

論文の内容の要旨

論文題目 微生物の生産する新規微小管重合促進物質 FR182877 に関する研究

氏名 佐藤文治

癌は日本人の死亡原因の1位を占め、なおかつその数は年々増加している。癌の治療において、癌化学療法が重要な役割を果たしているのはいうまでもない。外科的切除によって取り除けない、あるいは取り残した癌や、浸潤・転移などによって全身に播種された癌細胞を根絶しうるのは、癌化学療法剤によってのみ可能である。しかしながら、白血病や一部の固形癌を除き、多くの固形癌に対して有効な癌化学療法剤はほとんど存在しない。従って、難治性の固形癌に対して有効で、患者の Quality of life(QOL)に配慮した、すなわち副作用の少ない作用機序を有する抗癌剤が医療ニーズとして強く望まれている。

1980年代以降の分子生物学の急速な進歩により、癌細胞はその細胞周期が正常に調節できなくなったために無秩序な増殖を繰り返す細胞であることがわかってきた。それに伴い、分子標的という概念が導入されている。それは、細胞内の特定の分子を抗癌作用の標的として、それに対する薬剤を探索する手法である。近年臨床で使用されるようになったタキソールは、これまであまり効かなかった乳癌や卵巣癌に対して有効性を発揮する薬剤であり、その分子標的は微小管で、これまでの微小管作用物質とは異なり微小管重合促進という作用機序を持つ。しかし、タキソールは微小管重合促進以外にもマクロファージ活性化、アポトーシス誘導作用など、多くの作用をあわせ持つため、タキソールの強力な臨床の抗癌活性が微小管重合促進だけで全て説明できるかどうかいまだに明らかになっていない。それに加えて、タキソールには溶解性の悪さ、LPS様の炎症作用、原料供給などの問題点も存在する。そこで、タキソールとは異なる骨格を持つ微小管重合促進物質を探索し、その物質の抗癌効果を明らかにすることによりタキソールの臨床での抗癌効果の本質

が微小管重合促進で説明できるかどうかを明らかにできると考えられる。また、それをきっかけにしてタキソールよりも優れた効果と少ない副作用をもつ癌化学療法剤を開発することが可能になる。そこで著者は微小管を分子標的として選択し、新規微小管作用物質、特にタキソール同様に微小管重合を促進する物質をスクリーニングすることを目的として本研究を行った。

本論文では、新たに開発したスクリーニング法を用いた微生物産物からの微小管重合促進物質のスクリーニングにおいて新規微小管重合促進物質 FR182877 を見だし、その生産菌の同定、培養、単離精製、構造解析、生物活性について研究を行った。結果を以下に要約する。

第一章

微小管作用物質が BHK-21 細胞に対して、きれいな丸い変形を示すこと及び多核化を起こすことはすでに知られていることであるが、この系では微小管重合阻害か重合促進かはわからない。今回著者は、BHK-21 細胞における微小管重合促進物質タキソールを用いた実験から、微小管の重合阻害物質と重合促進物質を効率よく見分け、微小管重合促進物質のスクリーニングを行える系を構築した。約 20000 検体の微生物産物のスクリーニングを行った結果、徳島県の土壌より分離された放線菌 No. 9885 株の培養液中に新規微小管作用物質 FR182877 を見いだした。

第二章

新規微小管作用物質 FR182877 の生産菌の同定を行った。この生産菌である放線菌 No. 9885 株は、形態学的観察、培養性状、生理試験などの特徴から、*Streptomyces* 属に属すると考えられた。従って、この菌株を *Streptomyces* sp. No. 9885 株と同定した。しかしながら、本菌株にはグリセロール資化性がない。グリセロール資化性がない *Streptomyces* 属は報告がなく、その点において珍しいといえる。

第三章

Streptomyces sp. No. 9885 株のジャーファーマンターを用いた培養を行い、ブロス 100 L から培養液を溶媒抽出し、活性画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーにより精製し、酢酸エチルから粉末化して FR182877 を 238 mg 単離した。培養経過において、No. 9885 株の培養物の pH は、pH を調節するような緩衝液が入っていないにも関わらず、pH 6 付近を推移した。FR182877 の生産は、培養 2 日目より始まり、5 日目ではほぼピークに達し、その後減少した。

第四章

第三章で単離した FR182877 の構造解析を行った。各種機器分析のデータから、

FR182877(1)の部分構造は解明できたが、1は不安定で徐々に分解したため、アセチル化により2つのアセチル化物182877-Ac-1(3)と182877-Ac-2(2)を得て、2の構造解析により平面構造の推定を、3の構造解析により相対立体配置の推定を行った。3の推定した相対立体配置が正しいことは、最終的にX線結晶解析により確認した。それを元に3と2、さらには2と1の関係を推論し、Fig. 1のように1のジアセチル体である2がエポキシ化して3が生じた、あるいは単離していないが1がエポキシ化してできた物質182877-epoxide(4)のジアセチル体が3であると推定した。1および2は高度にゆがんだβオキシ不飽和エステル構造を有していることから、酸化を受けやすく、4や3に変換しやすいものと考えられた。なお、エポキシ化と生物活性の関係であるが、3には細胞傷害性はほとんどなく、2は1よりも2~5倍程度活性が低下していただけであった。このことから、歪んだ二重結合が強力な活性の発現に寄与していると考えられる。

第五章

FR182877の生物活性を*in vitro*および*in vivo*の両面で検討した。FR182877は、*in vitro*においてヒト固形癌を含む各種癌細胞に対して21-73 ng/mlのIC₅₀値で抗癌活性を示し、正常細胞であるマウス骨髄細胞の細胞毒性600 ng/mlとの間には約10倍の選択性があった。次にFR182877の作用点の解析を行った。FR182877は、HT-29細胞の細胞周期遷移をG₂/M期で停止させ、微小管作用物質である可能性が高くなった。そこで精製チューブリンタンパク質を用いてチューブリン重合に対する作用をみると、タキソールと同様にチューブリンの重合を促進した。しかし、チューブリンの重合促進の速度論において、FR182877による重合促進には5分程度のタイムラグが存在し、これまでに報告されている微小管重合促進物質と作用機作が若干異なっていた(Fig. 2)。なお、FR182877のチューブリン結合部位は、放射性ラベルしたタキソールを用いての結合競合実験をしていないので同定できていない。

次に、FR182877の*in vivo*での抗癌活性を調べた。癌化学療法剤の評価に一般的に用いられているマウス白血病細胞P388に対し、FR182877は1.6 mg/kgから6.3 mg/kgでT/C 130%と有意な延命効果を示した。また、マウス大腸癌細胞Colon 38及びマウス悪性黒色種細胞B16に対しても1用量だけではあるが有効性を示した。しかし、本物質は*in vivo*での毒性が強いため、有効用量範囲が狭く、これ以上の開発は断念せざるを得なかった。

以上、著者は新たに開発した微小管重合促進物質のスクリーニング系において、新規微小管重合促進物質FR182877の取得に成功した。FR182877は、新規骨格を有することおよび微小管重合促進において既知の薬剤とは異なる速度論を示したことから、今後はFR182877のチューブリン結合部位及び微小管重合促進のタイムラグの原因を解明し、さらには誘導体研究により*in vivo*毒性の弱い誘導体を取得して微小管重合促進と抗癌活性の関係を明らかにして、最終的にはタキソールよりも優れた抗癌剤の開発につなげていきたいと考えている。

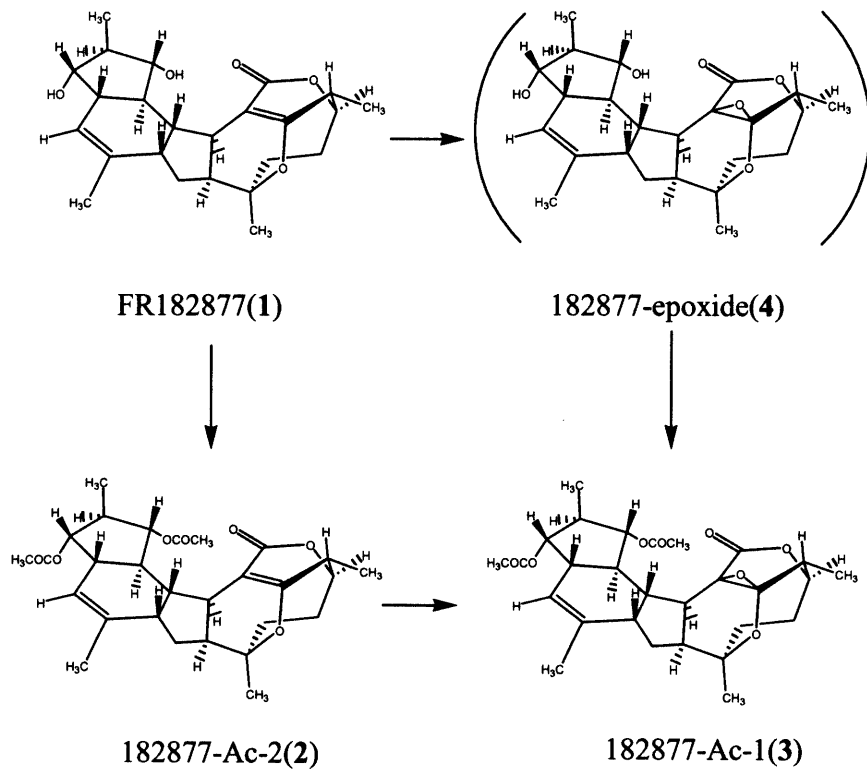


Fig. 1 FR182877 の構造とその誘導体の生成過程

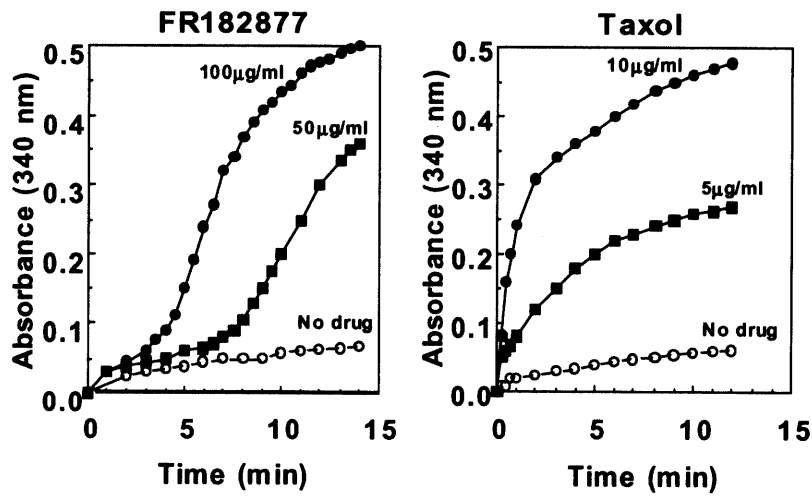


Fig. 2 FR182877 のチューブリン重合促進の速度論