

[別紙 1]

論文内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 12 年度博士課程進学

氏名 山下高広

指導教員 松永茂樹

論文題目

Studies on metabolites with anti-angiogenic activities from marine organisms

(海洋生物由来の血管新生阻害物質に関する研究)

海洋生物はユニークな構造と強力な生物活性を有する化合物の宝庫であると言われ、医薬品素材などの探索源として注目されている。Folkman らによるエンドスタチンとアンジオスタチンの報告以来、ガン治療における新たなターゲットとして血管新生が注目され、その阻害剤の探索が活発に行われている。血管新生は、内皮細胞の活性化に始まり、基底膜の消化、内皮細胞の遊走、そして管腔の形成という過程からなるが、現在、臨床試験中の血管新生阻害剤の多くがこの前半部をターゲットにしており、後半過程に対する阻害剤の報告は少ない。そこで、本研究では血管新生後期過程に注目し、血管内皮細胞の遊走と管腔形成に対する阻害活性を指標として、スクリーニングを行った。一方、細胞の遊走に関与することが知られているカテプシン B に対する阻害スクリーニングも並行して行い、海洋無脊椎動物から血管新生阻害剤を探索した。概要は以下の通りである。

1. 管腔形成阻害活性試験法の確立

細胞毒性を示すサンプルは血管内皮細胞に対する細胞毒性のため、管腔形成試験において擬似陽性を示す可能性がある。そこで、試験法に改良を加え、プレインキュベーションを行うこととした。すなわち、ディッシュ上に血管内皮細胞を播種し、サンプルを投与後 24 時間インキュベートした。この段階で、細胞が死滅したサンプルを細胞毒性を示すサンプルとし、以下の実験に供さなかった。ついで、細胞をトリプシン処理し、あらかじめマトリゲルを敷いておいたディッシュ上に播種した。サンプルの存在下、24 時間インキュベートし、管腔形成の有無を顕微鏡にて観察した。

2. スクリーニング

伊豆諸島、伊豆半島、九州、四国、南西諸島など日本各地で採集した 197 検体の海洋無脊椎動

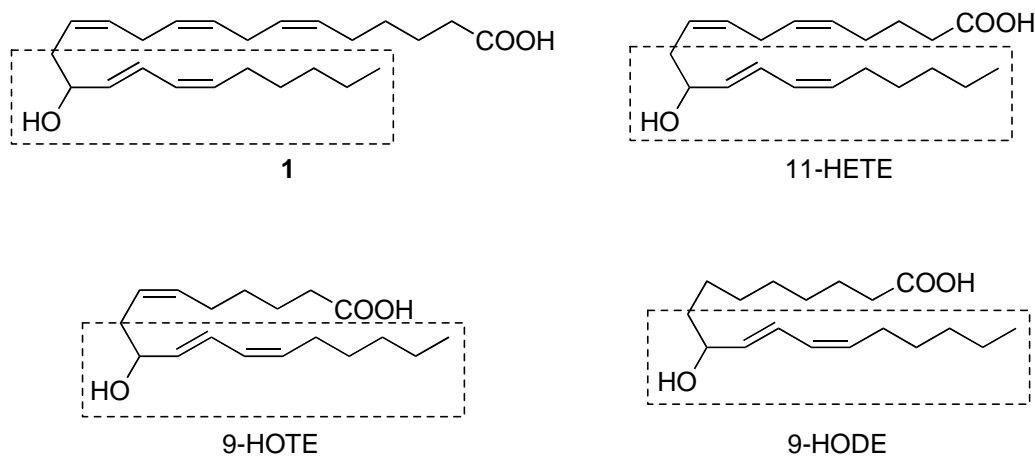
物の抽出物から水溶性画分および脂溶性画分を調製し、P388 マウス白血病細胞に対する細胞毒性を指標とした一次スクリーニングを行った。一次スクリーニングで細胞毒性を示したサンプルを除いた 138 検体について、上述の管腔形成阻害スクリーニングを行った。スクリーニングの結果、37 検体に活性が認められた。一方、カテプシン B に対する阻害活性を指標として、上述の 197 検体についてスクリーニングを行い、40 検体に活性を認めた。これらの検体を原料として活性成分の単離・構造研究を行った。

3. 既知化合物の管腔形成阻害物質としての再発見

鹿児島県中甕島産の 2 種の海綿から、既知のヒドロキノン誘導体 3 種および環状デブシペプチドの jaspamide を活性成分として得た。これらは 1-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と低濃度で管腔形成阻害活性を示した。

4. 鹿児島県中甕島産ソフトコーラル *Sinularia* sp. からの新規 C_{24} オキシリピンの単離および構造決定

鹿児島県中甕島産のソフトコーラル *Sinularia* sp. (湿重量 310 g) をメタノールで抽出後、水とクロロホルムで二層分配して得た有機層をヘキサンと 90%メタノール、さらに水層をクロロホルムと 60%メタノールでそれぞれ二層分配した。活性を示したクロロホルム層をCPCで分画後逆相HPLCで精製して、既知のオキシリピンである 11-HETEおよび 9-HOTEとともに、 C_{24} の炭素鎖からなる新規オキシリピン 1 を活性成分として単離した。オキシリピン 1 の分子式はHRMSおよび NMRデータから $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_3$ と決定した。二次元NMRデータを詳細に解析して、1 に示すような構造を有することを明らかにした。



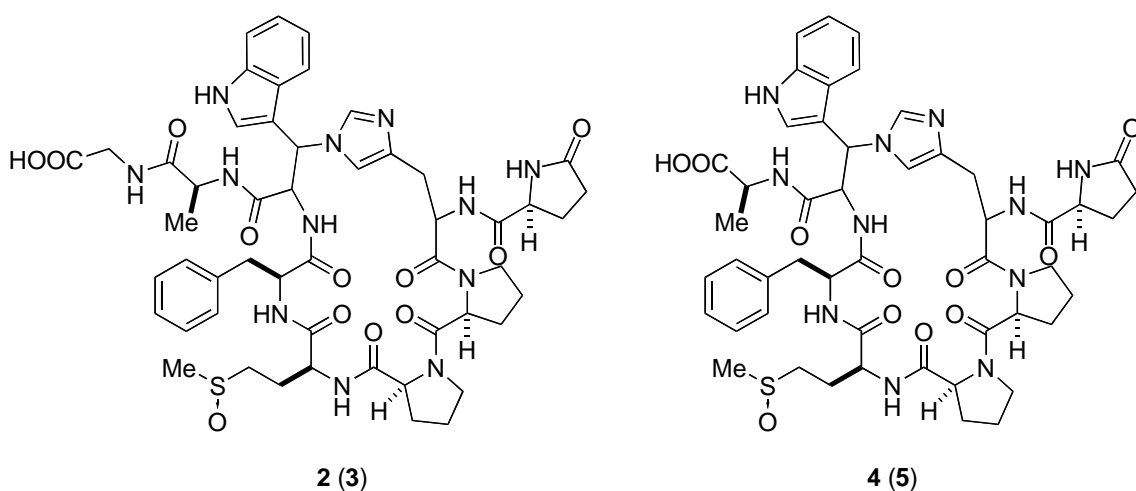
この化合物は 15 位に二級水酸基を有するため、改良 Mosher 法による絶対配置の決定を試みた

が、化合物が不安定なため MTPA エステルを調製できなかった。そこで、化学分解による絶対配置の決定を試みた。すなわち、メチル化後還元的オゾン分解、ついでプロモベンゾイル化を行い、ブタン-1,2,4-トリオールの特リプロモベンゾエートを調製した。キラルカラムを用いる HPLC で標品と比較したところ、本化合物はラセミ体であることが判明した。したがって、化合物 1 もラセミ体であると結論づけた。この結果は、化合物 1 が旋光性を示さないことと矛盾しない。

化合物 1 は 25 μM の濃度で管腔形成を阻害した。また、同時に単離した 11-HETE および 9-HOTE もそれぞれ 25 μM の濃度で活性を示した。そこで、これら 3 つの化合物と共通の部分構造を有する 9-HODE について調べたところ、やはり 25 μM の濃度で活性が認められたことから、この共通部分が活性発現に必要なユニットであることが示唆された。なお、DHA、EPA およびアラキドン酸などの高度不飽和脂肪酸は弱い活性を示すにとどまった。

5. 鹿児島県口之永良部島産海綿からの新規ペプチド化合物 2・5 の単離および構造決定

鹿児島県口之永良部島産未同定海綿の粗抽出物は、管腔形成およびカテプシン B の両者を阻害した。そこで、本海綿 (湿重量 1.5 kg) を水、メタノールおよびクロロホルムで順次抽出した。それぞれの溶媒による抽出物を別個にクロロホルムと水による二層分配に付し、得られた水層をさらにブタノールで抽出した。このようにして得た 12 画分のうち、活性は 3 つの水層にのみ認められたので、これらを合一した。これを ODS フラッシュクロマトグラフィーならびに逆相 HPLC を用いて繰り返し精製し、4 種の新規ペプチド (2-5) をそれぞれ 7.4 mg、6.0 mg、8.0 mg および 6.8 mg の収量で得た。これらのペプチドは管腔形成を阻害しなかったが、カテプシン B を阻害した。



化合物 2 の分子式は HRMS データから $\text{C}_{51}\text{H}_{62}\text{N}_{12}\text{O}_{13}\text{S}$ であることが判明した。また、NMR データより 9 個のアミノ酸からなるペプチドであることが示された。さらに、二次元 NMR データを詳細に解

析したところ、グルタミン酸、ヒスチジン、チロシン、アラニン、グリシン各1残基とプロリン2残基を含むこと、また、通常のアミノ酸のほかにトリプトファンのε位がヒスチジンのε位の窒素と結合した珍しい構造を含むことが判明した。一方、メチオニンのγ位の化学シフト値から、メチオニンはスルホキシドに酸化されていることが示唆された。化合物2をヨウ化アンモニウムで還元した後に酸加水分解に付した。酸加水分解物を誘導体化後、キラルカラムを用いるGC分析に付すことで、すべてのアミノ酸がL型であることを明らかにした。なお、側鎖間で共有結合を形成する異常アミノ酸の立体化学は現在検討中である。NOESYおよびHMBCデータなどから、アミノ酸の結合順を明らかにした。本化合物がニンヒドリン陰性であることから、N末端のグルタミン酸残基がピログルタミン酸になっているものと予想しているが、現在、この点を解明するための実験を進めている。

化合物3は、化合物2のメチオニンスルホキシド中の硫黄原子における立体異性体であった。化合物4および5は、化合物2および3のC末端のグリシン残基がそれぞれ欠落した化合物であった。化合物2・5のカテプシンBに対する IC_{50} 値はいずれも25 μMであった。

以上に示したように、本研究において管腔形成阻害を調べる生物試験法を確立し、この方法を用いて海産無脊椎動物の抽出物のスクリーニングを行った。また、同時に、細胞の遊走に関わる酵素のカテプシンBに対する阻害活性を指標としてスクリーニングを行い、それぞれの生物試験において活性を示した検体に含まれる有効成分の探索を行った。この結果、11種の活性化合物を単離し、そのうちの新規化合物5種の化学構造を決定した。