

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：34419
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K05855
研究課題名(和文) Dermcidin を標的とした薬剤耐性がんおよび皮膚がん選択的抗がん剤の開発

研究課題名(英文) Study on anti-cancer agents against drug resistant and melanoma cells, targeting dermcidin

研究代表者
福田 隆志 (Fukuda, Takashi)
近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：30348586
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、dermcidin (DCD) を標的とした抗がん活性物質および新規の機能性成分を海洋由来微生物の培養液中より見出すことを目的に行なった。その結果、3年間で3種6成分の新規機能性分子を報告した。この内、DCD 阻害活性物質である seriniquinone (SQ) の構造変換体を利用した新規化合物の作成では、SQ よりも溶解性が向上し、かつメラノーマ選択性が同等もしくは向上した3つの化合物の作成に成功した。これらから得られた構造活性相関の知見は、DCD 阻害剤の医薬品としての発展の一助となると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がん治療における薬剤耐性の問題を解決することは急務である。近年、抗菌ペプチドである DCD が薬剤耐性に関与していることが報告され注目を浴びているが、その詳細なメカニズムは未だ判っていない。今回 SQ の構造変換体を用いて複数の新規化合物の取得に成功した。これらはいずれもメラノーマ細胞に対して選択的に活性を示したことから、SQ と同様に DCD を標的にしていると予想される。よって、この未解明な DCD の働きを解明する上で重要な阻害物質を複数取得できたことは、学術的意義が大きい。また、複数の新規物質を見出したことより、新規機能性物質の探索源として海洋由来微生物の有用性が改めて示された。

研究成果の概要(英文)：In this research, we searched for anti-cancer agents targeting dermcidin and new active compounds from marine microorganisms. We identified 6 new compounds, finally. About the biological transformation of seriniquinone (SQ), we succeeded to get new 3 analogs (NeoSQs) which showed better solubility and selectivity against melanoma cells than SQ, respectively. These studies will lead to development of pharmaceutical research of DCD inhibitors.

研究分野：天然物化学

キーワード：抗がん活性物質 DCD 阻害活性 海洋微生物 機能性分子

1. 研究開始当初の背景

近年がんの治療は、分子標的治療薬の登場により飛躍的に進歩した。分子標的薬は、対象の標的を有するがんには非常に高い選択性と効果を示すため、続々と新薬が承認されている。しかし、分子標的薬を用いた治療が長引くにつれ薬剤耐性化したがんが生ずること、加えてそれらがさらに悪性度の高いがんへと変貌する可能性があることが判明し、新たな問題となっている。がんの薬剤耐性化メカニズムに関しては、薬剤排出ポンプの過剰発現や薬剤と標的の親和性の低下、さらにはがん遺伝子そのものの変異など幾つか報告されているが、未だ根本的な解決方法は見出されていない。そのような中、2012年にある種タンパク質 *dermcidin* (DCD) が、抗がん剤に対する抵抗性やがんの転移に関与することが報告され、新しい薬剤開発の標的として注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 新しい抗がん活性物質 (DCD 阻害活性) の探索、(2) 発見した機能性分子の生化学的研究 (作用機序解析) (3) これまでに発見した DCD 阻害活性物質 *seriniquinone* の創薬に向けた基盤研究、および (4) 本申請研究過程で発見される様々な新規物質の機能解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新しい抗がん活性物質 (DCD 阻害活性) の探索

本研究では、特殊環境より分離した微生物資源から、Malme-3M 細胞 (ヒト悪性黒色腫) および Jurkat 細胞 (ヒト T 細胞白血病) を用いて Malme-3M 細胞のみに抗がん活性を示す培養液を選択した。活性評価は WST-1 試薬を用いて評価する。選択された培養液は UFLC などを用いてその生産物を比較しながら、機能性分子の特定を進めた。

(2) 発見した機能性分子の生化学的研究 (作用機序解析)

細胞間における活性の差を考慮に入れながら、その作用機序の解明を行った。また、セルアナライザーを利用し、殺細胞活性のみならず細胞周期への影響も考慮して進めた。

(3) DCD 阻害活性物質 *seriniquinone* の創薬に向けた基盤研究

① SQ の活性増強物質の探索

活性を示さない濃度の SQ (25nM) を含む培地および SQ を含まない培地で Malme-3M 細胞を培養し、サンプルを添加することで SQ を含む培地でのみ抗がん活性を示すサンプルを選択した。

② SQ の溶解性の向上

SQ の欠点である溶解性の低さを解決するため、微生物変換を利用した SQ 構造変換体の作成を試みた。あらかじめ SQ (0.001%) を添加した培地に海洋由来微生物を植菌、振盪培養後、HPLC を用いて SQ の溶出時間の変化を調べた。その後 SQ のピーク面積が減少し、代わりに新たなピークが現れた菌株を選択し、その物質の特定を行なった。

(4) 様々な新規物質の機能解明

本研究過程で、付随的に発見された新規化合物について、その機能解析を進めた。

4. 研究成果

(1) 新しい抗がん活性物質 (DCD 阻害活性) の探索

海洋由来微生物を中心に約 3000 サンプル (年間 1000 サンプル) の評価を行い、目的の活性物質の取得を進めた。その結果、2 種の *geldanamycin* 類、*butenolide*、*chromomycin A3*、*tubercidin*、*toyocamycin* などの既知物質を、抗がん活性物質として同定した。また、沖縄の海底土壌より得られた *Streptomyces* sp. OPMA00631 株からは、新規物質 *2-epi-anthracyclin* とその類縁体 2 種類を単離した。(図 1)

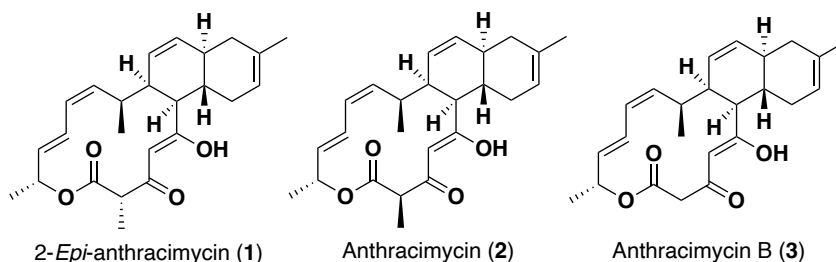


図 1 Anthracyclin 類

(2) 発見した機能性分子の生化学的研究 (作用機序解析)

単離した anthracimycin 類に関して、抗がん活性および細胞周期に対する影響を評価した。その結果、2-*epi*-anthracimycin は Jurkat 細胞に対し 50 μ M で抗がん活性を示した。しかし Malme-3M 細胞に対しては 100 μ M でも活性を示さなかった。よって DCD には直接関与しない分子と予想された。また Jurkat 細胞に対する細胞周期への影響を評価した結果、7.8 μ M で細胞周期を G1 に停止させる活性が確認された。(図 2) 2 位のメチル基の立体の違いにより、細胞周期への影響が変わることは興味深い。また現在、anthracimycin は新しい抗 MRSA 薬として注目されており、今回の類縁体の発見は更なる研究の一助になると考えられる。

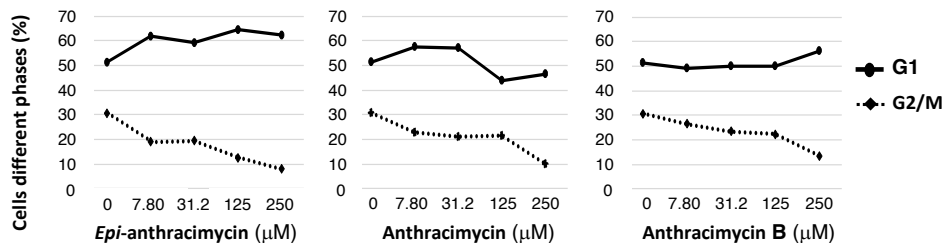


図 2 細胞周期に対する影響

(3) これまでに発見した DCD 阻害活性物質 seriniquinone の創薬に向けた基盤研究

① SQ の活性増強物質の探索

今回実施した研究内では、増強活性物質を見出すことはできなかった。引き続きスクリーニングを継続する予定。

② SQ の溶解性の向上

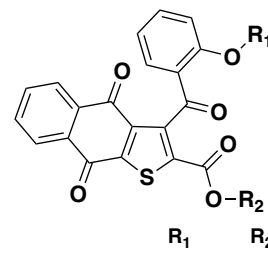
スクリーニングの結果、東京湾由来放線菌 *Streptomyces albobrisesolus* OM27-12 株が SQ の構造を変換することが判明した。そこで SQ の変換能力が見出された OM27-12 株を用いて構造変換体 (NeoSQ) の大量作成を進め、最終的に約 50 mg の NeoSQ の取得に成功した。なお構造は、各種 NMR データおよび X 線構造解析より、左右にあるキノン構造の片方のみが開環し、カルボキシ基とフェノール性水酸基となった新規骨格構造であると決定した (図 3)

得られた NeoSQ を基にさらに有機合成的に 3 種の誘導体を作成し、それらすべての活性および DMSO に対する溶解性を評価した。その結果、NeoSQ (1) の溶解性は SQ のそれと比べ大幅に改善された (100 倍の向上) しかし、同時に抗がん活性は低下する結果となった。(表 1) また、誘導体 3 及び 4 では溶解性の向上 (10~50 倍) とともに皮膚ガン選択性の向上 (SI 値 82~86) も確認された。(表 1) 溶解性および活性において SQ よりも扱いやすい化合物の取得に成功したといえる。

現在までに得られている NeoSQ 関連化合物の構造活性相関の結果を図 4 にまとめた。活性の強弱はヒドロキシ基、活性の選択性はナフトチオフェン、溶解性はカルボキシ基が重要であることが判明した。

これらの知見は、NeoSQ を母核とした誘導体合成を進めることで、抗がん剤として最適な SQ 誘導体の提案が可能であることを示している。今後もこの知見に基づいた有機化学的な誘導体作成 (リンカーを用いた二量体化など) を進める予定である。以上の結果は *The Journal of Antibiotics* に掲載され、その掲載号のハイライトに選ばれた。

また最近、別の海洋微生物による新たな構造変換体の作成を確認した。今後はその構造、活性および溶解性の確認を進める予定である。



	R ₁	R ₂
Compound 1	H	H
Compound 2	H	CH ₃
Compound 3	CH ₃	CH ₃
Compound 4	COCH ₃	H

図 3 化合物の構造

表 1 化合物の生物活性と溶解性

Compound	IC ₅₀ (μ M)			
	Malme-3M	Jurkat	SI ^a	Solubility ^b
Seriniquinone	0.17	8.7	51	0.1
1	15	317	21	10
2	5.0	239	48	5.0
3	1.4	115	82	1.0
4	2.6	223	86	5.0

^a SI (selective index) = IC₅₀ for Jurkat / IC₅₀ for Malme-3M

^b Solubility = mg / DMSO (1 ml)

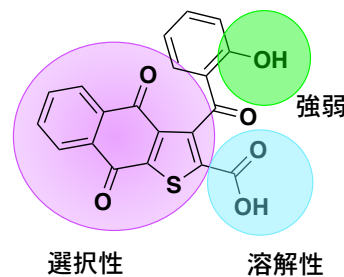


図 4 NeoSQ の構造活性相関

(4) 様々な新規化合物の機能解明

Nectriatide

東京都の土壌より分離された *Nectriaseae* sp. BF-0114 株の培養液中より新規物質 nectriatide を単離した。(図 5) 本化合物は、抗がん活性は示さなかったが、既存薬剤の活性増強分子のスクリーニングで、抗真菌剤アムホテリシン B の活性を最大で 16 倍増強した。本知見は *Journal of Natural Products* に掲載されその掲載号の表紙に選抜された。

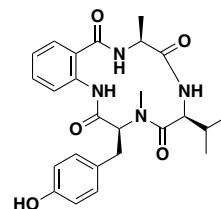


図 5 Nectriatide

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishida Kohei, Tanaka Teruki, Nagai Kenichiro, Furuichi Yoshimasa, Terahara Takeshi, Ando Masashi, Tsukamasa Yasuyuki, Fukuda Takashi	4. 巻 75
2. 論文標題 New dihydronaphthothiophene derivatives by the biological transformation of seriniquinone using marine-derived actinomycete <i>Streptomyces albogriseolus</i> OM27-12	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 9～15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-021-00484-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Konya Miyuki, Shimoyama Kenta, Arima Shiho, Fukuda Takashi, Uchida Ryuji, Tomoda Hiroshi, Nagamitsu Tohru	4. 巻 22
2. 論文標題 Synthesis and Absolute Configuration of Habiterpenol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 5131～5134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.orglett.0c01736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda Takashi, Nagai Kenichiro, Kanamoto Akihiko, Tomoda Hiroshi	4. 巻 73
2. 論文標題 2-Epi-anthracimycin, a new cytotoxic agent from the marine-derived actinomycete <i>Streptomyces</i> sp. OPMA00631	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 548～553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-020-0309-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda Takashi, Nagai Kenichiro, Yagi Akiho, Kobayashi Keisuke, Uchida Ryuji, Yasuhara Tadashi, Tomoda Hiroshi	4. 巻 82
2. 論文標題 Nectriatide, a Potentiator of Amphotericin B Activity from <i>Nectriaceae</i> sp. BF-0114	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2673～2681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.8b01056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田 晃平、田中 光樹、長井 賢一郎、寺原 猛、安藤 正史、塚正 泰之、福田 隆志
2. 発表標題 メラノーマ選択的抗がん活性化化合物 seriniquinone の微生物変換を利用した構造変換体の作成に関する研究
3. 学会等名 第 142 回日本薬学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 虎太郎、李 大葵、福田 隆志、内田 龍児、供田 洋、長光 亨
2. 発表標題 Tanzawaic acid A の全合成
3. 学会等名 第 142 回日本薬学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関 怜子、大城 太一、福田 隆志、内田 龍児、供田 洋
2. 発表標題 真菌 <i>Talaromyces cellulolyticus</i> BF-0307 株が生産する新規 SOAT 阻害剤 celludinone 類に関する研究
3. 学会等名 第 63 回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 雪乃、長井 賢一郎、小林 啓介、福田 隆志、供田 洋
2. 発表標題 真菌由来 nectriatide の合成中間体を示す抗真菌剤 amphotericin B 活性 増強作用
3. 学会等名 第 140 回 日本薬学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------