン酸、ガングリオシド GD1a、staurosporin、mevinolin で同様の前処理した場合には、このラベル化は阻害されず、検出されたタンパク質はこれら既存の分化誘導物質の標的タンパク質とは異なる可能性が考えられた。さらに同様の方法で、**1** が分化誘導作用を示さない K562 や正常繊維芽細胞 3Y1 に対する標的タンパク質のラベル化を試みたが、まったくこのタンパク質は検出されなかった。以上のことから、ラベル化された分子量約 3 万のタンパク質は lembehyne 類が Neuro 2A 細胞の分化を誘導する際に作用する標的タンパク質であり、この細胞の神経分化に関与する重要な因子である可能性が考えられた。

4. おわりに

海洋生物から単離される化合物の中には、その構造も生理活性も特異的で興味深いものが多くみられる。これらの化合物が、医薬品のシーズとなることが期待されると同時に、作用機序を詳細に解析することで、生命現象の未知の部分に光を当てる可能性があると考えられる。

参考文献

- 1) S. Aoki, D. Kong, K. Matsui, M. Kobayashi, *Anticancer Drugs*, **15**, 363-369 (2004).
- 2) S. Aoki, D. Kong, K. Matsui, M. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **15**, in press
- 3) a) S. Aoki, K. Matsui, K. Tanaka, R. Satari, and M. Kobayashi, *Tetrahedron*, **56**, 9945-9948 (2000).
b) S. Aoki, K. Matsui, H. Wei, N. Murakami, and M. Kobayashi, *Tetrahedron*, **58**, 5417-5422 (2002).
- 4) S. Aoki, K. Matsui, T. Takata, W. Hong, and M. Kobayashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 558-563 (2001).
- 5) S. Aoki, K. Matsui, T. Takata, and M. Kobayashi, *FEBS Lett.*, **544**, 223-227 (2003).

用語解説

1) 分化誘導

人体を構成する細胞は、もともと一つの受精卵を起源としており、ある段階まで分裂を繰り返した後に一時分裂を停止し、それぞれここの機能を持った分裂へと成熟する。この段階

を「分化」といい、この現象を誘導する物質を分化誘導物質という。がん細胞は、染色体異常が生じ、未分化で細胞分裂を繰り返す状態にある細胞と考えられる。

2) 慢性骨髄性白血病細胞 K562

血液がんの一種で、血液細胞の分化状態の初期段階でがん化した細胞。従って、本来の分化方向がまだ決定づけられておらず、分化誘導剤の刺激により、赤血球や白血球など様々な方向へと分化する潜在能力を持つ。

3) 細胞周期

細胞分裂が起こる一連の過程をいう。一般に、細胞周期は、G1, S, G2, M の四期に分けられ、それぞれの期には、細胞自身に異常が生じていないかどうかをチェックする機構（チェックポイント機構）が備わっている。もし、自身に異常が見知された際には、修復可能な場合には細胞周期を止めて修復を行い、修復不可能な場合には自身を自殺（アポトーシス）へと導き、異常を持つ細胞の分裂増幅を防ぐ。

4) CDK inhibitor

細胞周期においてブレーキの役目を果たす一連のタンパク質をいう。多くのがん細胞で CDK inhibitor の発現制御やタンパクそのものに異常が生じており、これが、がん細胞の細胞分裂が止まらなくなっている一因と考えられている。