

天然物由来のがん治療薬シーズの探索と標的分子の機能解析

青木 俊二

大阪大学大学院薬学研究科

Searching for New Candidates for Cancer Chemotherapy from Natural Products and Analysis of Those Target Molecules

Shunji Aoki

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Yamada-oka 1-6, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

(Received April 12, 2004)

As a part of our study of biologically active substances from marine organisms, we have been searching for new candidates for cancer chemotherapy. We isolated a C_{36} linear acetylene alcohol named lembehyne A as a neuronal differentiation inducer against neuroblastoma cells. Furthermore, we synthesized a radioactive photoaffinity probe of lembehyne A and succeeded in the specific photolabeling of a protein of Mr 30 kDa as the target protein for lembehyne A.

On the other hand, multidrug resistance (MDR) in tumor cells have been recognized as one of major obstacles to successful cancer chemotherapy. Overexpression of membrane glycoprotein (*e.g.* P-glycoprotein, MRP1) that is believed to function as an energy-dependent efflux pump, is observed in MDR tumor cells. We started the search for substances that would reduce MDR in tumor cells and found agosterol A from a marine sponge of *Spongia* sp. as a reversing substance to both P-gp and MRP1-mediated MDR. Furthermore, we synthesized a radioactive photoaffinity probe of agosterol A, to try to investigate the function of MRP1.

Keywords: differentiation inducer, lembehyne A, photoaffinity probe, MDR, agosterol A, MRP1

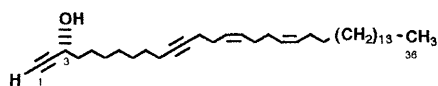
1) がん分化誘導物質の探索

がん細胞は、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、著者は、慢性骨髄性白血病細胞 K562 やマウス神経芽細胞腫 Neuro 2A のようながん細胞を正常様細胞へと分化させる低分子活性物質を探索するアッセイ系を用いて、海綿などの海洋生物や植物の抽出エキスから分化誘導物質を探索しており、これまでに K562 細胞を赤芽球へと分化誘導

するセスタテルペン PHC¹⁾やセスキテルペンキノン smenospongine²⁾、K562 細胞をマクロファージへと分化誘導するアルカロイド hymenialdisine やマクロリド misakinolide、Neuro 2A 細胞に対する分化誘導物質として長鎖アセチレン化合物 lembehyne 類³⁾やアルカロイド labuanine A⁴⁾などを活性物質として単離している。

神経分化誘導物質 lembehyne 類の活性

インドネシア、レンベ島で採集した *Haliclona* 属海綿から、Neuro 2A 細胞に対する分化誘導物質として新規長鎖アセチレン化合物 lembehyne 類を単離し、それらの化学構造を決定した³⁾。Lembehyne A (**1**) は $1 \mu\text{M}$ の濃度で投与後、48 h で 50%以上の Neuro 2A 細胞を bipolar 型の神経突起をもつ神経様細胞へと誘導した (Fig.1)。また、**1** は $3 \mu\text{M}$ の濃度でラット副腎褐色細胞



lembehyne A (1)

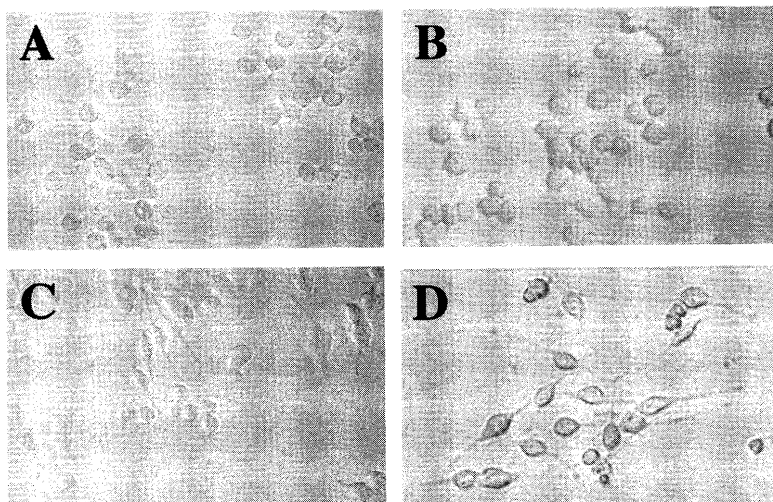


Fig. 1. Photomicrographs of lembehyne A (LB-A)-induced morphological changes in Neuro 2A cells

A: control-24 h; B: control-48 h; C: LB-A (1 μ M)-24 h; D: LB-A (1 μ M)-48 h

腫 PC12 の神経突起伸展も誘導したが、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に対しては誘導作用を示さなかった。また、**1** は Neuro 2A において分化マーカーである細胞内アセチルコリンエステラーゼ活性を濃度依存的に上昇させ、Neuro 2A を形態だけでなく機能的にも神経様細胞へと分化させていることも明らかとなった (Fig.2)。細胞分化は、細胞周期と密接に関連していることが報告されている⁵⁾。そこで、**1** が Neuro 2A の細胞周期にどのような影響を及ぼすか検討するため、フローサイトメトリーによる解析を行ったところ、**1** は Neuro 2A の細胞周期を G1 期で停止させることが明らかとなった (Fig.3)⁶⁾。

Lembehyne 類の構造活性相関

Lembehyne 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、lembehyne 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

レフィンを含む 3 つのアナログ **7** を合成した。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 (Fig. 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 μ 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、3 位の立体化学の重要性が明らかになった (Fig. 4)⁷⁾。

Lembehyne 類の標的タンパクのラベル化

さらに、**1** の化学構造が既存の分化誘導物質とは大きく異なりその作用機序に興味を持たれたことから、**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。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 (Fig. 5)⁸⁾。このラベル化は、**1** あるいは活性アナログである

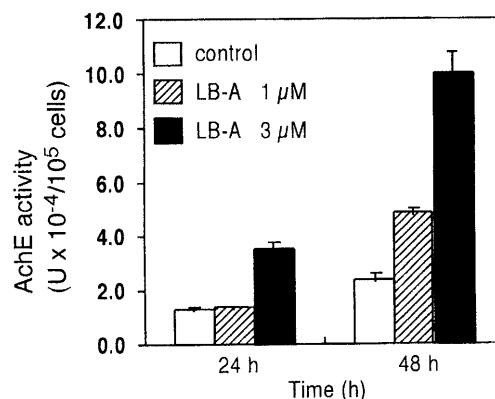


Fig. 2. Effect of lembehyne A (LB-A) on the acetylcholinesterase (AChE) level of Neuro 2A cells

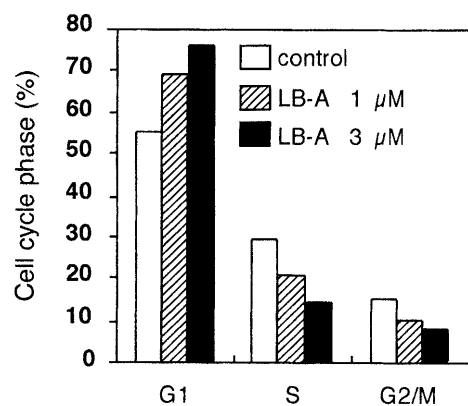


Fig. 3. Action for the cell cycle of Neuro 2A cells by lembehynes A (LB-A)

6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。また、既存のNeuro 2A細胞に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, 3Y1細胞を用いてラベル化を試みたが、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lembehynes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。

2) がん多剤耐性克服物質の探索

がん細胞が化学構造や作用機序の関連しない複数の抗がん剤に対して耐性を示すががん多剤耐性は、がん化学療法の大きな障害になっている。がん細胞の耐性獲得機構としては、いくつかの要因が知られているが、中でもP-glycoprotein (P-gp)⁹⁾や multidrug resistance associated protein (MRP1)¹⁰⁾といった膜タンパク質を細胞膜上に過剰発現し、抗がん剤を細胞外へ排出することにより耐性を獲得する機構が注目されている。このような背景から、著者は、これらの薬剤排出膜タンパク質を過剰発現する多剤耐性がん細胞を用いた阻害剤探索のアッセイ法を構築し、それら膜タンパク質に特異的に作用する阻害物質を探索している。これまでに、P-gpの阻害物質として大環状アルカロイド araguspogine 類、ジテルペン brianthein A¹¹⁾やセンブラノイド、ペプチド kendarimide A¹²⁾などを単離しており、さらに、P-gpだけでなくMRP1も低濃度で阻害することができるステロイド agosterol 類^{13, 14)}を単離構造決定している。

Agosterol A の多剤耐性克服作用

三重県英虞湾で採集した *Spongia* 属海綿から主活性

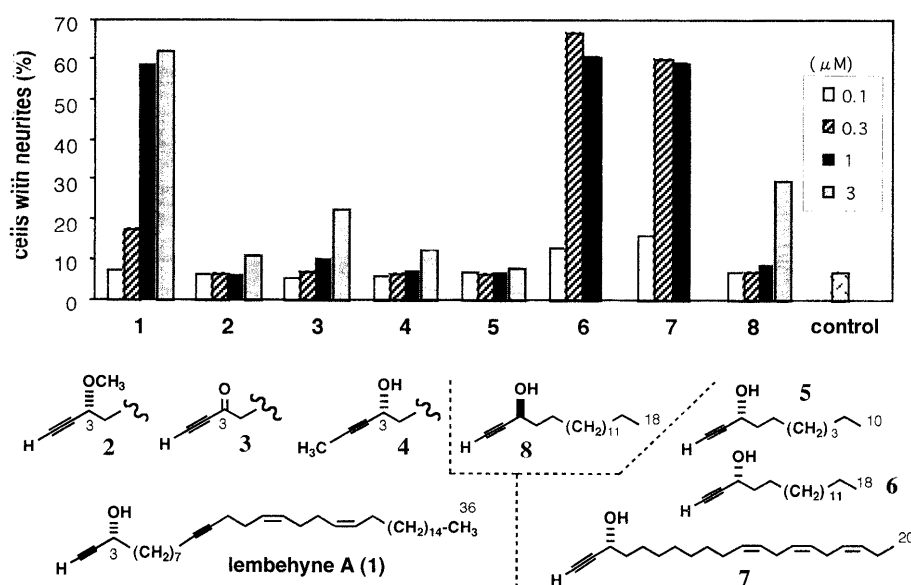


Fig. 4. Neuritogenic activity of lembehynes and their analogues

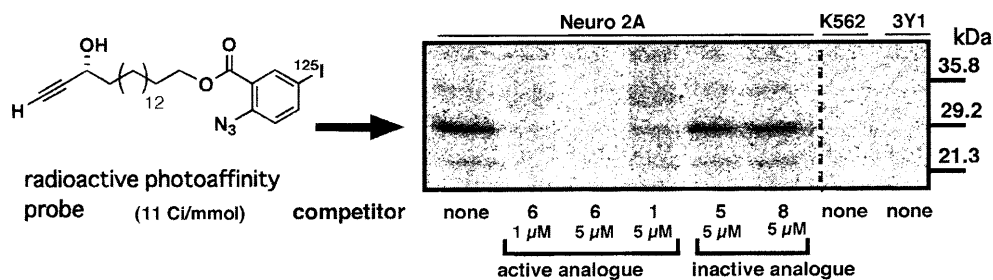
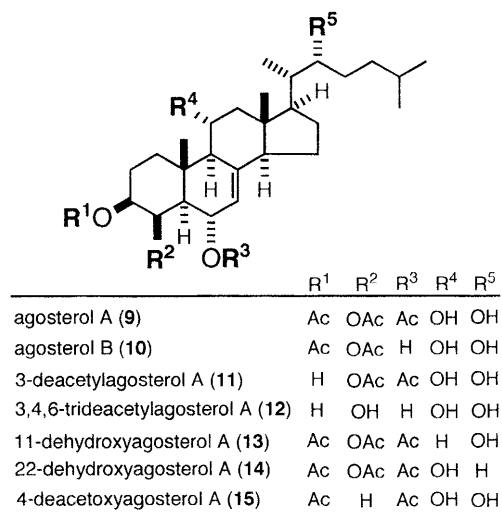
Fig. 5. *In situ* photoaffinity labeling of lembhyne-binding protein

Fig. 6. Chemical structures of agosterol A and its analogs

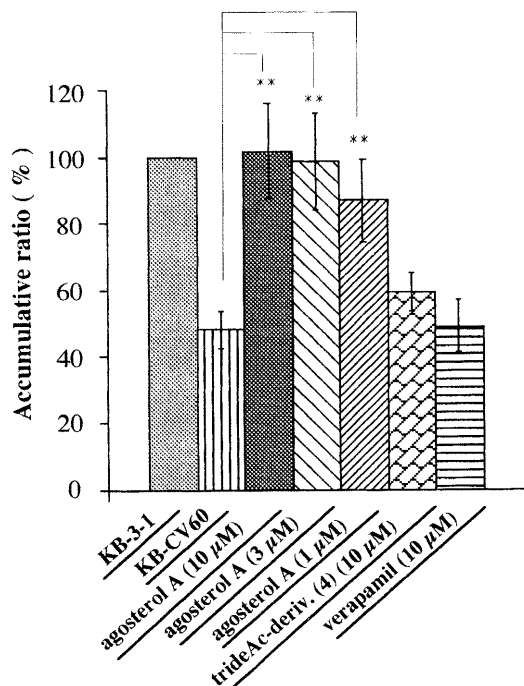


Fig. 7A. Effects of agosterol A on accumulation of vincristine in KB-CV60 cells

Columns represent ($\pm$ SE) of triplicate determinations. Differences between groups were tested by Dunnett test (** P <0.01).

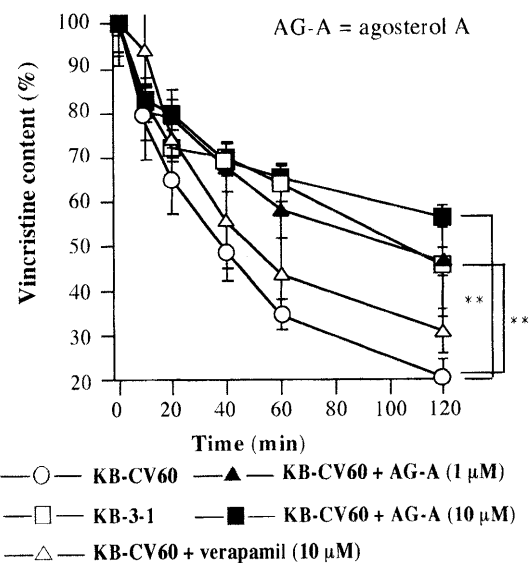


Fig. 7B. Efflux of the accumulated vincristine from KB-3-1 cells and KB-CV60 cells

Points represent ($\pm$ SE) of triplicate determinations. Differences between groups were tested by Dunnett test (** P <0.01).

物質として新規ステロールアセテート agosterol A (9) を単離し、その化学構造を明らかにした (Fig. 6)¹³⁾.

まず、P-gp を過剰発現する多剤耐性ヒト咽頭上皮がん細胞 KB-C2 株¹⁵⁾および MRPI を過剰発現する KB-CV60 株¹⁶⁾の2種類の多剤耐性がん細胞を用い、細胞内の抗がん剤蓄積濃度および細胞外への抗がん剤排出に対する9の作用を検討した。多剤耐性がん細胞は、過剰発現した薬剤排出タンパク質の働きによって細胞内の抗がん剤蓄積濃度が減少しており、また細胞外への抗がん剤排出が亢進しているが、9を抗がん剤と共存させることによって細胞内の抗がん剤蓄積濃度は回復し、過剰な薬剤排出は抑制された (Fig. 7)。これらの

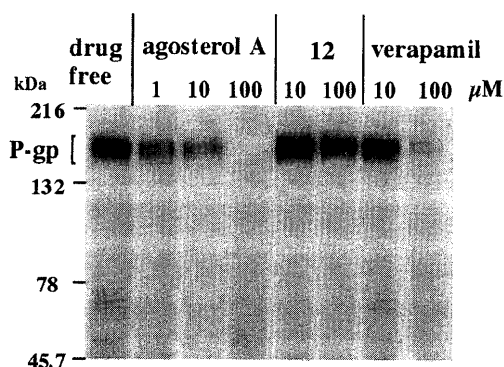


Fig. 8. Inhibition of [^3H]azidopine photolabeling to P-gp by agosterol A

Membrane vesicles prepared from KB-C2 were incubated with [^3H]azidopine in the presence of agosterol A.

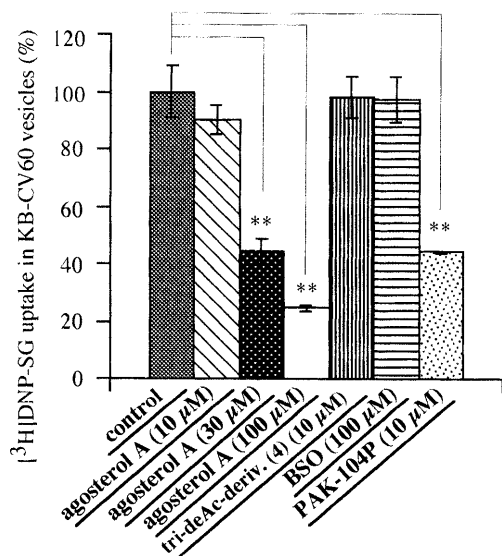


Fig. 9. Effect of agosterol A on ATP-dependent DNP-SG uptake in membrane vesicles prepared from KB-CV60 cells

Columns represent ($\pm$ SE) of triplicate determinations. Differences between groups were tested by Dunnett test (** $P < 0.01$).

結果から、**9**は多剤耐性がん細胞に過剰発現する薬剤排出膜タンパク質に作用し、その薬剤排出を阻害して細胞内抗がん剤濃度を高めることが示唆された¹⁷⁾。さらに、**9**の薬剤排出膜タンパク質に対する直接作用について検討した。P-gpの基質として知られる azidopine と P-gp の結合に対する **9** の作用を KB-C2 株から調製した膜小胞を用いて検討した。Fig. 8 に示すように、 ^3H]azidopine によって標識される 170 kDa の P-gp の

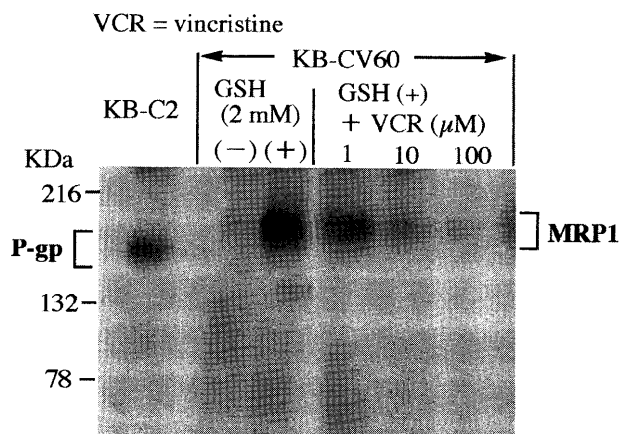
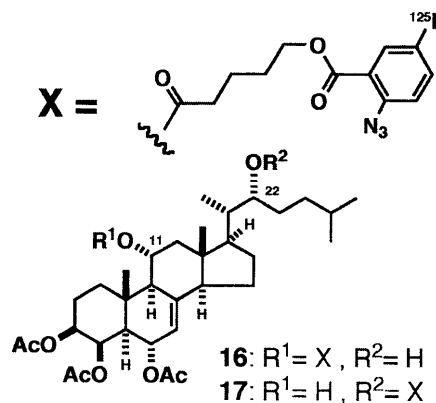


Fig. 10. Photolabeling of MRP1 by photoaffinity probe **16**

バンドが、**9**の存在下では用量依存的に減弱し、**9**はP-gpの基質結合部位に直接結合していることが示唆された。また、KB-CV60株から調製した反転膜小胞を用いて、MRP1を介した薬物輸送に対する**9**の作用を調べた。ATPおよび**9**の存在下でMRP1の基質 ^3H]DNP-SGを添加し、反転膜小胞内に輸送された ^3H]DNP-SG量を測定した。その結果、**9**は用量依存的にDNP-SG輸送量を減少させた (Fig. 9)。これらの結果から、**9**は薬剤排出膜タンパク質に直接作用してその機能を阻害するものと考えられた¹⁷⁾。

また、**9**から誘導した各種誘導体、さらに天然から得られた類縁体の耐性克服作用を検討した結果、**9**の水酸基もしくは acetyl 基のそれぞれが活性発現には重要で、それらを一つでも失うと、その耐性克服作用が減弱することが明らかになった¹⁴⁾。

Agosterol A photoaffinity probeを用いたMRP1の機能解析

Agosterol A (**9**) が MRP1 に対して強い阻害作用を

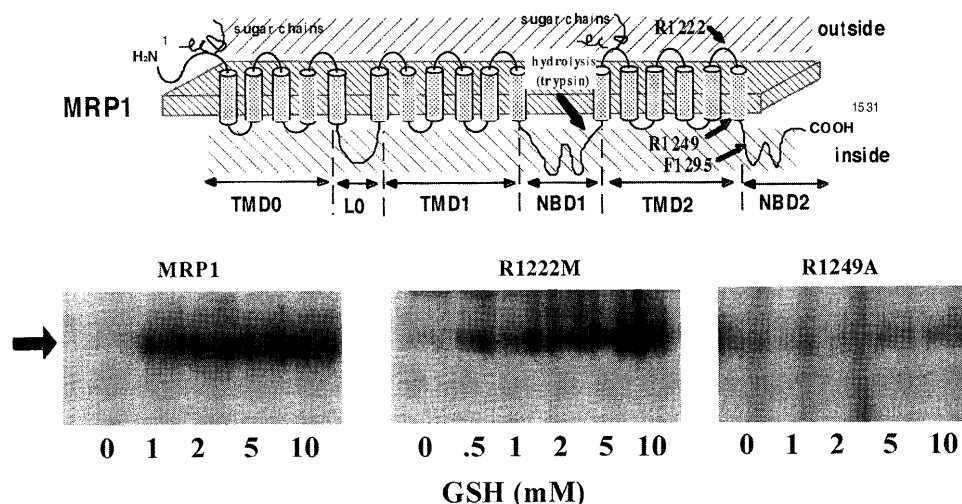


Fig. 11. GSH-dependent photolabeling of MRP1 mutant by photoaffinity probe **16**

示すことから、**9** の光親和性放射性標識体 **16** および **17** を合成し、MRP1 の標識を試みた。その結果、11 位に光親和性補助基を結合させた **16** は、P-gp および MRP1 を特異的に標識することができ、さらに **16** と MRP1 の結合には MRP1 の基質輸送に重要な役割を持つグルタチオン(GSH)が必須であることが明らかになった(Fig. 10)¹⁸⁾。また、**16** と MRP1 の結合が vincristine や doxorubicin によって阻害されることから、**9** の MRP1 における結合部位は薬物結合部位と同一であることが示唆された。一方、22 位に光親和性光親和性補助基を結合させた **17** は P-gp および MRP1 を標識することができなかった。

さらに、MRP1 の mutant タンパクを発現させ、ラベル実験を行った。すなわち、N 末端側の膜貫通領域 TMD0 を持たない mutant (L0ΔMRP) と TMD0 に加えてリンカー L0 も持たない mutant (ΔMRP) を用いてラベル化を行ったところ、L0ΔMRP のみが GSH 依存的にラベル化されたことから、リンカー L0 が MRP1 における GSH 依存性の基質輸送に必須であり、MRP1 における GSH の作用部位であると考えられた¹⁸⁾。また、ラベル化した MRP1 をトリプシン処理すると、標識は TMD2 以降の C 末端側に残る一方、MRP1 の 1296 番目から C 末端までを除いた MRP1₁₋₁₂₉₅ は、GSH 依存的に **16** によってラベル化されたことから、NBD2 含む 1296 番目以降の C 末端部分は MRP1 と基質の結合には必要なく、基質結合部位は TMD2 に存在する可能性が示唆された。さらに、TMD2 に存在するアルギニン残基の point mutant R1222M がトランスポート活性を保持していた

のに対して R1249A はトランスポート活性をほとんど失っており、**16** によってラベル化もされなかったことから、TMD2 に存在する 1249 番目のアルギニンが基質結合部位の形成に重要であることが明らかになった¹⁹⁾。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、大阪大学大学院薬学研究科天然物化学分野で行われたものです。研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻賜りました小林資正教授に感謝いたしますとともに、実験にご協力いただきました多くの方々に深謝いたします。また、MRP1 の機能解析につきまして共同研究を行っていただきました鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 秋山伸一教授、古川龍彦博士、任 曉琴博士に心からお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Aoki S., Higuchi K., Isozumi N., Matsui K., Miyamoto Y., Itoh N., Tanaka K., Kobayashi M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 426–431 (2001).
- 2) Aoki S., Kong D., Matsui K., Kobayashi M., *Anti-cancer drugs* **15**, 363–369 (2004).
- 3) Aoki S., Matsui K., Tanaka K., Satari R., Kobayashi M., *Tetrahedron*, **56**, 9945–9948 (2000).
- 4) Aoki S., Wei H., Matsui K., Rachmat R., Kobayashi M., *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 1969–1973 (2003).
- 5) Inokoshi J., Katagiri M., Arima S., Tanaka H., Hayashi M., Kim Y.B., Furumai R., Yoshida M., Horinouchi S., Omura S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **256**, 372–376

- (1999).
- 6) Aoki S., Matsui K., Takata T., Hong W., Kobayashi M.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., **289**, 558–563 (2001).
 - 7) Aoki S., Matsui K., Wei H., Murakami N., Kobayashi M.,
Tetrahedron, **58**, 5417–5422 (2002).
 - 8) Aoki S., Matsui K., Takata T., Kobayashi M., *FEBS Lett.*,
544, 223–227 (2003).
 - 9) Gerlach J.H., Endicott J.A., Juranka P.F., Henderson G.,
Sarangi F., Deuchars K.L., Ling V., *Nature*, **324**, 485–489
(1986).
 - 10) Cole S. P. C., Bhardwaj G., Gerlach J. H., Mackie J. E.,
Grant C. E., Almquist K. C., Stewart A. J., Kurz E. U.,
Duncan A. M., Deeley R. G., *Science*, **258**, 1650–1654
(1992).
 - 11) Aoki S., Okano M., Matsui K., Itoh T., Satari R.,
Akiyama S., Kobayashi M., *Tetrahedron*, **57**, 8951–8957
(2001).
 - 12) Aoki S., Cao L., Matsui K., Rachmat R., Akiyama S.,
Kobayashi M., *Tetrahedron*, **60**, 7053–7059 (2004).
 - 13) Aoki S., Yoshioka Y., Miyamoto Y., Higuchi K.,
Setiawan A., Murakami N., Chen Z.S., Sumizawa T.,
Akiyama S., Kobayashi M., *Tetrahedron Lett.*, **39**,
6303–6306 (1998).
 - 14) Aoki S., Setiawan A., Yoshioka Y., Higuchi K., Fudetani
R., Chen, Z.S., Sumizawa T., Akiyama S., M. Kobayashi
M., *Tetrahedron*, **55**, 13965–13972 (1999).
 - 15) Akiyama S., Fojo J. A., Hanover J. A., Pastan I. H.,
Gottesman M. M., *Somat. Cell Mol. Genet.*, **11**,
117–126 (1985).
 - 16) Nagayama S., Chen Z.S., Kitazono M., Takebayashi Y.,
Niwa K., Yamada K., Tani A., Haraguchi M., Sumizawa
T., Furukawa T., Aikou T., Akiyama S., *Cancer Lett.*, **130**,
175–182 (1998).
 - 17) Aoki S., Chen Z.S., Higasiyama K., Setiawan A.,
Akiyama S., Kobayashi M., *Jpn. J. Cancer Res.* **92**,
886–895 (2001).
 - 18) Ren X.Q., Furukawa T., Aoki S., Nakajima T.,
Sumizawa T., Haraguchi M., Kobayashi M., Akiyama S.,
J. Biol. Chem., **276**, 23197–23206 (2001).
 - 19) Ren X.Q., Furukawa T., Aoki S., Sumizawa T.,
Haraguchi M., Nakajima Y., Ikeda R., Kobayashi M.,
Akiyama S., *Biochemistry*, **41**, 14132–14140 (2002).