

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No

課題番号

20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	……	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	……	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	……	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	……	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	……	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	……	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	……	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	……	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	……	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	……	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	……	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	……	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	……	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	……	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	……	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	網脇 祥子	……	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	……	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	……	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	……	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	……	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	……	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	……	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	……	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	……	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	……	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	……	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索

所 属 国立感染症研究所 生物活性物質部
研究者 上原至雅

分担研究者

- | | |
|-------------------------------|-------|
| (1) 旭化成(株)ライフサイエンス総合研究所・創薬研究所 | 近藤修平 |
| (2) 昭和薬科大学・生化学研究室 | 土屋香誉子 |
| (3) 富山県立大学・工学部・生物工学センター | 古米 保 |
| (4) 昭和大学・薬学部・微生物薬品化学教室 | 野瀬 清 |

要旨

糸状菌等の微生物から細胞内シグナル伝達の特異的阻害剤の探索を行った。足場非依存増殖阻害とサイクリン阻害因子の転写誘導物質の探索において、活性物質生産の候補株について大量培養を行い、活性物質の分離精製と構造決定を行った。

1. 研究目的

細胞内シグナル伝達に作用する薬剤はさまざまな疾病の新しい治療薬になる可能性がある。本研究では、特に細胞の癌化にかかわるシグナル伝達と細胞周期制御因子の転写制御を標的に独自の活性評価系を利用し、創薬の宝庫である糸状菌や放線菌の代謝産物の中に新しい予防・治療薬シーズを探索することを目的とした。

2. 研究方法

1) 新しい検索系とシグナル伝達制御物質の探索

(1) polyHEMA 細胞培養法による癌化シグナル特異的阻害剤の探索とその作用機構

癌細胞の足場非依存性増殖を簡便・迅速に定量するために開発した polyHEMA 細胞培養法を用いて、癌化シグナル特異的阻害剤の探索を行い、阻害剤の作用を解析した。

(2) 細胞周期調節因子の転写制御の特異的修飾物質の探索

(ア) p21/WAF1、p16/Ink4a 遺伝子の転写制御領域をレポーターのルシフェラーゼ遺伝子に連結し、ヒト骨肉種細胞 Saos-2 に G418 耐性遺伝子と共に導入して、これらの遺伝子を安定に保持して発現する細胞クローンを分離した。

(イ) ヒト p27/Kip1 遺伝子転写制御領域を含む 3001bp [pGL3-3001S]断片をルシフェラーゼ遺伝子に結合したレポーター遺伝子をリポフェクション法によりヒト腎由来 293T細胞内に導入し、24 時間後に糸状菌由来プロスサンプル 1000 株を培地中に加え、24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。

2) サンプルの調整と活性物質生産株の大量培養および活性物質の単離精製

(1) 糸状菌

薬剤の探索源として各種分離法を駆使して分離した糸状菌 2000 株の培養上清液を用い評価を行った。培養再現性、活性の特異性評価を実施し、下記アッセイ系について夫々精製候補株を選定した。選抜した有効菌株については 5 リットルの大量培養を実施し、活性成分の精製を実施した。構造決定の為にサンプル取得の為に、2 株については更に 10 リットルの大量培養、精製を実施した。その結果、得られた化合物については各種機器分析を実施し、構造解析検討を試みた。

精製候補株

- ・ polyHEMA 細胞培養法による癌化シグナル特異的阻害剤の探索系：NA11299 株、NA11820 株
- ・ 細胞周期調節因子の転写制御の修飾物質の探索系：NA11350 株、NA11901 株

(2) 放線菌

放線菌由来の新規細胞内シグナル伝達阻害物質を効率的に探索するため、野性或いは栽培植物とそれらの根圏土壌から、放線菌や希少放線菌を選択分離することを工夫した。そして、1) 植物体由来の放線菌の培養エキスを調製し、2) 根圏土壌由来希少放線菌の培養エキスを調製した。加えて、微生物の併産する細胞毒性物質や脂肪酸類などの虚偽活性物質と本来の活性物質を分離するため、3) 多孔性樹脂を用いた分画サンプルを調製した。更に、有用な母核を探索するために、4) Lead 骨格になりそうな既知抗生物質を選びライブラリーの調製を行い、スクリーニングサンプルとして提供した。

polyHEMA 増殖の抑制を指標に、癌細胞の足場非依存性増殖を阻害する物質のスクリーニングを行った。次いで、得られた放線菌は、再培養による再現性の確認と独自に開発した高速液体クロマトグラフィーに於ける UV 吸収スペクトルと保持時間を利用した天然物同定システムによる分析 (Dereplication) を行い、既知生理活性物質を同定した後、アオキ (*Aucuba japonica* Thunb) の葉由来放線菌 TT-2149 株を選び、活性物質の単離・精製を試みた。

3. 研究成果

1) polyHEMA 細胞培養法による癌化シグナル特異的阻害剤の探索

polyHEMA 細胞培養特異的阻害剤を生産すると考えられた糸状菌 NA11299 株から活性成分の精製を実施した。本菌株が生産する活性成分は中性脂溶性と考えられ、pH7 酢酸エチル抽出画分を濃縮後シリカゲルカラムを用いて活性成分を精製した。NA11299 株 5 リットルの培養液より TLC 純度 90% 以上の活性成分を 4mg のオイル状物質として取得した。本化合物については現在構造解析中であり、NMR 解析からは長鎖のアルキルを部分構造に持つことが示唆された。更なる構造解析用サンプル取得の為、10 リットルの培養を実施し、活性成分の精製を実施中である。

一方、放線菌からは、合計 1,365 検体のスクリーニングを行い、植物体由来の放線菌 2 株と根圏土壌由来の希少放線菌 8 株に活性を認めた。そして、再培養では、植物体由来の TT-2111 株、TT-2149 株と根圏土壌由来の A-1639 株、A-1644 株に活性の再現性を確認した。次いで、得られた 4 株の活性物質を HPLC (HP-1090) による Dereplication 分析と HP-20 レジンをを用いた分画分析を行い、アオキの葉から分離した TT-2149 株の活性物質は HP-20 レジンに吸着し、メタノールで溶出されることが判明した。加えて、この活性物質は DLD-1, OVCAR-4 及び SK-OV-3 細胞でも poly-HEMA coating プレート上での足場非依存性増殖を阻害活性を示したが、TT-2111 株の生産する活性物質では、SK-OV-3 細胞のみに弱い阻害活性を示したため、TT-2149 株を単離・精製候補株として選択した。本株の産生する活性物質は、HP-20 樹脂に吸着後、MeOH で溶出され、n-BuOH で抽出されるが EtOAc では抽出されない、極性の高い脂溶性物質である。加えて、順相シリカゲルに不安定で、特徴的な UV 吸収を示さない、活性の高い物質と推定された。現在、単離・精製と構造解析を行っている。

2) 細胞周期調節因子の転写制御の特異的修飾物質の探索

p16 特異的誘導活性剤を生産すると考えられた NA11350 株と NA11901 株から活性成分の精製を実施した。両菌株が生産する活性成分は中性脂溶性と考えられ、両株共に pH7 酢酸エチル抽出画分を濃縮後シリカゲルカラムを用いて活性成分を分画した。分画した各活性成分を HPLC 分析した結果、両株の生産する活性成分は同一化合物と判断し、生産量の多い NA11901 株から活性成分の単離を試みた。NA11901 株 10 リットルの培養液よりシリカゲルカラムと分取 HPLC 精製を実施し、HPLC 純度 98% 以上の活性成分を 48mg の白色粉末として取得した。構造決定の為、本化合物をアルカリ加水分解し、得られたサンプルの各種機器分析を実施し、分解物の構造を決定した。得られた分解物の構造より、活性成分の推定構造を得た。得られた構造にて天然由来化合物検索を実施し、文献上の物性データを詳細に比較検討した結果、NA11901 株の生産する活性成分は 1944 年に報告された Chetomin (図 1) と同一物質と判断した。

一方、p27/Kip1 の誘導に関しては、糸状菌 1000 株の一次スクリーニングの結果、再現性よく 3-5 倍のルシフェラーゼ活性上昇を誘導する候補 2 株 (NA11299, NA11820) が得られた。この 2 株について、再培養サンプルについて検討したところ、2 株とも 5-6 倍の活性が認められ、さらに活性は 2 株とも pH2 および pH9 の酢酸エチル分画に存在し、活性物質は中性脂溶性と予想された。次に、物質の同定のため大量培養 TLC 分画サンプルについて検討を行ったところ、NA11820 についてのみ、3-4 倍の活性上昇を示す分画が認められた。本活性物質は polyHEMA 増殖阻害活性と同一と考えられる。

3) 活性物質の作用機序

ヒト癌細胞株間で増殖阻害効果に偏りの大きい thiazinotrienomycin B (TT-B) は、ヒト胃癌細胞 SC-6 の、血清により誘導される細胞周期の G0/G1 期から S 期への進行を、血清の濃度と拮抗的に阻害し、また、anti-EGF receptor 抗体もこの細胞周期進行を拮抗的に阻害したことから、TT-B は SC-6 細胞の EGF receptor に結合して EGF receptor の機能を低下させることにより、細胞増殖を阻害することが示唆された。また、ヒト乳癌細胞 BSY-1 の ノードマウスへの移植癌治療実験で、TT-B は単回投与で BSY-1 の増殖を完全に阻止した。

4. 考察

p16 誘導活性剤の探索から既知化合物ではあったが、目的とする強い活性を示す化合物が得られ、polyHEMA 細胞培養特異的阻害剤についても構造未決定ではあるが、有効成分を生産する菌株が得られた事より、糸状菌と放線菌を探索源に生物活性物質をスクリーニングする事は極めて有効であると考えられた。

放線菌の培養物を HP-20 樹脂による分画と酢酸エチル抽出し、この分画法の有効性を検討した結果、活性物質は溶媒極性に従い濃縮されて溶出することが判明した。次に、抗生物質活性の認められた画分を HPLC 分析した結果、検出されるピークは単純化されていた。従って、これは有用な分画方法と結論出来た。一方、植物由来の放線菌分離では、放線菌は試験した全ての植物から分離出来た。更に、植物根圏土壌を微粉末として分離平板に散布する方法は、簡便で有用な手法である。くわえて、根圏土壌からは植物体と異なる放線菌が分離できたことは特筆出来る。

TT-B は、DNA 合成を阻害しない濃度で EGF receptor の機能を低下させて胃癌細胞の増殖を阻害すると考えられる。また TT-B は、xenograft の癌治療実験で治療効果の見られた BSY-1 細胞では、cyclin を総体的に減少させて細胞周期を停止すると考えられる。

5. 結論

創薬のリード化合物を見出すため、新しい分子標的の研究、活性評価系の開発、活性物質の探索、単離、生物活性の研究を行った。評価に供した糸状菌 2000 株から polyHEMA 細胞培養特異的阻害剤を探索した結果、NA11299 株が有効と判断され、また p16 誘導活性剤を探索した結果 NA11350 株、NA11901 株が有効と判断された。polyHEMA 細胞培養特異的阻害剤については NA11299 株培養液 5 リットルより活性成分を単離し、構造解析中である。p16 誘導活性剤については、NA11350 株、NA11901 株の生産する活性成分の粗精製サンプルを HPLC 分析した結果、同一物質と判断され、NA11901 株培養液 10 リットルから活性成分を単離した。構造解析の結果、得られた p16 誘導活性剤は、Chetomin と同定された。微生物代謝産物は創薬の宝庫であり、実績が示すようにわが国は放線菌や糸状菌などの微生物から活性物質を探索する能力においては世界をリードしている。今後も、企業や大学との共同研究を通じて微生物資源を活用することが肝要であろう。

(イ) 研究発表

1. Endo, N., Tashiro, E., Umezawa, K., Kawada, M., Uehara, Y., Doki, Y., Weinstein, I., B. and Imoto, M. Herbimycin A induces G1 arrest through accumulation of p27Kip1 in cyclin D1-overexpressing fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 54-58, 2000.
2. Fukazawa, H. and Uehara, Y. U0126 reverses Ki-ras mediated transformation by blocking both MAP kinase and p70 S6 kinase pathways. *Cancer Res.* 60, 2104-2107, 2000.
3. Cho, S. I., Koketsu, M., Ishihara, H., Matsushita, M., Nairn, A. C., Fukazawa, H. and Uehara, Y.. Novel compounds, '1,3-selenazine derivatives' as specific inhibitors of eukaryotic elongation factor 2-kinase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1475, 207-215, 2000.
4. Ishino, K., Kaneyama, J-K., Shibamura, M. and Nose, K. Specific decrease in the level of Hic-5, a focal adhesion protein, during immortalization of mouse embryonic fibroblasts, and its association with focal adhesion kinase. *J. Cellular Biochem.* 76: 411-419, 2000.
5. Hosokawa, N., Iinuma, H., Takeuchi, T., Sato, S., Yamori T., Tsuchiya, S. K. & Hori, M. Anticancer and some biological activities of thiazinotrienomycin B. *J. Antibiotics* 53, 306-308 (2000)
6. Yoshida, R., Iida, T., Shibata, Y., Igarashi, Y., Sato, Y., Onaka, H., Kunoh H., & Furumai, T.: Studies on plant-associated actinomycetes and their secondary metabolites. 1. Plant growth-regulating activities in metabolites from actinomycetes. *Proceedings, 27th Annual Meeting, Plant Growth Regulation Society of America* p282 ~ 287 (2000)

7. Kim-Kaneyama, J., Nose, K., and Shibamura, M.: Significance of nuclear relocalization or ERK1/2 in reactivation of c-fos transcription and DNA synthesis in senescent fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 275: 20685-20692, (2000).
8. Mashimo, J., Shibamura, M., Satoh, H., Chida, K., and Nose, K.: Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse hic-5 gene that encodes a focal adhesion protein. *Gene*, 249: 99-103, 2000.
9. Ueno, M., Sonoda, Y., Funakoshi, M., Mukaida, N., Nose, K., and Kasahara, T. Differential induction of JE/MCP-1 in subclones from a murine macrophage cell line, RAW 264.7: Role of kB-3 binding protein. *Cytokine*, 12: 207-219, 2000.
10. Egawa, K., and Nose, K.: Involvement of stress-activated kinase p38 in p53-independent induction of p21/WAF1/Cip1 gene expression. *J. Health Sci.*, 46: 200-203, 2000.
11. Egawa, K., Yamori, T., Nosaka, C., Kunimoto, S., Takeuchi, T., and Nose, K.: Deoxynubomycin is a selective anti-tumor agent inducing apoptosis and inhibiting topoisomerase I. *Biol. Pharm. Bullet.*, 23: 1036-1040, 2000.
12. Nishiya, N., Tachibana, K., Shibamura, M., Mashimo, J., and Nose, K.: Hic-5 reduced cell spreading on fibronectin: Competitive effects between paxillin and Hic-5 through interaction with FAK. *Mol. Cell. Biol.* (in press)

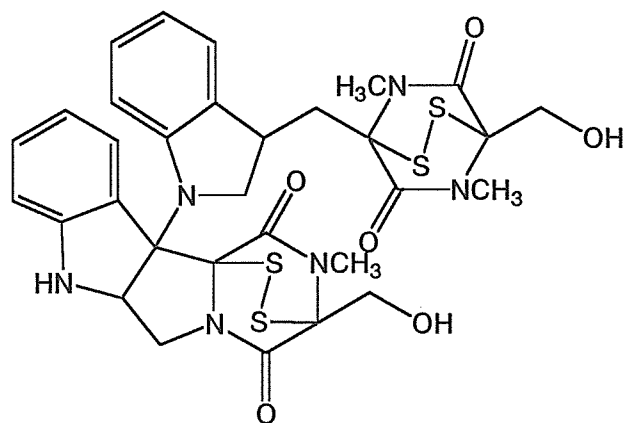


Fig. 1 Structure of Chetomin

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社