

様 式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23102011

研究課題名（和文）抗がん剤開発を指向した新規PKCリガンドの創製と作用機構解析

研究課題名（英文）Development and mechanistic analysis of new PKC ligands as anti-cancer agents

研究代表者

入江 一浩（IRIE, Kazuhiro）

京都大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：00168535

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 33,100,000 円

研究成果の概要（和文）：アメリシトキシン由来の発がん促進物質であるアブリシアトキシン（ATX）の単純化により開発した新規抗がん剤リード・Aplog-1の構造最適化を行った結果、10位にメチル基を導入した10-Me-Aplog-1が、ATXのもつ副作用（発がん促進ならびに炎症作用）をほとんど示すことなく、ATXよりも約2倍高いがん細胞増殖抑制活性を有することを明らかにした。続いて、10-Me-Aplog-1を数百ミリグラムレベルで大量合成し、移植がんマウスモデルにおいて抗がん活性を示すことを確認するとともに、その増殖抑制活性の一部が、プロテインキナーゼC の活性化によってもたらされていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Protein kinase C (PKC) isozymes play central roles in the signal transduction on the cell surface and could serve as promising therapeutic targets of intractable diseases like cancer and Alzheimer's disease. Although natural PKC ligands like phorbol esters have the potential to become therapeutic leads, most of them are potent tumor promoters and proinflammatory on mouse skin. We focused on the skeleton of aplysiatoxin (ATX), a natural PKC ligand isolated from sea hare. We found 10-methyl-aplog-1, a simplified analog of ATX, to have strong anti-proliferative activity against several cancer cell lines with little tumor-promoting and inflammatory activities. In order to examine the anti-cancer activity in vivo and mechanism of action, several hundred milligrams of 10-methyl-aplog-1 was synthesized. 10-Methyl-aplog-1 exhibited significant anti-cancer activity against mouse xenograft models, and its anti-proliferative activity derived in part from activation of protein kinase C.

研究分野：生物有機化学

キーワード：アブリシアトキシン アプログ プリオスタチン がん細胞増殖抑制 プロテインキナーゼC ホルボ
ールエステル 発がんプロモーター

1. 研究開始当初の背景

Bryostatin 1 (Bryo-1, 図1) は、海洋生物 *Bugula neritina* から単離された大環状ラクトンである (Pettit, G. R. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6846). 本化合物は、米国での第二相臨床試験 (Phase II) において肺がんや白血病などに有効である一方で、主な副作用は筋肉痛のみであったことから、次世代の抗がん剤として大きな期待が寄せられている。このような背景から、Bryo-1 の各種活性ならびに臨床試験データの蓄積が求められているが、本化合物の天然からの単離収率は 10^{-4} ~ 10^{-7} % と極めて低く、全合成においても多段階を必要とすることから、Bryo-1 を十分量供給することは困難である。この問題を解決するため、*B. neritina* の大量養殖や合成ルートの改良、生合成遺伝子の単離が試みられているが、根本的な解決には至っていない。

Bryo-1 の抗がん作用は、細胞内情報伝達の鍵酵素であるプロテインキナーゼ C (PKC) アイソザイムの一種・PKC δ の活性化を介していることが指摘されている。Bryo-1 が天然の発がん促進物質と同様に、PKC δ を強力に活性化するにもかかわらず、発がん促進作用を示さず、抗がん作用を示す理由については、PKC δ の細胞内局在性の差異やプロテアーゼによる分解からの保護作用など複数の仮説がこれまでに提示されている。しかしながら、その詳細な機構は不明のままである。

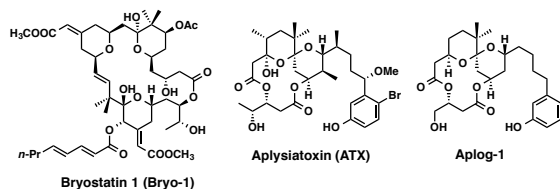


図1 Bryo-1, ATX および Aplog-1 の構造

2. 研究の目的

本研究代表者らは、天然の発がん促進物質の一つであり、強力な PKC リガンドである aplysiatoxin (ATX) の単純化アナログ (Aplog-1, 図1) が、発がん促進活性などの副作用をほとんど示すことなく、Bryo-1 に匹敵するがん細胞増殖抑制活性を有することを見いだした (Nakagawa, Y. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7573; Irie, K. *et al.*, *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 518; Irie, K. and Yanagita, R. C., *Chem. Rec.* **2014**, *14*, 251). 本研究では、Aplog-1 をリードとして様々な構造修飾を行なうことによ

り、合成が容易で化学的に安定な Bryo-1 等価体を開発する。続いて、本アナログを数百ミリグラムスケールで大量合成し、*in vivo* での抗がん活性を評価するとともに、本新学術領域内の班員と連携して、PKC アイソザイムを介したがん細胞増殖抑制機構を明らかにする。さらに本アナログを分子プローブ化して、PKC アイソザイム以外の標的タンパク質の同定も試みる。

3. 研究の方法

まず、Aplog-1 の側鎖芳香環上に様々な置換基を系統的に導入する。また、Aplog-1 の PKC アイソザイムに対する結合において重要な役割を果たしていると考えられるスピロケタール部位に、ATX の単純化によって取り除いた不斉メチル基を系統的に導入する。続いて、これらの Aplog-1 アナログの PKC アイソザイムへの結合能、各種がん細胞増殖抑制活性、ならびに副作用である発がん促進活性と炎症作用をマウスで評価し、Bryo-1 の代替薬となりうる最適なアナログを選定する。PKC アイソザイムへの結合能は、本研究代表者らが開発した PKC アイソザイム C1 ペプチドと [3 H]phorbol 12,13-dibutyrate を用いて行う (Irie, K. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9159). また、各種がん細胞増殖抑制活性の評価は、新学術領域研究・化学療法基盤支援活動に依頼する。

この最適化アナログを数百ミリグラムスケールで合成するため、合成方法を再検討し、それに基づいて大量合成を行う。また、本アナログの *in vivo* での抗がん活性を、各種移植がんを担持したモデルマウスを用いて行う (がん研究会・旦 真吾博士との共同研究)。続いて、Aplog-1 の最適化アナログの作用機構を解析するため、Aplog-1 に感受性の高いがん細胞株において発現している PKC アイソザイムの定量をウェスタンブロッティング法で行うとともに、各アイソザイムを siRNA でノックダウンすることによって、この最適化アナログのがん細胞増殖抑制活性に寄与する PKC アイソザイムを同定する。さらに、PKC 以外の標的タンパク質の同定を行うため、この最適化アナログの側鎖芳香環にビオチン残基を導入した分子プローブを合成し、がん細胞抽出液と反応後、半田磁性ビーズで釣り上げ、質量分析法により標的タンパク質を同定する。

4. 研究成果

(1) Aplog-1 の側鎖芳香環における構造-活性相関

ATX の側鎖芳香環の臭素原子は発がんの促進活性に重要な役割を果たしていることから、Aplog-1 のベンゼン環に各種置換基を導入することにより分子疎水性度 ($\log P$) を変化させた誘導体を系統的に合成し、がん細胞増殖抑制活性に最適な芳香環部分の置換基ならびに疎水性度を調べた。得られた各種誘導体のがん細胞増殖抑制活性は、矢守らが確立した 39 種類のヒトがん細胞パネルを用いた試験で評価し、各化合物の $\log P$ は HPLC 法により実測した (Kamachi, H. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2695)。

39 種類のヒトがん細胞に対する Aplog-1 誘導体 10 種の 50% 増殖阻害濃度の平均値 (MG-MID) の逆数の対数値と $\log P$ について二次回帰式を求めたところ、高い相関が得られ ($r = 0.95$)、がん細胞増殖抑制活性に最適な $\log P$ は 4.0 ~ 4.5 であることが示唆された。また、これらの誘導体の発がん促進活性ならびに炎症作用は DAT と比べて非常に弱く、疎水性度との相関も見られなかった。さらに、芳香環上の置換基の立体要求性が厳密でないことも明らかになった。これらの知見は、側鎖構造を大幅に改変した誘導体の開発や作用機構解析に用いる分子プローブを設計するためのリンカーの導入位置を検討する上で有用である。一方で、Aplog 類の芳香環部位を自在に改変可能な新しい合成経路も確立した (Shu, Y. *et al.*, *Heterocycles* **2012**, *86*, 281)。

(2) Aplog-1 のスピロケタール部位の構造最適化

Aplog-1 のスピロケタール部位のメチル基が、PKC への結合能において重要な役割を果たしていると推定されたので、スピロケタール部位に ATX と同じ立体配置のメチル基 (4, 10, 12 位) を系統的に導入した誘導体を合成し、それらの各種生物活性を評価した (Nakagawa, Y. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 1167; Irie, K. *et al.*, *Pure Appl. Chem.* **2012**, *84*, 1341; Kikumori, M. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5614; Kikumori, M. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**, *80*, 221)。その結果、10-Me-Aplog-1 及び 10,12-diMe-

Aplog-1 の PKC δ に対する結合能は Aplog-1 の 10 倍以上であり、ATX ならびにその脱ブROMO体である debromoaplysiatoxin (DAT) の結合能とほぼ同等であった。これらのがん細胞増殖抑制活性を 39 種類のヒトがん細胞株を用いて評価したところ、Aplog 類に感受性の高い 10 種類のがん細胞株において Bryo-1 よりも 10 倍以上高い増殖抑制活性を示した。特に 10,12-diMe-Aplog-1 の増殖抑制活性は、DAT よりも数倍高かった。一方、これらの化合物の *in vivo* における発がん促進活性をマウス皮膚二段階発がんモデルで評価したところ、DAT が発がん促進活性を示す量の 5 倍量を塗布しても腫瘍は発生しなかった。さらにこれらは、マウス耳における炎症作用もほとんど示さなかった (特願 2012-092842, PTC/JP2013/061333)。以上より 10-Me-Aplog-1 ならびに 10,12-diMe-Aplog-1 は、「マスターキー」である DAT のがん細胞増殖抑制活性を保持したまま、発がん促進活性および炎症作用を除去した「スペシャルキー」と考えられ、新規抗がん剤シーズになる可能性がある。

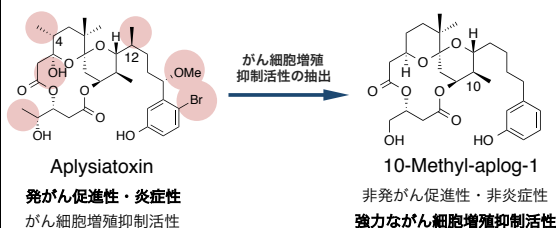


図2 Aplysiatoxin の単純化による新規抗がん剤シーズの設計

(3) 10-Me-Aplog-1 の大量合成と *in vivo* での抗がん活性

10-Me-Aplog-1 の抗がん剤シーズとしての有用性が示唆されたので、本化合物の大量合成を行った。当初の 10-Me-Aplog-1 の合成経路において、保護基を用いない反応条件の確立などにより、28 段階の反応を 23 段階まで短縮することができ、数百 mg スケールの合成に成功した (Kikumori, M. *et al.*, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 9776)。Aplog 類に感受性の高い NCI-H460, HCC2998, HBC-4 の 3 細胞株をヌードマウスに移植し、10-Me-Aplog-1 を 5 mg/kg, 1 回腹腔内投与したところ、いずれのがん細胞株に対しても有意な増殖抑制が認められた。

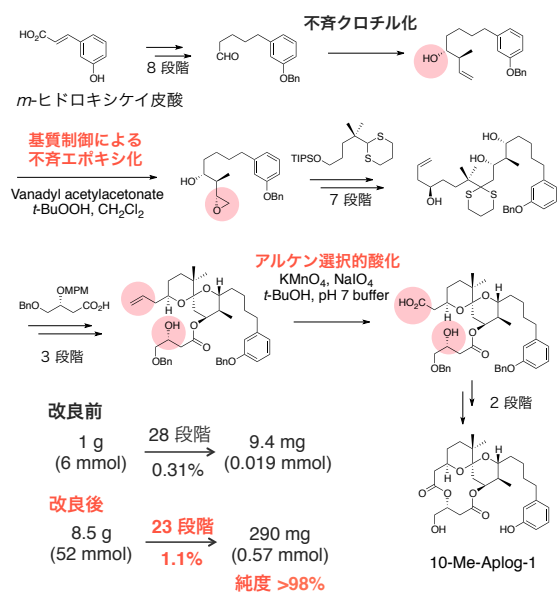


図3 10-Me-Aplog-1の大量合成

(4) 10-Me-Aplog-1のがん細胞増殖抑制機構の解析

10-Me-Aplog-1の主たる標的はPKCアイソザイムと予想されたので、PKCアイソザイムを活性化しないネガティブコントロールとなるAplog-1誘導体を複数合成し、がん細胞増殖抑制活性を評価した (Hanaki, Y. *et al.*, *Tetrahedron* **2013**, 69, 7636; Hanaki, Y. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2015**, 79, 888). その結果、39種類のがん細胞株のうち、10種類のがん細胞株がAplog類に感受性が高いことが判明し、これらの細胞株においてはPKCアイソザイムに対する結合能と増殖抑制活性との間に相関が認められた。

そこで、感受性の高いがん細胞株のうち肺がん由来のA549細胞を選び、発現しているすべてのPKCアイソザイムをウェスタンブロッティングによって定量した。その結果、A549細胞には主としてPKC α ならびにPKC δ が発現していることが判明した。複数のPKC阻害剤(Gö6976, 6983)存在下でA549細胞に対する10-Me-Aplog-1の細胞毒性が抑制されたことから、これらのアイソザイムの活性化が増殖抑制に関与していることが明らかになった。続いて、PKC α ならびにPKC δ の発現をsiRNAでそれぞれノックダウンしたところ、PKC α をノックダウンした時のみ、10-Me-Aplog-1の増殖抑制活性が有意かつ顕著に低下した。これより、10-Me-Aplog-1のA549細胞に対する増殖抑制は、主として

PKC α を介していることが示唆された。これまで、Bryo-1によるがん細胞増殖抑制は、PKC δ を介したアポトーシスによるものと考えられてきた。従って、10-Me-aplog-1によるがん細胞増殖抑制にPKC α が関与している事実は興味深い。PKC α の活性化はその下流でp21を誘導することが知られている。p21はサイクリンを阻害することにより、細胞周期がG1期で停止し、その結果、細胞増殖抑制が引き起こされるものと考えられる。

さらに、PKC以外の標的の存在も考えられたため、10-Me-Aplog-1のビオチン標識体を合成し、A549細胞抽出液とインキュベートすることによって、結合タンパク質を複数見いだしている。しかしながら、Aplog類の増殖抑制活性と相関する標的タンパク質の同定には至っていない。

【国内外での成果の位置づけ】

天然PKCリガンドを抗がん剤シーズとして応用する研究は、国内外で数多くなされてきている。副作用の少ないものとして特に有望なものは、スタンフォード大学のWenderらのBryo-1単純化アナログである。本研究ではBryo-1よりも構造が簡単なATXを単純化することにより、ATXの副作用を抑えた新規抗がん剤シーズ・10-Me-Aplog-1の開発に成功した。

【今後の課題・展望】

本研究によって、Bryo-1に匹敵する新規抗がん剤シーズを開発することができた。また本化合物の大量合成を行い、メカニズム解析に必要な量を確保し、その標的の一つとしてPKC α を同定することもできた。今後、Aplog類に感受性の高いすべてのがん細胞株について標的の同定を行い、これらの細胞株における増殖抑制がPKC α の活性化で説明できるのかどうか、別のアイソザイムが関与しているのか、あるいはPKC以外の標的が存在するのかなど、作用機構を詳細に検討する必要がある。一方、10-Me-Aplog-1の更なる構造最適化も必須である。特に3位のデオキシ体の合成には工程数がかかりすぎるので、ATXのような3位アセタール型のアナログの開発を検討することが望まれる。Aplog類によるがん細胞増殖抑制機構が解明され、最適な化合物が大量合成できれば、臨床試験に進める可能性は十分あると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線) *Corresponding author

〔雑誌論文〕 (計 12 件)

- (1) Kikumori, M., Yanagita, R. C., Tokuda, H., Suenaga, K., Nagai, H., *Irie, K., Structural optimization of 10-methyl-aplog-1, a simplified analog of debromoaplysiatoxin, as an anticancer lead, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 221-231 (2016) (DOI: 10.1080/09168451.2015.1091718) (査読有)
- (2) Hanaki, Y., Yanagita, R. C., Sugahara, T., Aida, M., Tokuda, H., Suzuki, N., *Irie, K., Synthesis and biological activities of the amide derivative of aplog-1, a simplified analog of aplysiatoxin with anti-proliferative and cytotoxic activities, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 888-895 (2015) (DOI: 10.1080/09168451.2014.1002452) (査読有)
- (3) Kikumori, M., Yanagita, R. C., *Irie, K., Improved and large-scale synthesis of 10-methyl-aplog-1, a potential lead for an anticancer drug, *Tetrahedron*, **70**, 9776-9782 (2014) (DOI: 10.1016/j.tet.2014.11.026) (査読有)
- (4) *Irie, K. and Yanagita, R. C., Synthesis and biological activities of simplified analogs of the natural PKC ligands, bryostatin-1 and aplysiatoxin, *Chem. Rec.*, **14**, 251-267 (2014) (DOI: 10.1002/tcr.201300036) (査読有)
- (5) Yanagita, R. C., Kamachi, H., Kikumori, M., Tokuda, H., Suzuki, N., Suenaga, K., Nagai, H., *Irie, K., Effects of the methoxy group in the side chain of debromoaplysiatoxin on its tumor-promoting and anti-proliferative activities, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**, 4319-4323 (2013) (DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.05.096) (査読有)
- (6) Kamachi, H., Tanaka, K., Yanagita, R. C., Murakami, A., Murakami, K., Tokuda, H., Suzuki, N., Nakagawa, Y., *Irie, K., Structure-activity studies on the side chain of a simplified analog of aplysiatoxin (aplog-1) with anti-proliferative activity, *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 2695-2702 (2013) (DOI: 10.1016/j.bmc.2013.03.013) (査読有)
- (7) Hanaki, Y., Kikumori, M., Ueno, S., Tokuda, H., Suzuki, N., *Irie, K., Structure-activity studies at position 27 of aplog-1, a simplified analog of debromoaplysiatoxin with anti-proliferative activity, *Tetrahedron*, **69**, 7636-7645 (2013) (DOI: 10.1016/j.tet.2013.02.008) (査読有)
- (8) Kikumori, M., Yanagita, R. C., Tokuda, H., Suzuki, N., Nagai, H., Suenaga, K., *Irie, K.,

Structure-activity studies on the spiroketal moiety of a simplified analog of debromoaplysiatoxin with antiproliferative activity, *J. Med. Chem.*, **55**, 5614-5626 (2012) (DOI: 10.1021/jm300566h) (査読有)

- (9) *Irie, K., Kikumori, M., Kamachi, H., Tanaka, K., Murakami, A., Yanagita, R. C., Tokuda, H., Suzuki, N., Nagai, H., Suenaga, K., Nakagawa, Y., Synthesis and structure-activity studies of simplified analogs of aplysiatoxin with anti-proliferative activity like bryostatin-1, *Pure Appl. Chem.*, **84**, 1341-1351 (2012) (DOI: 10.1351/PAC-CON-11-08-22) (査読有)
- (10) *Irie, K., Yanagita, R. C., Nakagawa, Y., Development of new anticancer drugs based on the activation mechanism of protein kinase C δ , *Med. Res. Rev.*, **32**, 518-535 (2012) (DOI: 10.1002/med.20220) (査読有)
- (11) Shu, Y., Yanagita, R. C., Tokuda, H., Suzuki, N., *Irie, K., Synthesis of antineoplastic analogs of aplysiatoxin with various side chain structures, *Heterocycles*, **86**, 281-303 (2012) (DOI: 10.3987/COM-12-S(N)8) (査読有)
- (12) Nakagawa, Y., Kikumori, M., Yanagita, R. C., Murakami, A., Tokuda, H., Nagai, H., *Irie, K., Synthesis and biological evaluation of the 12,12-dimethyl derivative of aplog-1, an anti-proliferative analog of tumor-promoting aplysiatoxin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1167-1173 (2011) (DOI: 10.1271/bbb.110130) (査読有)

〔学会発表〕 (計 27 件のうち 11 件記載)

- (1) Irie, K., “Extraction of anti-proliferative activity from pleiotropic debromoaplysiatoxin, a potent tumor promoter and a highly inflammatory principle isolated from sea hare”, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), Hawaii, USA, Dec. 15, 2015 (Invited Lecture)
- (2) 入江一浩, 「アプリシアトキシンの構造単純化による抗がん剤シーズの開発研究」, 第 33 回メディスナルケミストリーシンポジウム, 幕張国際研修センター (千葉市), 平成 27 年 11 月 26 日 (招待講演)
- (3) 入江一浩, 「天然のプロテインキナーゼ C リガンドの単純化による抗がん剤シーズの開発研究」, 日本農芸化学会 2015 年度中四国・西日本支部合同大会, 愛媛大学農学部 (樽味キャンパス, 松山市), 平成 27 年 9 月 17 日 (招待講演)
- (4) 入江一浩, 「抗がん剤開発を指向した新規プロテインキナーゼ C リガンドの創製」,

- 京都大学学際融合教育研究推進センター・生理化学研究ユニット第4回公開シンポジウム, 京都大学益川記念館 (京都市), 平成26年6月24日 (招待講演)
- (5) Irie, K., “Synthesis and biological activities of the simplified analogs of a natural PKC ligand aplysiatoxin”, International Symposium on Natural Products Chemistry and Chemical Biology 2013, Hotel Rubura Ohzan, Nagoya, Japan, Nov. 26, 2013 (Invited Lecture)
- (6) Irie, K., “Structure-activity studies of the simplified analogue of aplysiatoxin with antiproliferative activity like bryostatins”, 3rd International Symposium on Innovative Areas “Chemical Biology of Natural Products”, Kyoto Century Hotel, Kyoto, Japan, Oct. 31, 2012 (Invited Lecture)
- (7) 入江一浩, 「天然発がんプロモーターの骨格を利用した新規抗がん剤リードの開発」, 2012年度日本農芸化学会大会, 京都女子大学 (京都市), 平成24年3月25日 (招待講演)
- (8) 入江一浩, 「抗がん剤開発を指向した新規PKCリガンドの創製と作用機構解析」, 新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー」第一回公開シンポジウム, 大阪市大杉本キャンパス (大阪市), 平成24年1月10日 (招待講演)
- (9) 入江一浩, 「天然発がんプロモーターの骨格を利用した新規ツール分子と抗がん剤シーズの開発」, 日本農芸化学会関西支部例会 (第472回講演会), 神戸大学農学研究科 (神戸市), 平成23年12月10日 (招待講演)
- (10) Irie, K., “Development of new molecular probes and therapeutic seeds having skeletons of naturally-occurring tumor promoters”, 22nd French-Japanese Symposium of Medicinal and Fine Chemistry, Rouen, France, Sep. 13, 2011 (Invited Lecture)
- (11) Irie, K., “Synthesis and structure-activity studies of the simplified analogue of aplysiatoxin with antiproliferative activity like bryostatin 1”, 27th International Symposium on the Chemistry of Natural Products, 7th International Conference on Biodiversity, Brisbane, Australia, Jul. 11, 2011 (Invited Lecture)

〔図書〕 (計1件)

- (1) 入江一浩, 「アプリシアトキシンの骨格を利用した抗がん剤シーズの開発研究」, CSJ Current Review 19, 生物活性分子のケミカルバイオロジー, 日本化学会編, Chapter 12, pp127-133 (2015) (ISBN: 9784759813791) (査読無)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 新規アプリシアトキシシン誘導体及びそれを含有する抗がん剤

発明者: 入江一浩, 菊森将之, 蒲池弘明, 柳田 亮, 中川 優

権利者: 同上

種類: 特許出願

番号: 2012-092842

出願年月日: 平成24年4月16日

国内外の別: 国内

〔その他〕

○アウトリーチ活動 (計1件)

入江一浩, 「プロテインキナーゼCを標的とした新規抗がん剤シーズ」, 京都大学新技術説明会 (JST 東京別館ホール, 市ヶ谷), 平成24年8月24日

○ホームページ等

<http://www.orgchem.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江 一浩 (IRIE, Kazuhiro)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 00168535

(2) 研究分担者

柳田 亮 (YANAGITA, Ryo C.)

香川大学・農学部・助教

研究者番号: 10598121

(3) 連携研究者

なし