

対象研究テーマ： MT1-MMP の機能解析と分子標的治療法の開発

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：ヒトがん細胞を用いた抗転移性低酸素サイトトキシン類の開発

研究代表者：徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 准教授 宇都義浩

研究成果の概要：

本研究では、Akt 阻害活性を有する低酸素サイトトキシン類について種々のヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制作用および MMP 阻害活性を有する分子を探索した。その結果、TX-2137 および化合物 2（特許未出願のため名称は省略）が高い細胞増殖抑制作用と MMP-9 産生抑制作用を有することを見出した。両化合物は VEGF 誘導性の血管新生阻害と深く関係する Akt に対する強力な阻害剤でもあるので MMP 阻害とは別の経路での血管新生阻害活性が期待され、抗転移性制癌剤のリード化合物として期待される。

研究分野：創薬化学

キーワード： hypoxic cytotoxin、MMP inhibition

1. 研究開始当初の背景

がんはがん細胞だけでなく、血管や結合組織、免疫担当細胞といったがん周囲組織との相互作用の上で成り立っている。また、低酸素環境はがんの基本環境であり、低酸素環境および低酸素がん細胞が癌治療の分子標的として再認識されている。一方、セリン・スレオニンキナーゼである Akt は、増殖因子など様々な細胞外からの刺激により活性化され、白血球、線維芽細胞、血管内皮細胞、がん細胞の運動に重要であることが示されており、抗転移剤のターゲット分子として近年注目されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、低酸素がん細胞選択的な細胞毒性を有する低酸素サイトトキシン類に、MMP や Akt に対する阻害作用を付与した多機能性薬剤を分子設計・合成し、生物活性および作用機序を調べることで、より効果的な抗転移性抗がん剤を創製することである。

3. 研究の方法

2-Nitroaniline を出発原料として合成した 3-Chloro-1,2,4-benzotriazin 1-oxide と 4-Hydroxyaniline との反応により TX-2123 を得、次いで TX-2123 を酸化して TX-2137 を得た。また、1-(4-Piperidyl)-2-benzimidazolinone を出発原料として 3 工程で化合物 1 を得、次いで化合物 1 を酸化して化合物 2 を得た。MMP 阻害活性は HT-1080 細

胞を用いたザイモグラフィにより、Akt 阻害活性は U87 細胞を用いたウェスタンブロットにより評価を行った。in vitro における細胞増殖抑制活性はマウス黒色腫 B16-F10、ヒト線維肉腫 HT-1080、ヒト胃がん MKN-45 細胞を用いた MTT アッセイにより、また in vivo 抗転移活性は発育鶏卵モデルを用いた B16-F10 の肝転移巣の抑制試験により評価した。

4. 研究成果

TX-2137 および化合物 2 は AKT1/2 キナーゼ阻害剤と異なり Akt のリン酸化を抑制しなかったがタンパク発現量を低下させた。これと相関して転写因子 NF κ B の活性化型である phospho-p65、および転写因子 HIF-1 α の発現が抑制された。MMP 阻害剤である BB94 とは異なり、TX-2137 および化合物 2 は MT1-MMP による MMP-2 の活性化は阻害しなかったが、化合物 2 では MMP-9 産生の抑制効果が認められた。Akt のタンパク発現量の低下と MMP-9 産生の抑制効果の関連性については今後さらに検討する必要がある。TX-2137 および化合物 2 は B16-F10、HT-1080、MKN-45 細胞の増殖を抑制し、各細胞に対する IC50 値はいずれも 4 μ M 以下であった。さらに、TX-2137 および化合物 2 はアドリアマイシンと同程度の B16-F10 の肝転移巣に対する抑制効果を示した。結論として、Akt/MMP-9 阻害と細胞増殖抑制作用を併せ持つ新規抗転移性抗がん剤 TX-2137 および化合物 2 の創製に成功した。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Munakata R, Inoue T, Koeduka T, Sasaki K, Tsurumaru Y, Sugiyama A, Uto Y, Hori H, Azuma J, Yazaki K, Characterization of coumarin-specific prenyltransferase activities in Citrus limon peel, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1389-93, 2012.
2. Uto Y, Yamamoto S, Mukai H, Ishiyama N, Takeuchi R, Nakagawa Y, Hirota K, Terada H, Onizuka S, Hori H, β -Galactosidase treatment is a common first-stage modification of the three major subtypes of Gc protein to GcMAF, *Anticancer Res.*, **32**, 2359-64, 2012.
3. Morishige J, Uto Y, Hori H, Satouchi K, Yoshiomoto T, Tokumura A, Lysophosphatidic acid produced by hen egg white lysophospholipase D induces vascular development on extraembryonic membranes, *Lipids*, **48**, 251-62, 2013.
4. Hori H, Uto Y, Nakata E, Boron tracedrugs challenge for neutron dynamic therapy, *Anticancer Res.*, **32**, 2235-9, 2012.
5. Kawashima T, Manda S, Uto Y, Ohkubo K, Hori H, Matsumoto K, Fukuhara K, Ikota N, Onizuka S, Fukuzumi S, Ozawa T, Anzai K, Nakanishi I, Kinetics and Mechanism for the Scavenging Reaction of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical by Synthetic Artepillin C Analogues, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **85**, 877-83, 2012.

[学会発表] (計 9 件)

1. 発育鶏卵を工学的動物モデルとした制がん剤のメディシナルケミストリー、宇都義浩、遠藤良夫、久保健太郎、乾 利夫、堀 均、日本化学会第 93 春季年会 (2013 年 3 月、草津市)
2. 解糖系からみた癌増感のターゲット:糖修飾放射線増感剤のメディシナルケミストリー、宇都義浩、皆巳和賢、原田 浩、遠藤良夫、前澤 博、増永慎一郎、堀 均、第 15 回癌治療増感研究シンポジウム (2013 年 2 月、奈良)
3. FTY720 をリードとした血管新生阻害性 α -トコフェロール誘導体 UTX-93 の分子設

計、宇都義浩、田中 涼、田中大地、野口智帆、堀 均、第 24 回ビタミンE研究会 (2013 年 1 月、東京)

4. GcMAF含有ヒト血清のマクロファージ食食活性化能および抗腫瘍活性の評価、宇都義浩、向井大貴、石山統子、田中大地、久保健太郎、坂本憲広、乾 利夫、堀 均、第 16 回バイオ治療法研究会学術集会 (2012 年 12 月、東京)
5. beta-Galactosidase treatment is common modification method of three major subtypes of Gc protein to GcMAF in vivo、宇都義浩、堀 均、第 71 回日本癌学会学術総会 (2012 年 9 月、札幌)
6. Evaluation of in vivo antioxidative activity of O-TEMPO-RNP using our newly developed chicken egg assay、宇都義浩、安部千秋、吉富 徹、長崎幸夫、遠藤良夫、堀 均、The 16th biennial meeting for the Society for Free Radical Research International (2012 年 9 月、ロンドン)
7. HIF-1/GFP発現系を利用した腫瘍移植鶏卵における低酸素領域の解析と放射線による分布変化の観察、宇都義浩、田中大地、野口智帆、原田 浩、遠藤良夫、前澤 博、増永慎一郎、堀 均、第 18 回癌治療増感研究会 (2012 年 6 月、大阪)
8. イソプレノミクスを基盤としたプレニルアシルフロログルシノール類の合成と抗酸化活性の評価、宇都義浩、田中 涼、大仲 健太、堀 均、第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2012 年 6 月、徳島)
9. 血清Gc protein の糖鎖構造-マクロファージ活性相関解析と免疫賦活剤創生へのメディシナルケミストリー、宇都義浩、第 3 回グライコバイオロジクス研究会 (2012 年 6 月、徳島)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 准教授 宇都義浩

(2) 研究分担者

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 教授 堀 均

徳島大学先端技術科学教育部
博士後期課程 2年 田中 涼
徳島大学先端技術科学教育部
博士前期課程 2年 田中大地

(3) 本研究所担当者

細胞機能統御・教授 佐藤 博
中央実験施設・准教授 遠藤良夫