The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	栄養飢餓環境選択的がん細胞増殖阻害物質biakamide類の合成研究と作用メカニズム解析
Author(s)	石田, 良典
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61696
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　石田 良典　　）	
論文題名	栄養飢餓環境選択的がん細胞増殖阻害活性物質 biakamide類の合成研究と作用メカニズム解析

がんは現在の日本人の死因第一位の疾患であり、2012年の予測データによれば、生涯のがん罹患率は約2人に1人と言われている。がんの治療法については世界中で精力的に行われており、その中でも体内で確実にがん細胞を殺す作用をもつ抗がん剤を使用した化学療法は強力な抗がん治療法の一つである。近年、抗がん剤の標的としてがん組織の微小環境が注目されており、がん細胞特有の環境を標的とすることで、副作用の少ない新たな作用メカニズムをもつ抗がん剤の創出が期待される。

がん細胞はその増殖の速さゆえに血管新生が追い付かず、局所的に低酸素、低栄養といった生存不利な環境に晒されているが、ストレス応答などによって自身の代謝系を変化させることで、このような過酷な環境下でも生存、増殖を続けることができると同時に、これらの耐性を発現したがん細胞は、化学療法や放射線療法といった抗がん治療法に対する抵抗性も獲得し、がん病態の悪性化に寄与することが知られている。そこで、がん組織特有にみられる、このグルコース飢餓環境選択的にがん細胞増殖阻害活性を有する化合物であれば、副作用の少ない新たな抗がんリード化合物になり得るとともに、不明な点の多いグルコース飢餓適応における責任分子の解明へとつながるツールとなることが期待できる。

以上の背景をもとに、著者の所属する研究室では、主な栄養源であるグルコース飢餓培養条件に適応したがん細胞のみに増殖阻害活性を示す化合物の探索研究を行い、副作用の少ない抗がんリード化合物の創出やがん細胞の低栄養環境適応機構の解明を目指している。アッセイ方法としては、ヒト膵臓がん細胞PANC-1を前培養した後、培地をグルコース含有培地(Glc 25 mM培地)、グルコース非含有培地(Glc 0 mM培地)にそれぞれ培地交換を行い、12時間培養することで各環境に細胞を適応させた。その後被験サンプルのエタノール溶液をそれぞれに添加し、12時間後の細胞生存率を、WST-8を用いた比色定量法により算出した。Glc 0 mM培地での増殖阻害率がGlc 25 mM培地での増殖阻害率を上回ったものをヒットサンプルとして、含有される活性成分を分離精製し、構造決定を行った結果、新規な活性物質として*Dysidea* sp. 海綿よりpolybrominated diphenyl ethersや*Xestospongia* sp.海綿より*N*-methylniphatyne Aを見出している。さらに、同スクリーニング系を用い、2005年にインドネシアのBiak島付近で採集された海綿*Petrosaspongia* sp.よりbiakamide A-Dと名付けた新規ポリケチド構造を有する微量活性物質が単離され、それらの平面構造が明らかにされた。最も活性の強かったbiakamide Cは、通常のPANC-1細胞培養条件であるGlc 25 mM培地での細胞増殖阻害率がIC_{50} > 30 μMであるのに対し、Glc 0 mM培地ではIC_{50} 0.6 μMの増殖阻害率を示し、これまでに当研究室で報告されている化合物に比べ最も強い活性と選択性を有していた。Biakamide類は2つの*N*-メチルアミドに由来する回転異性体の存在から複雑なNMRスペクトルを与えたが、最終的に50 ℃での温度可変NMR測定にてその平面構造を決定された。また、biakamide A, Bは2級水酸基を有していたことから、MTPAエステル化を行うことで改良Mosher法によりその絶対配置を*S*配置と決定された。しかし、4位および6位のメチル基の立体配置に関しては、その絶対配置を決定することが出来なかった。

微量活性成分であるbiakamide類の絶対構造の決定およびの化学合成による供給を目指して、文献既知である光学活性な合成素子を出発物質とすることで、同一の合成ルートにてbiakamide A-Dの4位および6位の各立体異性体計16種類を網羅的に不斉全合成し、NMRスペクトル、CDスペクトル、旋光度を天然物と比較解析することで、その絶対配置をそれぞれ(4*R*,6*S*)配置と決定した。その後、biakamide類の構造上、グルコース飢餓環境選択的がん細胞増殖阻害活性に重要な部位を特定する目的で、

biakamide類の各官能基を変換した化合物を合成し、構造活性相関を精査した。その結果、活性発現にはbiakamide類の全体的な構造が必須であるが、チアゾール含有アミド部位は検出タグ等を導入できる空間的許容性が高く、逆に末端アシル側鎖は活性発現に強く影響を与える可能性が示唆された。また、構造活性相関研究の過程で、天然物とほぼ同等の活性を有し、合成工程数、収率ともに劇的に改善された大量合成容易なアナログ分子を創出することに成功した。最後に、biakamide類が有する細胞増殖阻害活性のメカニズムを解析するために、biakamide Cを添加した細胞のライセートを用いたウエスタンブロッティングによる低栄養マーカーの挙動を確認したところ、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤であるantimycin Aやrotenoneと同様の性状を示した。そこで、biakamide Cの各種ミトコンドリア呼吸鎖複合体阻害活性を調べたところ、複合体Iに対して選択的な阻害活性を示した。また、構造活性相関で得られた情報をもとにbiakamide類の標的分子探索プローブを創出し、光親和性ラベル化とクリック反応を軸とした細胞内蛍光イメージング解析を行った結果、プローブ分子がミトコンドリアに集積する様子をとらえることが出来た。最終的にbiakamide類はミトコンドリアに集積し、呼吸鎖複合体Iの機能を阻害することによってそのがん細胞増殖阻害作用を示すと結論付けることができた。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　石田良典　）			
論文審査担当者		(職)	氏　名
	主 査	教授	小林資正
	副 査	教授	赤井周司
	副 査	教授	小比賀聡

論文審査の結果の要旨

がん細胞はその増殖の速さゆえに血管新生が追い付かず、局所的に低酸素、低栄養といった生存不利な環境に晒されているが、ストレス応答などによって自身の代謝系を変化させることで、このような過酷な環境下でも生存、増殖を続けることができると同時に、これらの耐性を発現したがん細胞は、化学療法や放射線療法といった抗がん治療法に対する抵抗性も獲得し、がん病態の悪性化に寄与することが知られている。そこで、がん組織特有にみられる、このグルコース飢餓環境選択的にがん細胞増殖阻害活性を有する化合物であれば、副作用の少ない新たな抗がんリード化合物になり得るとともに、不明な点の多いグルコース飢餓適応における責任分子の解明へとつながるツールとなることが期待できる。

以上の背景をもとに、石田君の所属する研究室では、主な栄養源であるグルコース飢餓培養条件に適応したがん細胞のみに増殖阻害活性を示す化合物の探索研究を行い、海綿*Petrosaspongia* sp. からbiakamide A-Dと名付けた新規ポリケチド構造を有する微量活性物質が単離され、それらの平面構造が明らかにされた。Biakamide類は2つのN-メチルアミドに由来する回転異性体の存在から複雑なNMRスペクトルを与えたが、最終的に50 ℃での温度可変NMR測定にてその平面構造を決定した。また、biakamide A, Bは2級水酸基を有していたことから、改良Mosher法によりその絶対配置をS配置と決定された。しかし、4位および6位のメチル基の立体配置に関しては、立体配置を決定することが出来なかった。

石田君は、biakamide類の絶対立体構造の決定および合成的供給を目指して、文献既知の光学活性な立体異性体をそれぞれ出発物質とすることで、同一の合成ルートにてbiakamide A-Dの4位および6位の各立体異性体計16種類を網羅的に不斉全合成し、NMRスペクトル、CDスペクトル、旋光度を天然物と比較解析することで、その絶対配置をそれぞれ(4R,6S)配置と決定した。さらに、biakamide類のグルコース飢餓環境選択的がん細胞増殖阻害活性に重要な部位を特定する目的で、biakamide類の各官能基を変換した化合物を合成し、構造活性相関を精査した。その結果、活性発現にはbiakamide類の全体的な構造が必須であるが、チアゾール含有アミド部位は検出タグ等を導入できる空間的許容性が高く、逆に末端アシル側鎖は活性発現に強く影響を与える可能性が示唆された。また、構造活性相関研究の過程で、天然物とほぼ同等の活性を有し、合成工程数、収率ともに劇的に改善された大量合成容易なアナログ分子を創出することにも成功した。

さらに、biakamide類が有する細胞増殖阻害活性のメカニズムを解析するために、biakamide Cを添加した細胞のライセートを用いたウエスタンブロッティングを行い、低栄養マーカーの挙動を確認したところ、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤であるantimycin Aやrotenoneと同様の性状を示した。そこで、biakamide Cの各種ミトコンドリア呼吸鎖複合体阻害活性を調べたところ、複合体 I に対して選択的に活性を示した。また、構造活性相関で得られた情報をもとにbiakamide類の標的分子探索プローブを創出し、光親和性ラベル化とクリック反応を軸とした細胞内蛍光イメージングを行った結果、プローブがミトコンドリアに集積する様子をとらえることが出来たので、最終的にbiakamide類はミトコンドリアに集積し、呼吸鎖複合体 I の機能を阻害することによってそのがん細胞増殖阻害作用を示すと結論づけた。

以上の成果は、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。