

氏名(本国籍)	百瀬洋子(東京都)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博乙第120号
学位授与年月日	平成19年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題目	固形癌における低酸素環境を標的にした抗癌剤の探索
審査委員会	主査 静岡大学 教授 岡部 満 康 副査 静岡大学 教授 朴 龍 洙 副査 岐阜大学 教授 木 曾 真 副査 信州大学 教授 千 菊 夫

論文の内容の要旨

固形癌では癌細胞は無秩序に増殖するため固形癌の病巣には十分に酸素がゆきわたらず、低酸素状態におかれている領域が存在する。固形癌における低酸素細胞は、放射線療法、化学療法に対し耐性を獲得しており、再発、転移などの原因となっている。また、低酸素で誘導される転写因子 hypoxia-inducible factor-1(HIF-1)の標的遺伝子産物のはたらきは血管新生、解糖系酵素、グルコース輸送、血管制御、細胞増殖など多岐にわたり、癌の発達に有利なものが数多くある。このため HIF-1 は癌治療の新しい分子標的としてきわめて有望であり、その阻害物質は優れた癌治療薬になると考えられている。

第1章は微生物代謝産物より低酸素細胞選択毒性を示す物質の探索を行い、rakacidin が低酸素細胞選択毒性を示すことを発見した。この微生物培養液からは、rakacidin A と B の2種類の rakacidin が単離できたが、rakacidin A は rakacidin B より強い低酸素細胞選択毒性を示すことを明らかにした。現在、臨床で用いられている制癌剤は、低酸素条件下ではその制癌効果が明らかに減少するのに対し、rakacidin A は各癌細胞株において低酸素条件下でより強い選択毒性を示した。その低酸素細胞選択性は、臨床で用いられている制癌剤において唯一低酸素細胞選択毒性を示すことが知られている mytomyacin C よりも優れていた。rakacidin A の低酸素細胞選択性は、化学的に低酸素を起こす CoCl_2 添加によって観察されず、酸素ラジカルを捕捉する antioxidant 添加によっても観察されなかった。このように rakacidin の選択毒性のメカニズムは明らかになっていないが、その作用機序を今後明らかにすることにより、低酸素選択毒性の新しい標的の発見の可能性がある。

続いて第2章では、微生物代謝産物から HIF-1 阻害物質の探索系の構築を行なった。探索系としては、阻害の作用点を広くカバーできるレポーターアッセイを採用した。HIF-1 の標的遺伝子である vascular endothelial growth factor (VEGF) から得た HRE

(hypoxia response element)を含むフラグメントをルシフェラーゼに連結した遺伝子を CHO 細胞に導入して、安定な発現株 A4-4 を作成することに成功した。A4-4 において低酸素処理の時間と細胞数に比例したルシフェラーゼ活性が認められた。また、HIF-1 活性に影響を及ぼすことが報告されている一酸化窒素、プロテアソーム阻害剤がルシフェラーゼ活性を用量依存的に減少させ、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がルシフェラーゼ活性を用量依存的に増大させることを確認した。

続いて第 3 章において第 2 章で構築したレポーターアッセイを用いて微生物代謝産物から HIF-1 阻害物質の探索を行い、cinerubin が強い HIF-1 阻害活性を示すことを発見した。cinerubin は、抗癌治療において高い評価を得ているアンストラサイクリン系抗生物質の一種であるが、臨床では現在用いられていない。また、アンストラサイクリンによる HIF-1 阻害活性の報告がないことから、他の臨床に用いられているアンストラサイクリン系抗腫瘍抗生物質の HIF-1 阻害活性について検討を行なっている。興味深いことに HIF-1 に対する阻害活性には差がみられ、cinerubin と aclarubicin は強い HIF-1 阻害活性を示したが、doxorubicin と daunorubicin には弱い阻害活性しかみられなかった。これは、HIF-1 の標的遺伝子である VEGF のタンパク量を HepG2 細胞でエライザ法により調べた結果と一致した。cinerubin は HIF-1 阻害活性を示したが、HIF-1 α の mRNA 量を解析したところ、cinerubin は HIF-1 の mRNA には影響を及ぼしていないことが明らかになった。また、cinerubin は低酸素による HIF-1 α タンパクの蓄積を阻害しており、転写レベルではなくタンパクレベルでの阻害が起こっている事を明らかにしている。

続いて第 4 章において微生物代謝産物から HIF-1 阻害物質として NBR1759-27 を発見している。各種機器分析により NBR1759-27 の構造解析を行い、NBR1759-27 は新規なホウ素を中心元素とするマクロジオリドであることを明らかにしている。NBR1759-27 は HIF-1 α のタンパク量を減少させていたが、HIF-1 α のタンパク量に影響を与える NBR1759-27 の用量は、HIF-1 の転写活性の IC₅₀ 値より高く、他にも阻害機構があることを示唆している。また、NBR1759-27 の抗腫瘍活性をマウスで解析した結果、LNCaP および BSY-1 細胞移植マウスにおいて NBR1759-27 は、腫瘍増殖を若干抑制することを示している。

以上のように本論文は固形癌の低酸素という固形癌特有の環境を標的にし、微生物代謝産物から探索を行うことにより rakicidin、cinerubin、NBR1759-27 の新しい生物活性を発見している。その過程で抗腫瘍効果の解明を行うことにより、選択毒性に優れた抗癌剤の開発に有益な指針を提案している。

審 査 結 果 の 要 旨

固形癌では癌細胞は無秩序に増殖するため固形癌の病巣には十分に酸素がゆきわたらず、低酸素状態におかれている領域が存在する。固形癌における低酸素細胞は、放射線療法、化学療法に対し耐性を獲得しており、再発、転移などの原因となっている。また、低酸素で誘導される転写因子 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) の標的遺伝子産物のはたらきは血管新生、解糖系酵素、グルコース輸送、血管制御、細胞増殖など多岐にわたり、癌の発達に有利なものが数多くある。このため HIF-1 は癌治療の

新しい分子標的としてきわめて有望であり、その阻害物質は優れた癌治療薬になると考えられている。著者は、正常組織では起こりえない固形癌における低酸素環境に着目し、微生物代謝産物より低酸素細胞選択毒性物質および低酸素により誘導される転写因子 HIF-1 阻害物質の探索を行っている。

本論文の公開学論文発表は、審査委員 4 名を含む関連教官や学生の出席のもと、平成 19 年 1 月 24 日(水)午後 1 時半より静岡大学において実施された。発表内容は充実しており、本申請者は質問に対して的確に応答した。終了後引き続き論文内容を中心に審査委員会を開催した。提出された学位論文の審査結果は以下のとおりである。

論文の第 1 章は微生物代謝産物より低酸素細胞選択毒性を示す物質の探索を行い、rakicidin が低酸素細胞選択毒性を示すことを発見した。この微生物培養液からは、rakicidin A と B の 2 種類の rakicidin が単離できたが、rakicidin A は rakicidin B より強い低酸素細胞選択毒性を示すことを明らかにした。現在、臨床で用いられている制癌剤は、低酸素条件下ではその制癌効果が明らかに減少するのに対し、rakicidin A は各癌細胞株において低酸素条件下でより強い選択毒性を示した。その低酸素細胞選択性は、臨床で用いられている制癌剤において唯一低酸素細胞選択毒性を示すことが知られている mytomycin C よりも優れていた。rakicidin A の低酸素細胞選択性は、化学的に低酸素を起こす CoCl_2 添加によって観察されず、酸素ラジカルを捕捉する antioxidant 添加によっても観察されなかった。このように rakicidin の選択毒性のメカニズムは明らかになっていないが、その作用機序を今後明らかにすることにより、低酸素選択毒性の新しい標的の発見の可能性がある。

続いて第 2 章において申請者は、微生物代謝産物から HIF-1 阻害物質の探索系の構築を行なった。探索系としては、阻害の作用点を広くカバーできるレポーターアッセイを採用した。HIF-1 の標的遺伝子である vascular endothelial growth factor (VEGF) から得た HRE (hypoxia response element) を含むフラグメントをルシフェラーゼに連結した遺伝子を CHO 細胞に導入して、安定な発現株 A4-4 を作成することに成功した。A4-4 において低酸素処理の時間と細胞数に比例したルシフェラーゼ活性が認められた。また、HIF-1 活性に影響を及ぼすことが報告されている一酸化窒素、プロテアソーム阻害剤がルシフェラーゼ活性を用量依存的に減少させ、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がルシフェラーゼ活性を用量依存的に増大させることを確認した。

続いて第 3 章において申請者は、第 2 章で構築したレポーターアッセイを用いて微生物代謝産物から HIF-1 阻害物質の探索を行い、cinerubin が強い HIF-1 阻害活性を示すことを発見した。cinerubin は、抗癌治療において高い評価を得ているアンスラサイクリン系抗生物質の一種であるが、臨床では用いられていない。また、アンスラサイクリンによる HIF-1 阻害活性の報告がないことから、他の臨床に用いられているアンスラサイクリン系抗腫瘍抗生物質の HIF-1 阻害活性について検討を行なった。興味深いことに HIF-1 に対する阻害活性には差がみられ、cinerubin と者は、微生物代謝産物より低酸素細胞選択毒性を示す物質の探索を行い、rakicidin が低酸素細胞選択毒性を示すことを発見した。この微生物培養液から aclarubicin は強い HIF-1 阻害活性を示したが、doxorubicin と daunorubicin には弱い阻害活性しかみ

られなかった。これは、HIF-1の標的遺伝子であるVEGFのタンパク量をHepG2細胞でエライザ法により調べた結果と一致した。cinerubinはHIF-1阻害活性を示したが、HIF-1 α のmRNA量を解析したところ、cinerubinはHIF-1のmRNAには影響を及ぼしていないことが明らかになった。また、cinerubinは低酸素によるHIF-1 α タンパクの蓄積を阻害しており、転写レベルではなくタンパクレベルでの阻害が起こっている事を明らかにした。

続いて第4章において申請者は、微生物代謝産物からHIF-1阻害物質としてNBR1759-27を発見した。各種機器分析によりNBR1759-27の構造解析を行い、NBR1759-27は新規なホウ素を中心元素とするマクロジオリドであることを明らかにした。NBR1759-27はHIF-1 α のタンパク量を減少させていたが、HIF-1 α のタンパク量に影響を与えるNBR1759-27の用量は、HIF-1の転写活性のIC₅₀値より高く、他にも阻害機構があることが示唆された。また、NBR1759-27の抗腫瘍活性をマウスで解析した結果、LNCaPおよびBSY-1細胞移植マウスにおいてNBR1759-27は、腫瘍増殖を若干抑制した。

以上のように固形癌の低酸素という固形癌特有の環境を標的にし、微生物代謝産物から探索を行うことによりrakicidin、cinerubin、NBR1759-27の新しい生物活性を発見した。その過程で抗腫瘍効果の解明を行うことにより、選択毒性に優れた抗癌剤の開発に有益な指針を得ている。慎重に審議した結果、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学院連合農学科の博士(農学)の学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文は以下のとおりである。

1. Yamazaki (Momose) Yohko, Egawa Kiyoshi, Nose Kiyoshi, Kunimoto Setsuko, Takeuchi Tomio. HIF-1-dependent VEGF reporter gene assay by a stable transformant of CHO cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2003, 26 (4), 417-420.
2. Yamazaki (Momose) Yohko, Hasebe Yuki, Egawa Kiyoshi, Nose Kiyoshi, Kunimoto Setsuko, Ikeda Daishiro, Anthracyclines, small-molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 alpha activation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29 (10), 1999-2003.
3. Yamazaki (Momose) Yohko, Someno Tetsuya, Minamiguchi Kazuhisa, Kawada Manabu, Momose Isao, Kinoshita Naoko, Doi Hiroyasu, Ikeda Daishiro. Inhibitory activity of the hypoxia-inducible factor 1 pathway by tartrolone C. *The journal of antibiotics*, 2006, 59 (11) 693-697

その他の学術論文は以下のとおりである。

1. Momose Isao, Iinuma Hironobu, Kinoshita Naoko, Momose Yoko, Kunimoto Setsuko, Hamada Masa, Takeuchi Tomio. Decatromicins A and B, new antibiotics produced by *Actinomadura* sp. MK73-NF4 I. Taxonomy, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *The journal of antibiotics*, 1999,52

(9)781-786.

2. Hasebe Yuki, Egawa Kiyoshi, Yamazaki (Momose) Yoko, Kunimoto Setsuko, Hirai Yasuaki, Ida Yoshiteru, Nose Kiyoshi.
Specific inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α activation and vascular endothelial growth factor (VEGF) production by flavonoids. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2003,26 (10)1379-1383.
3. Kunimoto Setsuko, Lu jie, Esumi Hiroyasu, Yamazaki (Momose) Yohko, Kinoshita Naoko, Honma Yoshiko, Hamada Masa, Ohsono Michiyo, Ishizuka Masaaki, Takeuchi Tomio.
Kigamicins, novel antitumor antibiotics. I. Taxonomy, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *The journal of antibiotics*, 2003, 56 (12)1004-1011.
4. Kunimoto Setsuko, Someno Tetsuya, Yamazaki (Momose) Yohko, Lu Jie, Esumi Hiroyasu, Naganawa Hiroshi.
Kigamicins, novel antitumor antibiotics. II. Structure determination. *The journal of antibiotics*, 2003, 56 (12)1012-1017.
5. Lu Jie, Kunimoto Setsuko, Yamazaki (Momose) Yoko, Kaminishi Michio, Esumi Hiroyasu.
Kigamicin D, a novel anticancer agent based on a new anti-austerity strategy targeting cancer cells' tolerance to nutrient starvation. *Cancer Science*, 2004, 95 (6)547-552.
6. Kawada Manabu, Inoue Hiroyuki, Usami Ihomi, Takamoto Kozo, Masuda Tohru, Yamazaki (Momose) Yoko, And Ikeda Daishiro.
Establishment of a highly tumorigenic LNCaP cell line having inflammatory cytokine resistance. *Cancer Letters*, 2006, 242 (1)46-52.

