

学位論文題名

微生物の生産する新規抗癌物質および
抗アレルギー物質に関する研究

学位論文内容の要旨

微生物二次代謝産物は医薬品の探索源として重要であり、これまでに高脂血症治療薬プラバスタチン、免疫抑制剤サイクロスポリン、糖尿病治療薬アクラボス、抗肥満薬オルリスタットなどが開発され、臨床で使用されている。これまでに同定された微生物の割合は、自然界に存在が予想される全体から比較すると放線菌で約 10%、糸状菌で約 5%に過ぎないと推測されている。微生物は、今だ分離されていない菌株が多数存在し、新規化合物の探索源として興味深い。一方、近年のアッセイロボットによる自動化と反応系の微量化によって、アッセイの高速化と効率化、いわゆるハイスループットスクリーニング技術が進展し、一日あたり数千から数万個の化合物の生物活性測定が可能となった。そこで、筆者は新規メカニズムに基づく抗癌剤およびアレルギー性疾患治療剤を、微生物二次代謝産物からハイスループットスクリーニング技術を利用して探索した。

抗癌剤の探索

現在、臨床で用いられている抗癌剤の多くは、細胞毒性を指標にしたスクリーニングから見出されたものである。これらは正常細胞へも作用を示すため、副作用が大きな問題となっている。そのため、癌細胞特異的に作用する薬剤の研究が活発に進められており、近年、慢性骨髄性白血病治療薬である BCR-ABL チロチンキナーゼ阻害剤グリベックや肺癌治療薬である EGFR チロチンキナーゼ阻害薬イレッサといったシグナル伝達を選択的に阻害する分子標的薬剤が上市するようになってきた。そこで、筆者は、細胞増殖と分化に関わる癌細胞に特異的な遺伝子の転写調節物質に作用する癌細胞選択的な抗癌剤の探索を試みた。ルシフェラーゼアッセイで SV40 プロモーターを活性化する微生物二次代謝産物を探索した結果、未同定糸状菌 TC1630 株の培養液から TMC-205 を見出した。各種機器分析の結果、TMC-205 は 3-methyl-1,3-butadienyl 基を有する新規インドールアルカロイドであった。TMC-205 は 0.1 μM ~100 μM の範囲で濃度依存的にルシフェラーゼ活性の増強を示した。また、試験したすべてのヒトおよびマウス癌細胞株に対し、 IC_{50} が 50 μM ~200 μM と中程度の細胞障害活性を示した。作用メカニズムの解析を行った結果、TMC-205 は SV40 プロモーターと SV40 エンハンサーのいずれをも有するベクターを用いた場合には濃度依存的にルシフェラーゼ増強活性を示したが、SV40 エンハンサーがなく、SV40 プロモーターのみを有するベクターを用いた場合には全くルシフェラーゼ増強活性を示さなかった。SV-40 エンハンサーには癌細胞増殖抑制に関わる転写因子 AP-1, Sp-1 の結合部位が存在することが明らかになっている。したがって、TMC-205 の作用点は SV40 エンハンサー部位に結合するこれら転写因子に関連があることが示唆された。

アレルギー性疾患治療剤の探索

気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎などのアレルギー性疾患治療薬としてステロイドが汎用されている。ステロイド系薬剤は、非常に強力な抗アレルギー作用を示すが、種々の副作用があるために、非ステロイド性の薬剤開発が期待されている。筆者は、非ステロイド性アレルギー疾患治療薬の標的分子として免疫細胞の T 細胞から産生されるサイトカインである Interleukin-4 (IL-4) と Interleukin-5 (IL-5) に注目した。

IL-4 は、抗体産生細胞である B 細胞内シグナルを介し、アレルギー性疾患の発病に関わる Immunoglobulin E (IgE) の産生に重要な役割を果たす。筆者は IL-4 のシグナルを抑制する物質の探索を目的として、IL-4 シグナル伝達経路の転写因子である Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) の認識配列をもつルシフェラーゼベクターを作製し、IL-4 依存的なルシフェラーゼ発現を抑制する物質のスクリーニングを実施した。その結果、糸状菌 3 菌株から活性化化合物を単離し、その構造を各種機器分析により決定した。*Aspergillus niger* var *niger* TC 1629 株からは新規 naphtho- γ -pyrone 系化合物 TMC-256A1, C1, *Acremonium kiliense* TC 1730 株からは既知化合物 pramanicin の新規アナログ TMC-260、*Phoma* sp. TC 1674 株からは新規 dibenzo-pyran 系化合物 TMC-264 を見出した。これら 4 化合物は IL-4 依存的なルシフェラーゼ活性を選択的に阻害し、さらにヒト由来の B 細胞株である DND39 細胞において、IgE 産生に必須である内因性の germline C ϵ 遺伝子の発現を抑制した。TMC-264 の作用メカニズムを解析した結果、TMC-264 は STAT6 のリン酸化およびリン酸化 STAT6 と STAT6 認識配列との結合を選択的に阻害することが明らかとなった。TMC-264 と同様の炭素骨格を有する既知化合物として Alternariol が存在するが、この化合物が IL-4 シグナル伝達阻害作用を示さないことから、C-4 位の酸化と C-2 位への塩素付加が TMC-264 の IL-4 シグナル伝達阻害活性に関与していると予想される。低分子の Stat6 リン酸化阻害物質として Strictinin の報告があるが、その阻害作用は 50~100 μ M と非常に弱いのにに対し、TMC-264 は IC₅₀ が 1.6 μ M と強い活性を示した。TMC-264 は、今後の IL-4 をターゲットとした抗アレルギー疾患治療薬開発に有用な化合物として期待される。

IL-5 は気道局所への好酸球浸潤および好酸球の活性化や寿命延長を引き起こし、気管支喘息発症に関与する重要な因子である。筆者は IL-5 による好酸球の寿命延長を抑制する化合物を微生物二次代謝産物から探索した。スクリーニング方法としては、モルモットから調製した好酸球を用い、IL-5 添加による細胞生存期間の延長に対する微生物二次代謝産物の影響を調べた。その結果、糸状菌 *Aspergillus ustus* TC 1118 株の培養液から TMC-120A, B, C を見出した。TMC-120A, B, C は各種機器分析の結果、天然物としては初めて見出された furo[3,2-*h*]isoquinoline タイプの新規イソキノリンアルカロイドであることが判明した。TMC-120B は IC₅₀ が 2.0 μ M と最も強く寿命延長抑制活性を抑制した。各種誘導体を合成して構造活性相関を調べたところ、 α , β -不飽和ケトンが活性に重要であることが示唆された。TMC-120B は、細胞障害活性を示さなかったことから、選択的に好酸球内の IL-5 シグナル伝達経路を阻害し、好酸球寿命延長抑制作用を示すことが推測された。

以上のように、筆者は本研究で微生物二次代謝産物からユニークな生物活性を有する新規化合物を各種スクリーニング系によって見出した。これらの発見は今後の抗癌剤、アレルギー性疾患治療剤の開発研究に役立つものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 田 篤
副 査 教 授 川 端 潤
副 査 教 授 生 方 信

学位論文題名

微生物の生産する新規抗癌物質および 抗アレルギー物質に関する研究

本論文は、和文 111, 図 58, 表 25, 3 章からなり、参考論文 7 編が添えられている。

微生物二次代謝産物は医薬品の探索源として重要であり、これまでに高脂血症治療薬 プラバスタチン、免疫抑制剤サイクロスポリン、糖尿病治療薬アクラボス、抗肥満薬 オルリスタットなどが開発され、臨床で使用されている。微生物は、今だ分離されていない菌株が多数存在し、新規化合物の探索源として興味深い。一方、近年のアッセイロボットによる自動化と反応系の微量化によって、アッセイの高速化と効率化、いわゆるハイスループットスクリーニング技術が進展し、一日あたり数千から数万個の化合物の生物活性測定が可能となった。そこで、筆者は新規メカニズムに基づく抗癌剤およびアレルギー性疾患治療剤を、微生物二次代謝産物からハイスループットスクリーニング技術を利用して探索した。

抗癌剤の探索

現在、臨床で用いられている抗癌剤の多くは、細胞毒性を指標にしたスクリーニングから見出されたものである。これらは正常細胞へも作用を示すため、副作用が大きな問題となっている。そこで、筆者は、細胞増殖と分化に関わる癌細胞に特異的な遺伝子の転写調節物質に作用する癌細胞選択的な抗癌剤の探索を試みた。ルシフェラーゼアッセイで SV40 プロモーターを活性化する微生物二次代謝産物を探索した結果、未同定糸状菌 TC1630 株の培養液から新規インドールアルカロイド TMC-205 を見出した。さらに TMC-205 は試験したすべてのヒトおよびマウス癌細胞株に対し、 IC_{50} が $50 \mu M$ ~ $200 \mu M$ と中程度の細胞増殖抑制活性を示した。作用メカニズムの解析を行った結果、TMC-205 の作用点は癌細胞増殖抑制に関わる転写因子 AP-1, Sp-1 の結合部位が存在する SV40 エンハンサー部位に関連があることが示唆された。

アレルギー性疾患治療剤の探索

ステロイド系薬剤は、非常に強力な抗アレルギー作用を示すが、種々の副作用があるために、非ステロイド性の薬剤開発が期待されている。筆者は、非ステロイド性アレ

アレルギー疾患治療薬の標的分子として免疫細胞の T 細胞から産生されるサイトカインである Interleukin-4 (IL-4) と Interleukin-5 (IL-5) に注目した。

IL-4 は、抗体産生細胞である B 細胞内シグナルを介し、アレルギー性疾患の発病に関わる Immunoglobulin E (IgE) の産生に重要な役割を果たす。筆者は IL-4 のシグナルを抑制する物質の探索を目的として、IL-4 シグナル伝達経路の転写因子である Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) の認識配列をもつルシフェラーゼベクターを作製し、IL-4 依存的なルシフェラーゼ発現を抑制する物質のスクリーニングを実施した。その結果、*Aspergillus niger* var *niger* TC 1629 株からは新規 naphto- γ -pyrone 系化合物 TMC-256、*Acremonium kiliense* TC 1730 株からは既知化合物 pramanicin の新規アナログ TMC-260、*Phoma* sp. TC 1674 株からは新規 dibenzo-pyran 系化合物 TMC-264 を見出した。これら化合物はヒト由来の B 細胞株である DND39 細胞において、IgE 産生に必須である内因性の germline C ϵ 遺伝子の発現を抑制した。TMC-264 の作用メカニズムを解析した結果、TMC-264 は STAT6 のリン酸化およびリン酸化 STAT6 と STAT6 認識配列との結合を選択的に阻害することが明らかとなった。TMC-264 は、今後の IL-4 をターゲットとした抗アレルギー疾患治療薬開発に有用な化合物として期待される。

IL-5 は気道局所への好酸球浸潤および好酸球の活性化や寿命延長を引き起こし、気管支喘息発症に関与する重要な因子である。そこで筆者は IL-5 による好酸球の寿命延長を抑制する化合物を微生物二次代謝産物から探索した。その結果、糸状菌 *Aspergillus ustus* TC 1118 株の培養液から新規イソキノリンアルカロイド TMC-120 を見出した。TMC-120 は、細胞障害活性を示さなかったことから、選択的に好酸球内の IL-5 シグナル伝達経路を阻害し、好酸球寿命延長抑制作用を示すことが推測された。

以上のように本研究は、抗癌、抗アレルギー薬の開発に重要な知見を提供するものである。特に新しいアッセイ系を開発し、ハイスループットのスクリーニングを実施して多数の新規化合物を含む微生物代謝産物を見いだしたことは、微生物学的にも天然物化学的にも大変意義ある学術的基礎知見を提供している。

よって審査員一同は、櫻井政昭が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。