

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山下 高広

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)

海産無脊椎動物は、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用いられている。一方、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、その阻害剤はガン細胞でなく正常細胞を標的とするため、薬剤耐性が生じないこと、および、既存の抗ガン剤との併用が可能であることなどから、内因性のタンパク質や微生物由来の二次代謝産物などから、有効な薬剤の探索が続けられている。本研究では、海産無脊椎動物、特に、海綿および刺胞動物から、血管新生阻害物質の探索を行った。具体的には、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、有効成分の単離・構造決定を行う一方、細胞の遊走に関与するといわれる酵素のカテプシン B に対する阻害物質も探索した。

細胞毒性を示すサンプルは、その毒性のため、管腔形成試験において擬似陽性を示すことがある。そこで、試験法にプレインキュベーションを導入し、細胞が死滅したサンプルをあらかじめ除去した上で、管腔形成阻害スクリーニングを行った。日本各地で採集した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、一次スクリーニングで細胞毒性を示したサンプルを除き、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。

まず、鹿児島県中甕島産の未同定海綿から、既知のヒドロキノン誘導体 3 種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。

次いで、鹿児島県中甕島産のソフトコーラル *Sinularia* sp. に含まれる活性成分の単離・構造決定を行った。このソフトコーラル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} の新規オキシリピンを活性成分として単離した。この分子式

はHRMSおよびNMRデータから $C_{24}H_{38}O_3$ と決定し、二次元NMRデータからこの化合物をtetracos-15-hydroxy-6,9,12,16,18-pentaenoic acid (15-HTPE)と帰属した。15位の二級水酸基の絶対配置は、化学分解により決定した。すなわち、カルボキシル基をメチル化後、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-トリオールト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、今回単離した15-HTPEもラセミ体であると結論づけた。15-HTPEは25 μ M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 μ M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 μ M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。

鹿児島県馬毛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の両者を阻害したため、これらの活性成分の探索を行った。まず、本海綿の抽出物を溶媒分画に付し、そこで得られた水画分を各種クロマトグラフィーを用いて精製し、magejimide A-Dと命名した4種の新規ペプチドを得た。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。Magejimide Aは分子式が $C_{51}H_{62}N_{12}O_{13}S$ で、NMRデータから9個のアミノ酸を含むペプチドであることが示された。さらに、二次元NMRデータを解析し、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が β 位がヒスチジンの τ 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された。酸加水分解物のキラルGC分析から、すべてのアミノ酸がL型であることを示した。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、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た。Magejimide Bは、magejimide A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。Magejimide CおよびDは、magejimide AおよびBから、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。Magejimide類のカテプシンBに対する IC_{50} 値はいずれも25 μ Mであった。

本研究において、管腔形成阻害活性生物試験法を確立し、この方法および酵素阻害試験を用いて海綿およびソフトコーラルから血管新生阻害剤の候補となりうる化合物を合計10種単離し、新規化合物の構造決定を行った。海洋生物から血管新生阻害剤を探索した例は他になく、本研究は、海産無脊椎動物が、血管新生阻害剤の有望な探索源となりうることを初めて示した意義深い研究である。したがって、審査委員一同は学位(農学)を与えるにふさわしい内容であるものと判断した。