

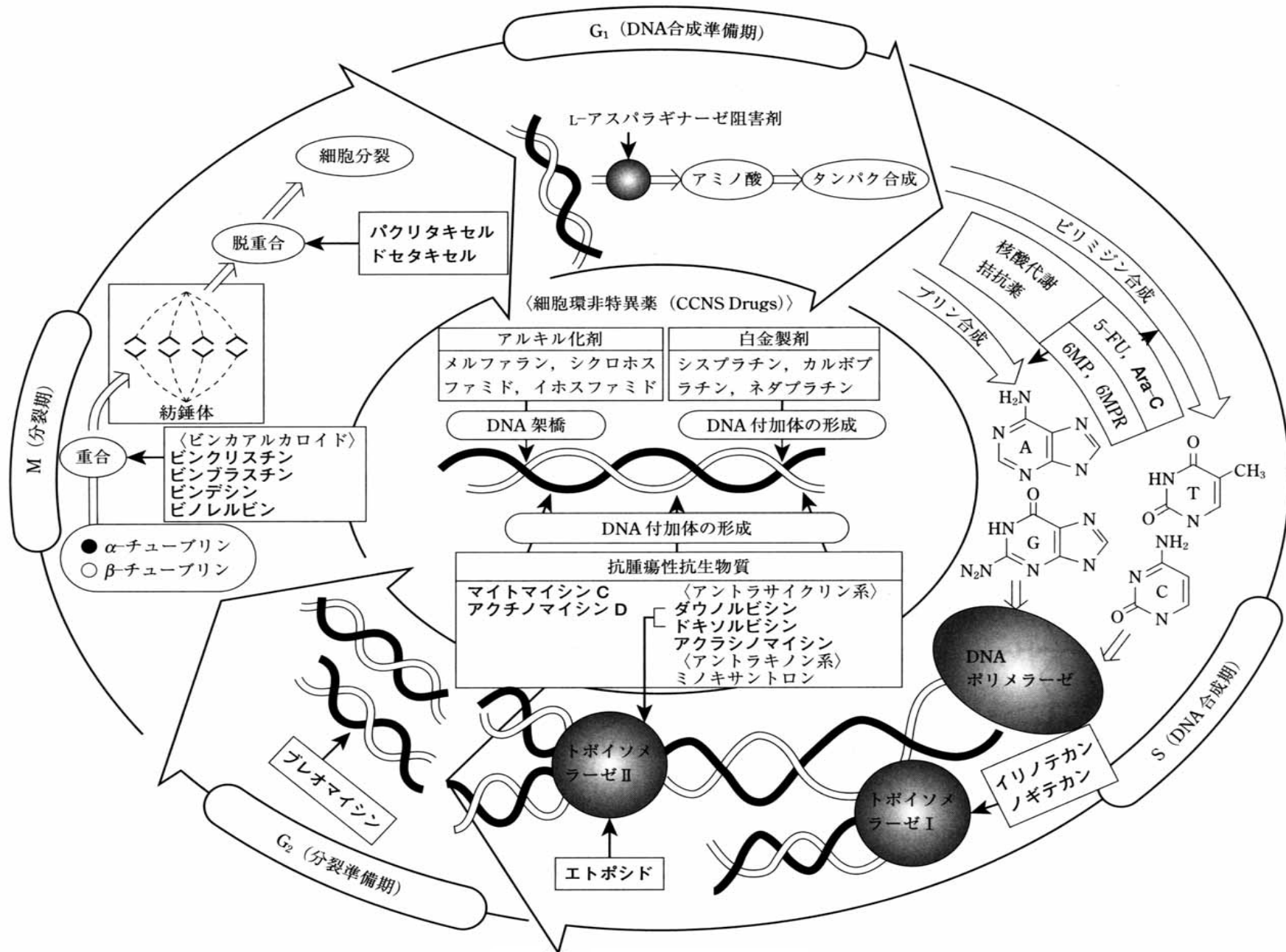
# 抗がん剤と天然物

- 古典的薬剤から分子標的薬まで -

兵庫医療大学薬学部 青木 俊二

# 古典的抗がん剤としての天然物

# 細胞分裂と抗がん剤の作用点

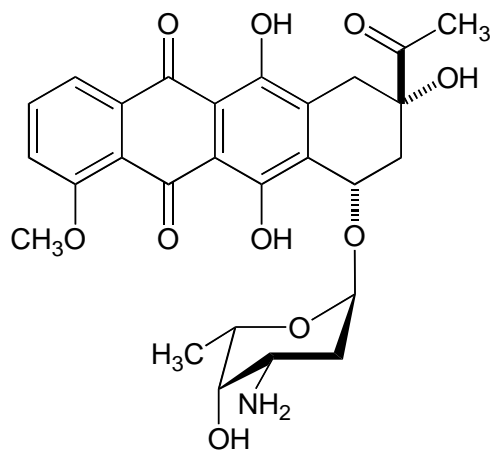
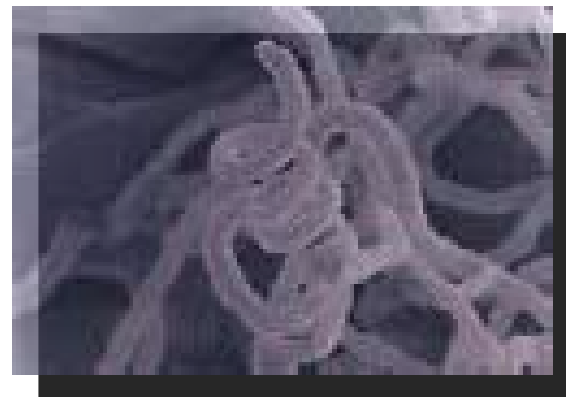


# DNA に直接作用する抗がん剤 (抗腫瘍性抗生物質)



放線菌  
(*Streptomyces sp.*)

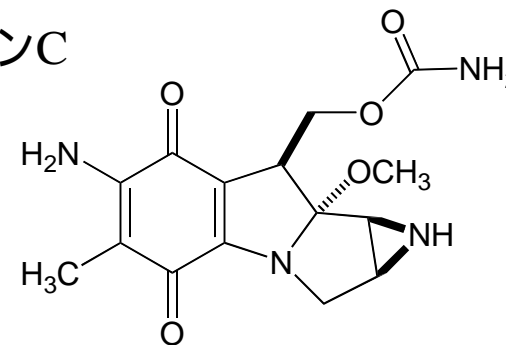
放線菌  
(*Streptomyces caespitosus*)



ドキソルビシン  
(アドリアマイシン)

乳癌、胃癌、肺ガンなど

マイトマイシンC



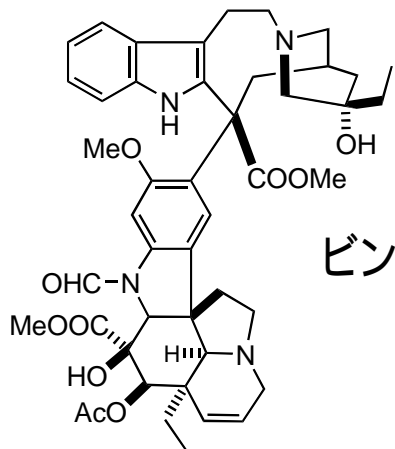
慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病

DNAに直接的に相互作用して、DNAの複製を妨げることでガン細胞の増殖を阻害する。

# 微小管 (tubulin) に作用する抗がん剤



ニチニチソウ  
(*Vinca rosea*)

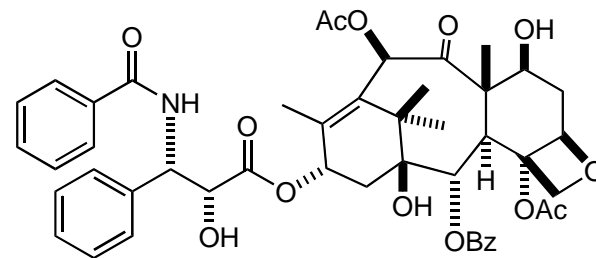


ビンクリスチン

白血病や悪性リンパ腫



イチイ (*Taxus brevifolia*)



乳ガン・卵巣ガン

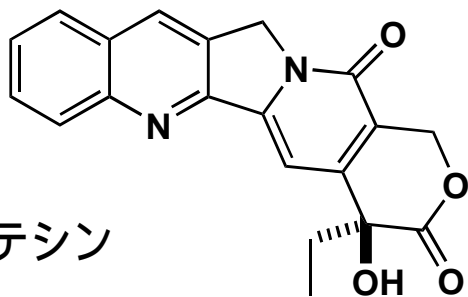
タキソール

微小管 (tubulin) は、細胞分裂の際に2倍体になった染色体を両極に引っ張る紡錘糸を構成する重要なタンパクで、これらの抗がん剤は、微小管の形成を阻害する。

# DNAトポイソメラーゼを阻害する抗がん剤



カンレンボク (*Camptotheca acuminata*)

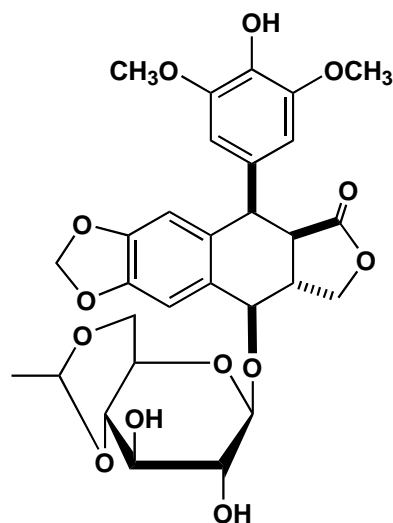


カンプトテシン

臨床では、誘導体のイリノテカンやSN38が使われている。



ポドフィルム根  
(*Podophyllum peltatum*)



エトポシド (VP16)

ポドフィルム根に含まれる podophyllotoxin の誘導体

トポイソメラーゼは、DNAの複製時にDNA2重らせんを解いたり巻き戻したりする酵素で、これを阻害することでDNAの複製が妨げられ、細胞分裂は停止する。

# 分子標的抗がん剤とは？

## 古典的抗がん剤

その作用点は、正常細胞にも普遍的に存在する細胞分裂のメカニズムであることがほとんど。



正常細胞も殺してしまうので副作用大

## 分子標的抗がん剤

ガン細胞に存在する正常細胞との相違点に特異的に作用することを目標に開発。



ガン細胞特異的に働くので、正常細胞へのダメージが少ない(はず・・・)。

# 分子標的抗がん剤の標的とは？

これについては、現在も精力的な研究が行われています。(発展途上)

## ・異常な増殖シグナル伝達系を抑制する薬剤

グリベック → 慢性骨髄性白血病の原因であるBCR-Ablタンパクの特異的な阻害剤

ハーセプチン → 乳がん細胞の増殖に関わる受容体タンパクHER-2の抗体

## ・細胞周期制御をターゲットとする薬剤(分化誘導剤)

ボリノスタット → ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)の特異的な阻害剤

## ・腫瘍血管新生をターゲットとする薬剤

アバスチン → 血管新生因子VEGFの抗体

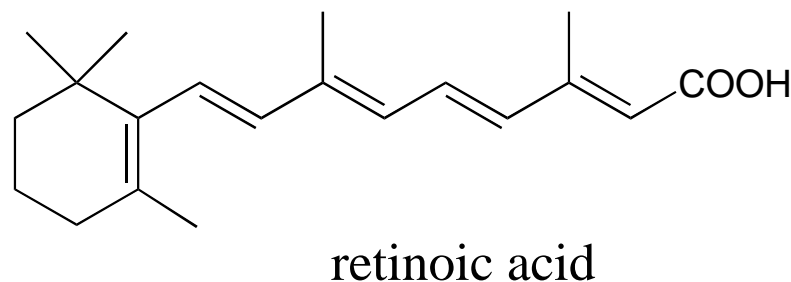


# 分子標的抗がん剤としての天然物

レチノイン酸 (all-trans retinoic acid, ATRA = 活性型ビタミンA)

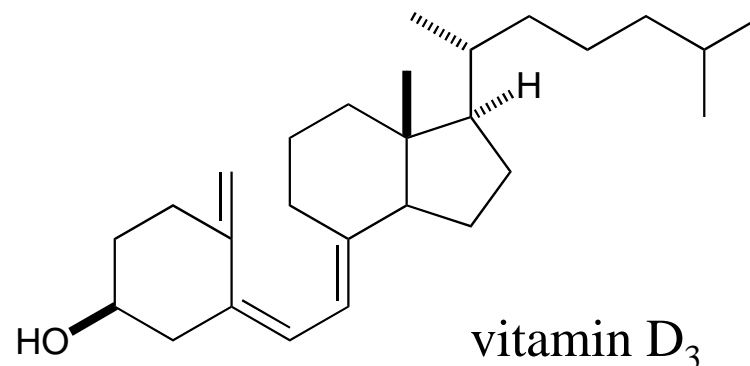
## 急性前骨髄性白血病(APL)の治療薬

APLは、レチノイン酸受容体遺伝子の異常によって引き起こされる疾病であるが、ATRAを大量に投与することで異常な増殖を停止し脱がん化(分化誘導)することが明らかになっている。



## 活性型ビタミンD

乳癌、前立腺癌の治療に臨床で用いられている例あり。



# 分子標的抗がん剤リード化合物の探索(私の研究例)

がん細胞に毒性を示す化合物



altohyrtins, arenastatin A, callystatin A

## がん細胞に対する分化誘導物質

・各種白血病細胞 (K562, HEL, U937, HL60)  
に対する分化誘導物質



**smenospongine** (赤芽球様分化)

hymenialdisines (マクロファージ様分化)  
misakinolides

・神経芽細胞腫 (SH-SY-5Y, Neuro2A, PC12)  
に対する分化誘導物質



**lembehynes**

## がんの血管新生阻害物質

・ヒト臍帯静脈内皮血管 (HUVEC) に対する選択的増殖抑制物質  
(血管内皮細胞増殖因子 (VEGF, b-FGF)の阻害物質)



**bastadins**

・チミジンホスホリラーゼの阻害剤



lembehsterols

## 多剤耐性がん細胞に対する耐性克服物質

・がんの多剤耐性に関わるトランスポーター  
の特異的な阻害物質



araguspongines, brianthein A  
(P-glycoprotein に対する阻害剤)

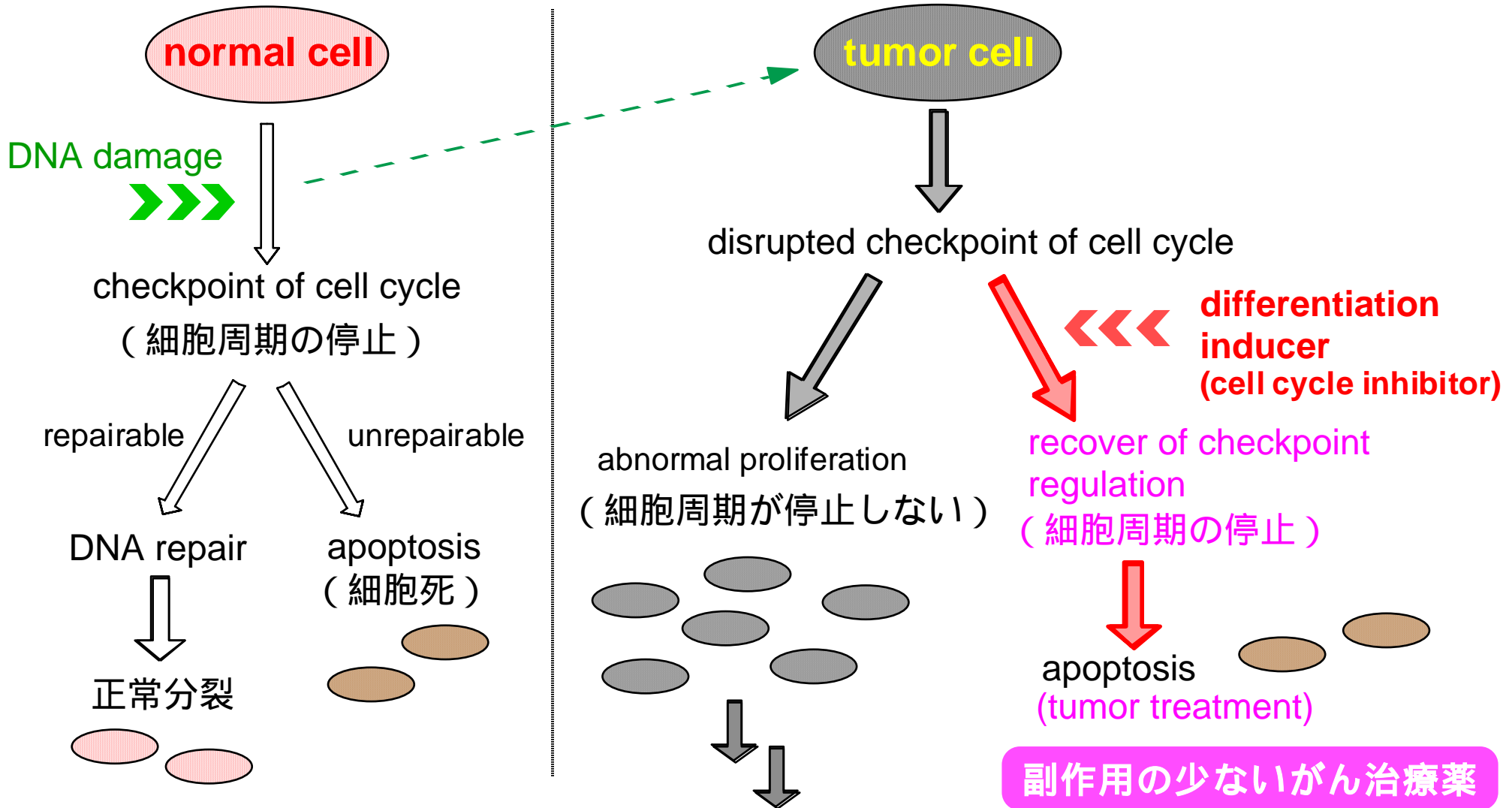
agosterols

(P-glycoprotein と MRP1 に対する阻害剤)

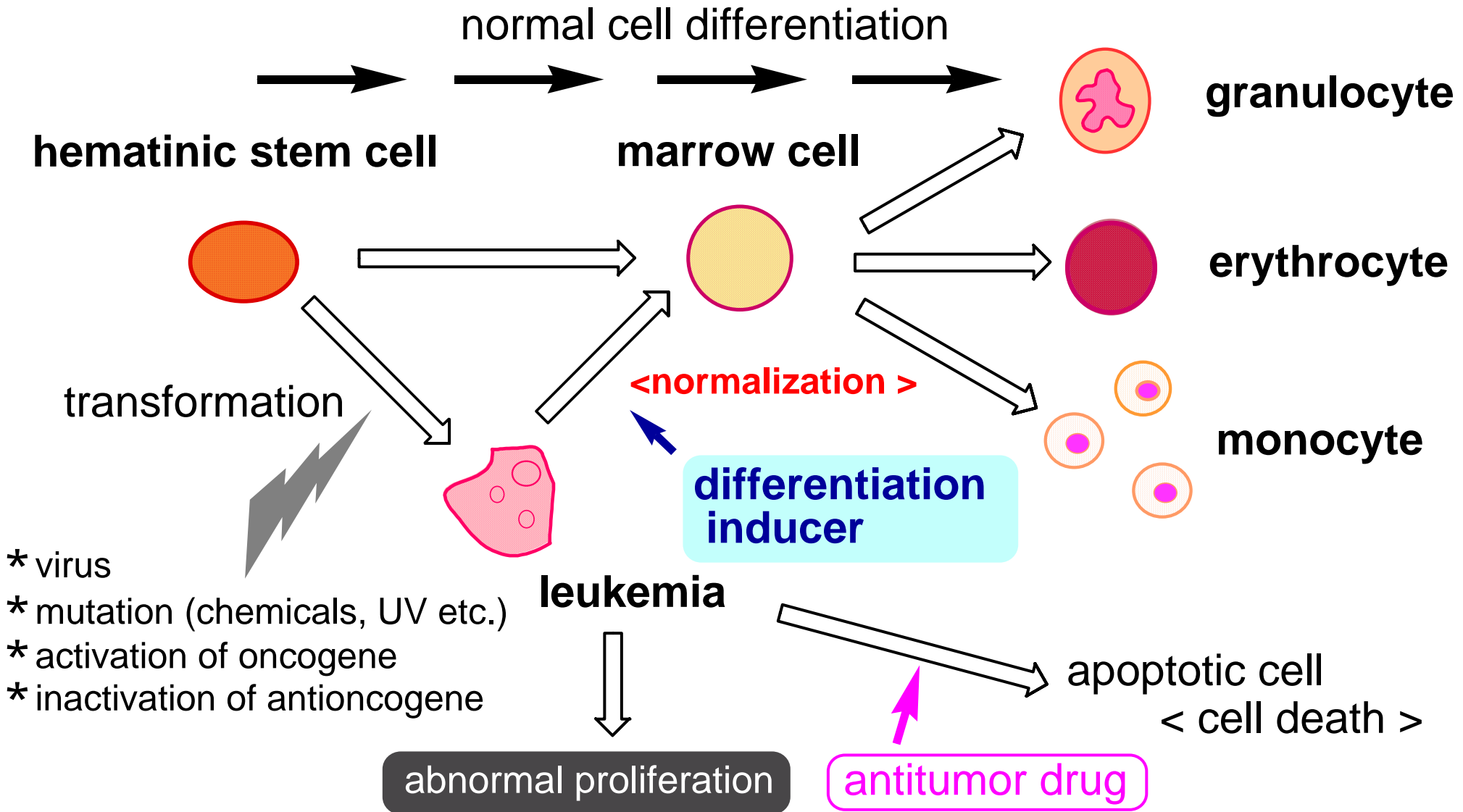
# ガン細胞に対する 分化誘導物質の探索

1) 慢性骨髄性白血病細胞に対する分化誘導物質の例

# Design of differentiation inducer for tumor treatment



# Search for differentiation inducer of tumor cell



# Assay method for cell differentiation of K562 cells

Bcr-Abl tyrosine kinase : the major cause of pathogenesis in CML

**K562 cells** ( human chronic myelogenous leukemia (CML))

(  $2 \times 10^4$  cells / 2ml / well in 24 well plate)

↓  
added sample, incubated for 4 days

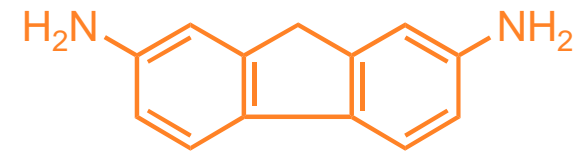
↓ centrifuged, medium aspirated  
added H<sub>2</sub>O

↓ extraction of hemoglobin

↓ added diaminofluorene solution  
and 3 % hydrogen peroxide

↓ colorimetric assay

( measuring absorbance of fluorene blue at 630 nm )

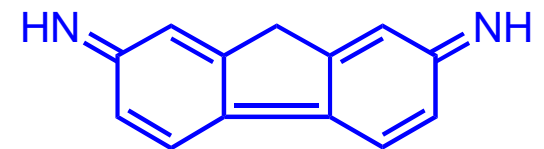


**diaminofluorene**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

H<sub>2</sub>O

hemoglobin  
( peroxidase )



**fluorene blue**

# From the Indonesian marine sponge *Dactylospongia elegans*

Labuanbajo, west Flores,  
Nusa Tenggara Timur



**smenospongine (1):**

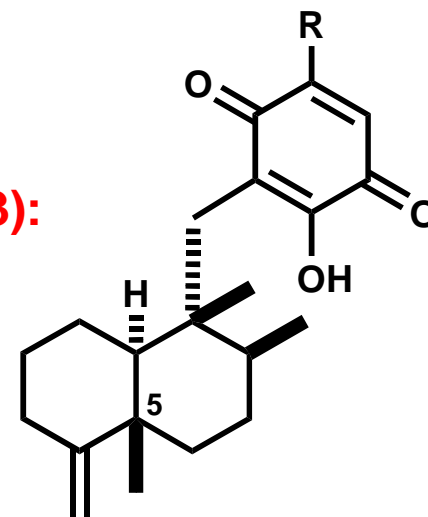
R= NH<sub>2</sub>

**smenospongorine (3):**

R= NHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

**ilimaquinone (5):**

R= OCH<sub>3</sub>



**5-*epi*-smenospongine (2):**

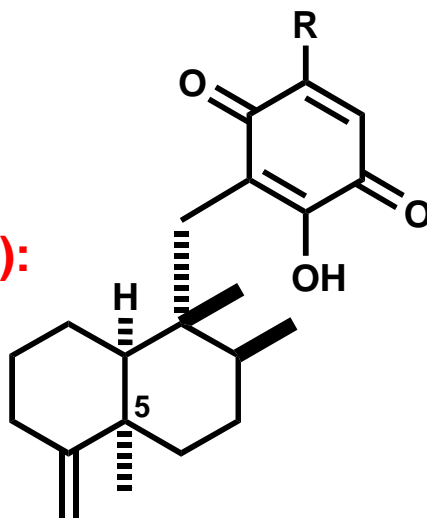
R= NH<sub>2</sub>

**5-*epi*-smenospongorine (4):**

R= NHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

**5-*epi*-ilimaquinone (6):**

R= OCH<sub>3</sub>

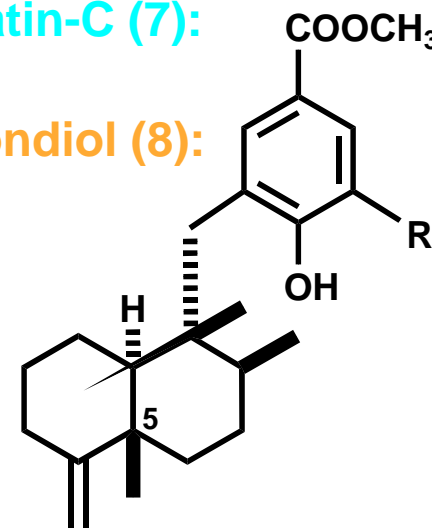


**dictyoceratin-C (7):**

R= H

**smenospondiol (8):**

R= OH



# Expression of glycophorin A in K562 cells treated by smenospongine

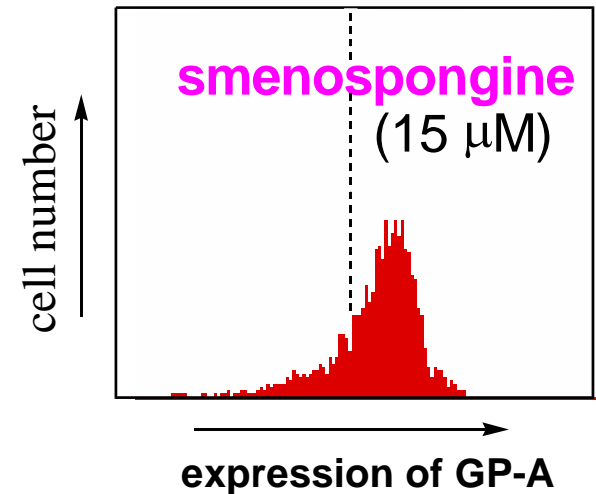
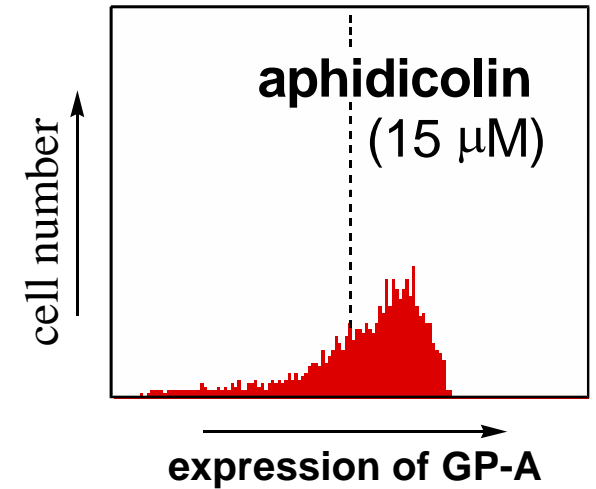
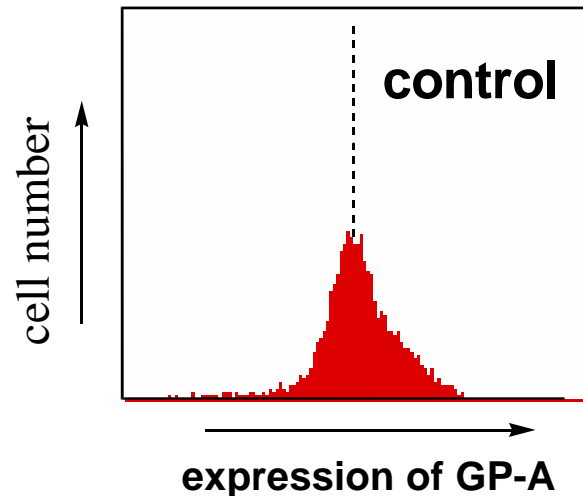
glycophorin A (GP-A): differentiation marker for erythroblast

## K562 cells

- 1) incubated with sample at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 6 days
- 2) harvested, suspended in PBS
- 3) added FITC\*-labeled glycoporphin A antibody
- 4) incubated for 40 min at 4 °C
- 5) washed with PBS and resuspended in PBS

Flow cytometry

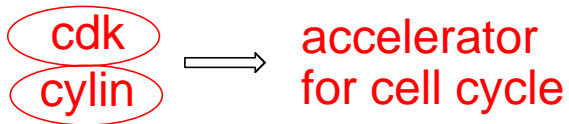
\* FITC: fluorescein isothiocyanate





# Regulation of cell cycle by cdk/cyclin complex and cdk inhibitor

## 1. cdk: cyclin-dependent kinase



## 2. Cdk inhibitors (CKIs)

brake for cell cycle

### 1) Cip/Kip1 family

(p21, p27, p57)

inhibition

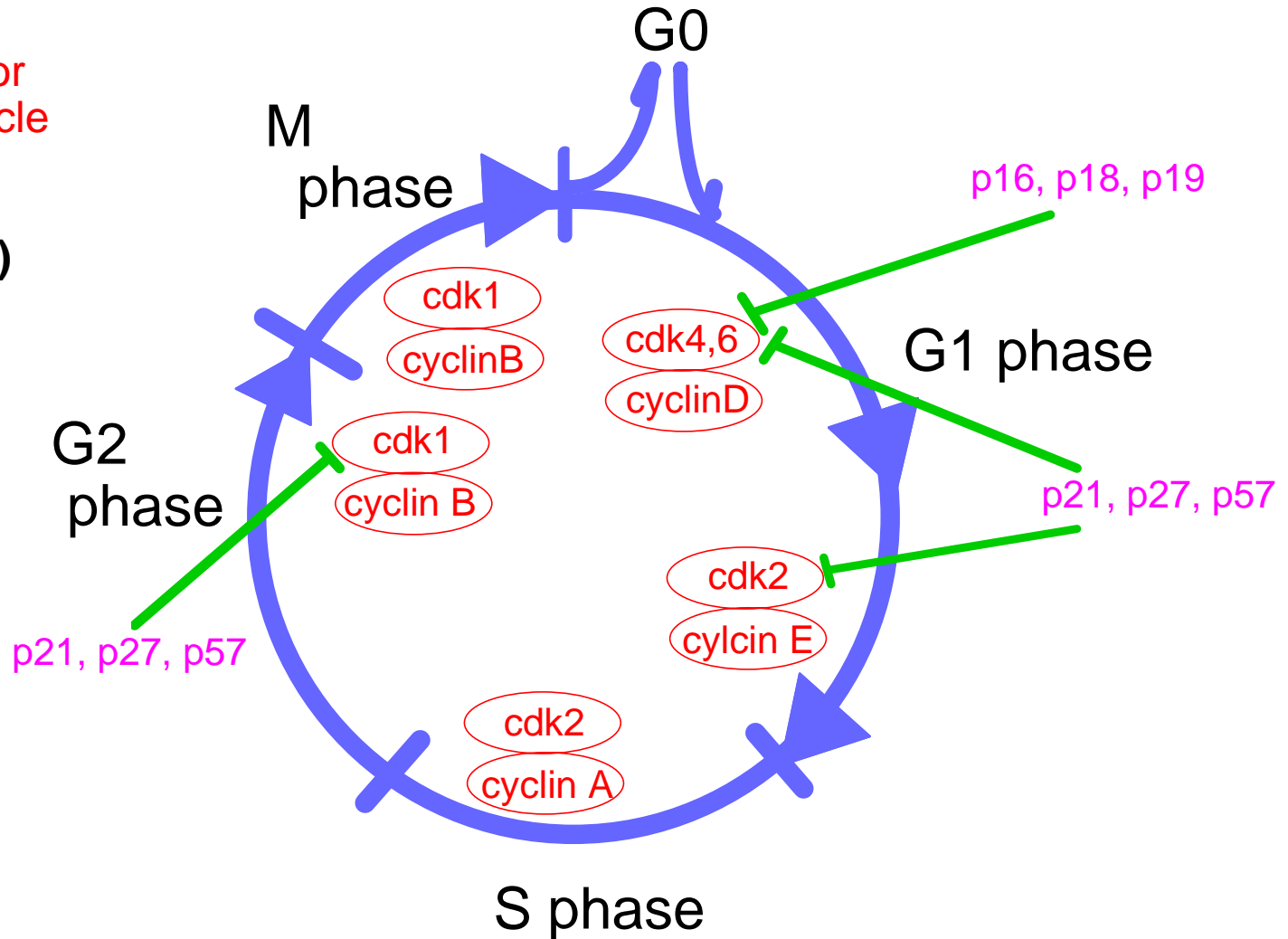
all cyclin-cdks

### 2) INK4 family

(p16, p18, p19)

inhibition

cyclinD-cdk4, 6

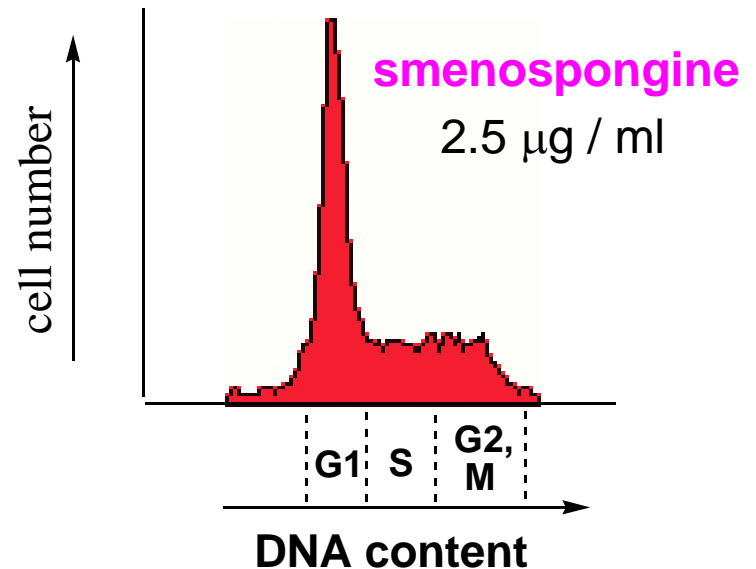
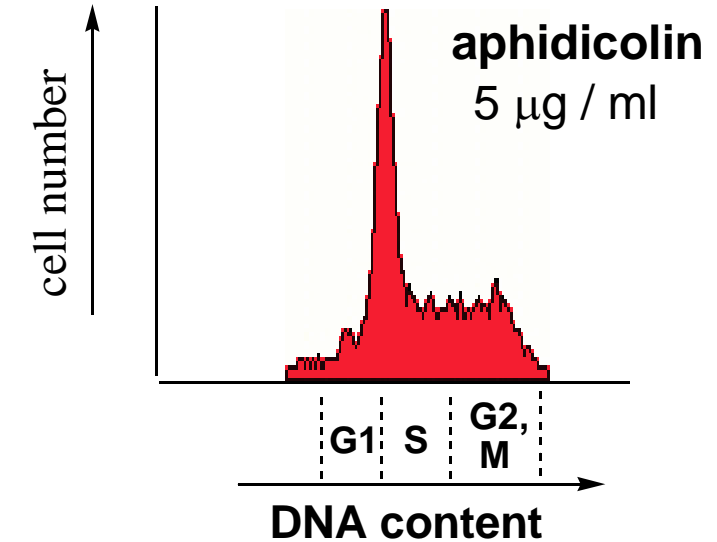
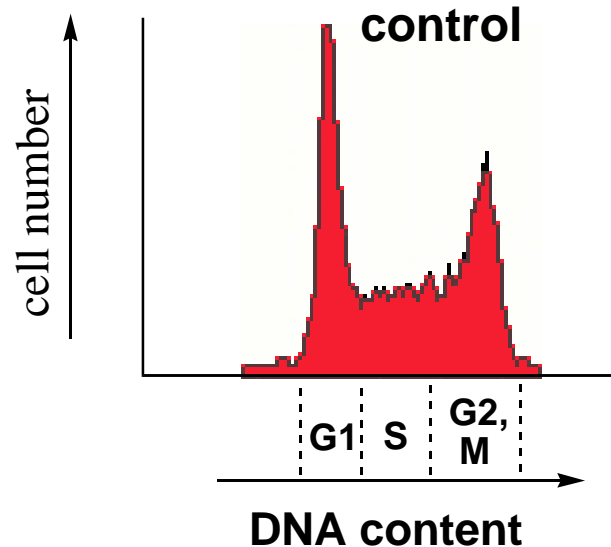


# Effect of smenospongine on cell cycle of K562 cells

## K562 cells

- 1) incubated with sample at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 24 h
- 2) cells harvested
- 3) washed with PBS
- 4) resuspended in PBS
- 5) stained with propidium iodide

## Flow cytometry



# Effect on expression of CDK inhibitors (p21, p27, p57) in K562 cells

K562 cells ( $1 \times 10^6$  cells)

- 1) incubated with  $15 \mu\text{M}$  of **smenospongine** at  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  for indicated time
- 2) lysed in lysis buffer

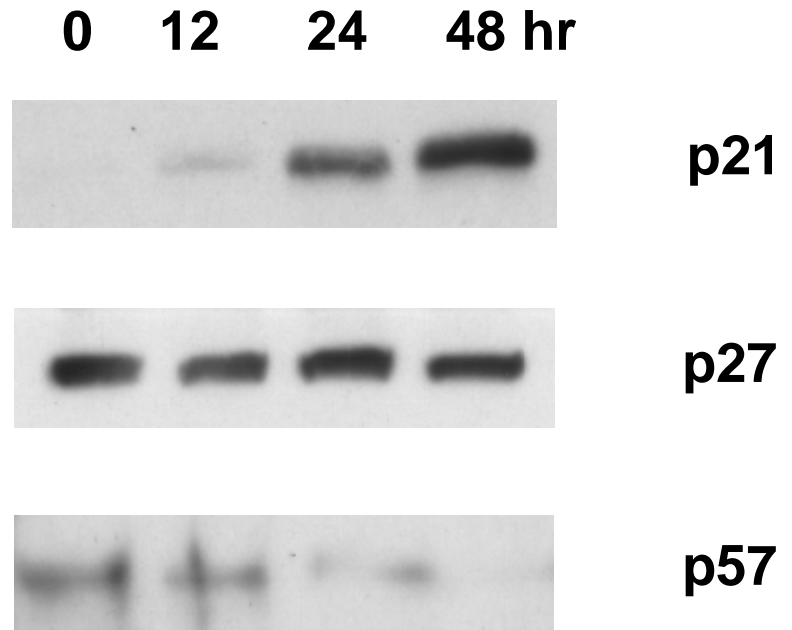
Cell lysates

- 3) SDS-PAGE
- 4) transferred to PVDF membrane

Blotted PVDF membrane

- 5) blocked with  $5\%$  skim milk
- 6) bound to primary antibody
- 7) bound to secondary antibody
- 8) added ECL reagent
- 9) exposed to X-ray film

Detection of expression of CDK inhibitors



**smenospongine** → **expression of p21** ↑

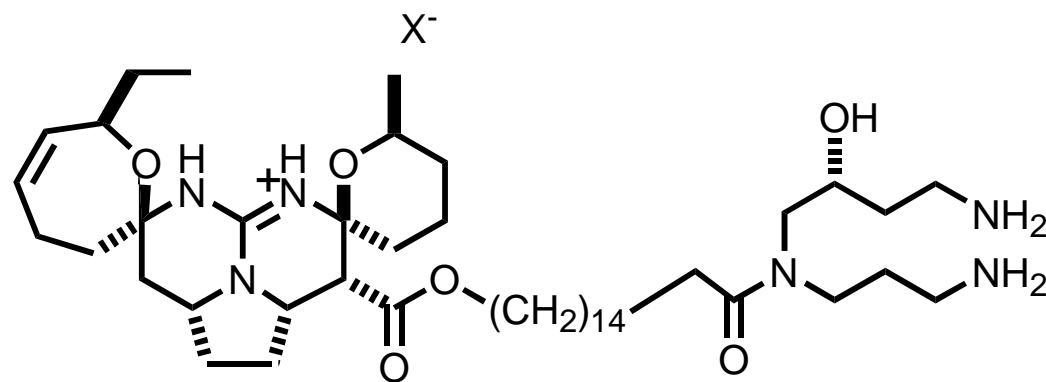
no effect on p21 promoter assay

From the Indonesian marine sponge *Monanchora unguiculata*



Tolobulu, Southeast Sulawesi

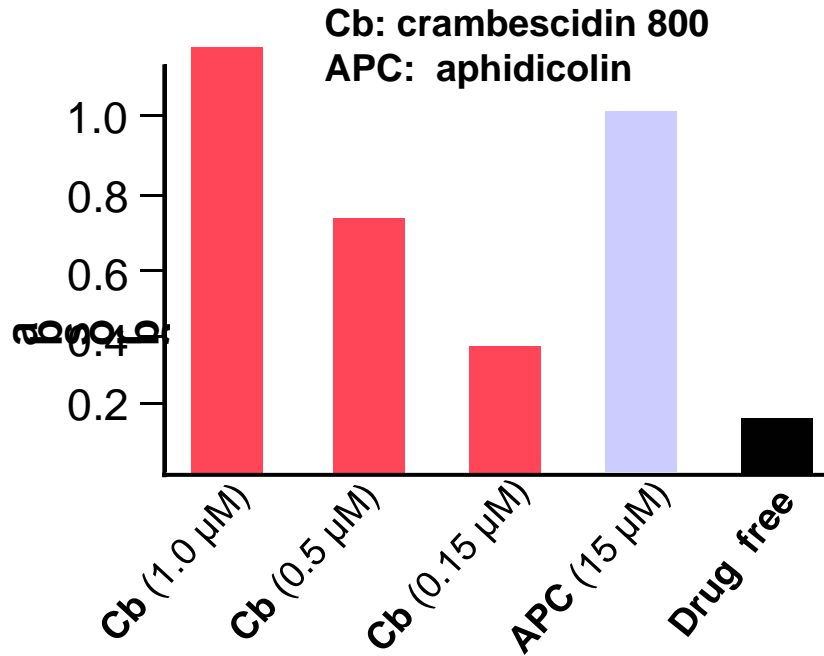
erythroid differentiation inducer  
for K562 cells



**crambescidin 800**

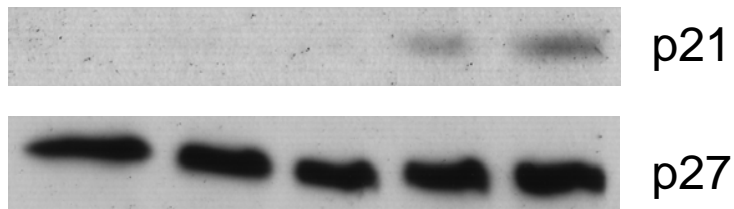
# Differentiation-inducing activity of crambescidin 800

## hemoglobin production

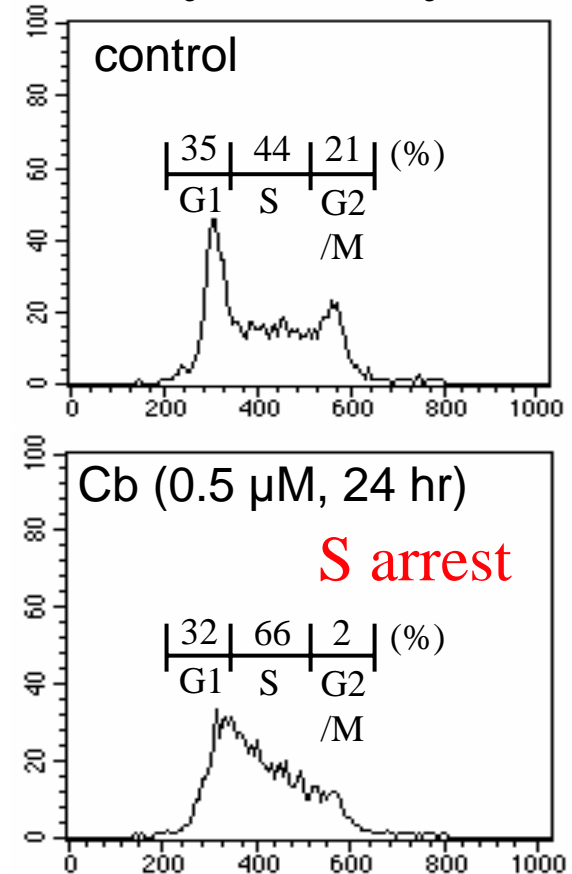


## CKI expression

0 6 12 24 48 hr (0.5  $\mu\text{M}$  of Cb)



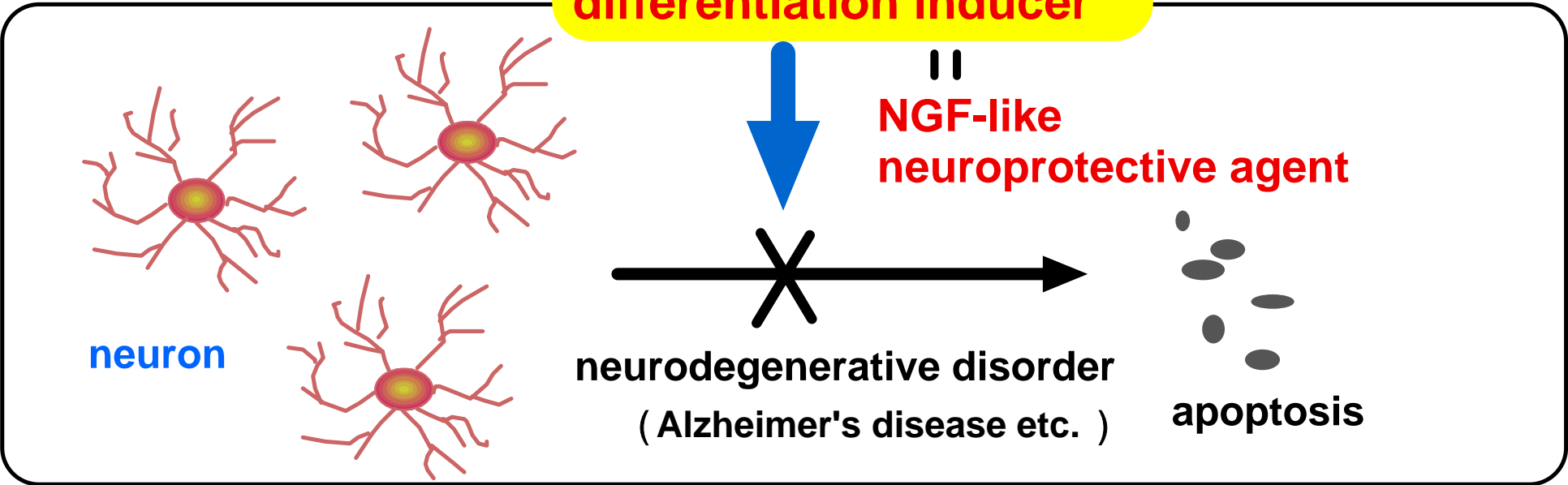
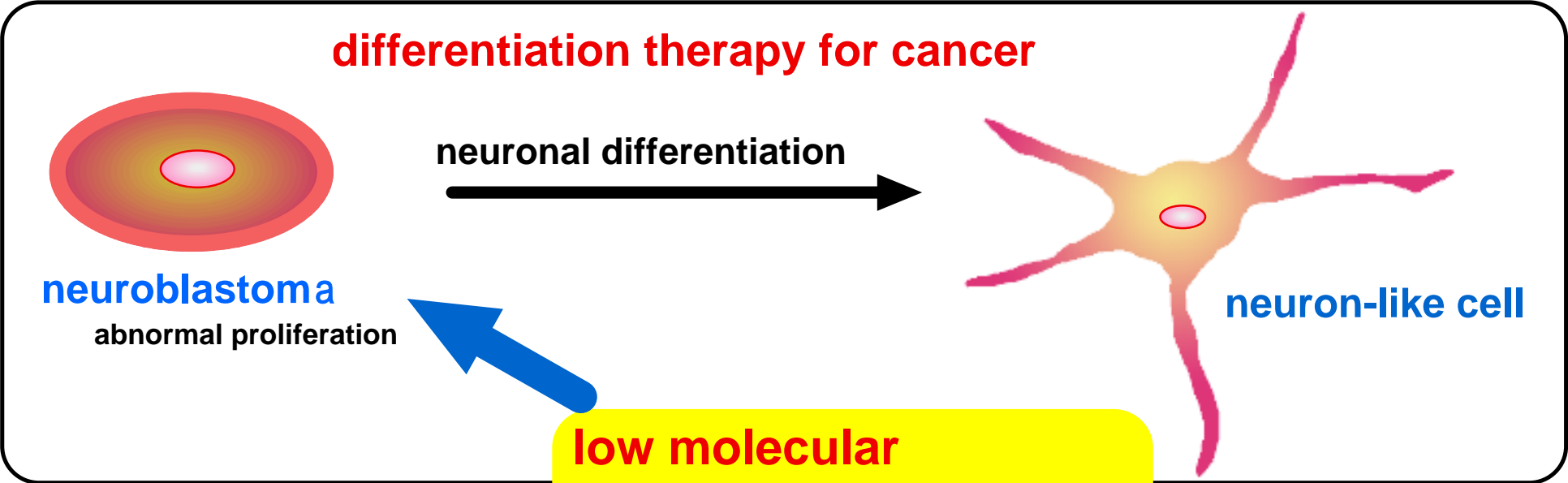
## cell cycle analysis



# ガン細胞に対する 分化誘導物質の探索

2) 神経芽細胞腫に対する分化誘導物質の例

# Conception of Neuronal Differentiation Inducer



# Assay for Neuronal Differentiation

## PC12 cells

(rat pheochromocytoma)  
(ラット副腎髄質褐色細胞腫)

NGF receptor positive  
(responsive to NGF)

Culture medium:

DMEM with 10% inactivated  
horse serum and 5% FBS

## Neuro 2A cells

(mouse neuroblastoma)  
(マウス神経芽細胞腫)

NGF receptor negative  
(nonresponsive to NGF)

Culture medium:

DMEM with 10% FBS

## Assay

### PC12 cells or Neuro 2A cells

plated on 24 multiwell plate  
( $2 \times 10^4$  cell / 1 ml / 1 well)

↓ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>  
24 h

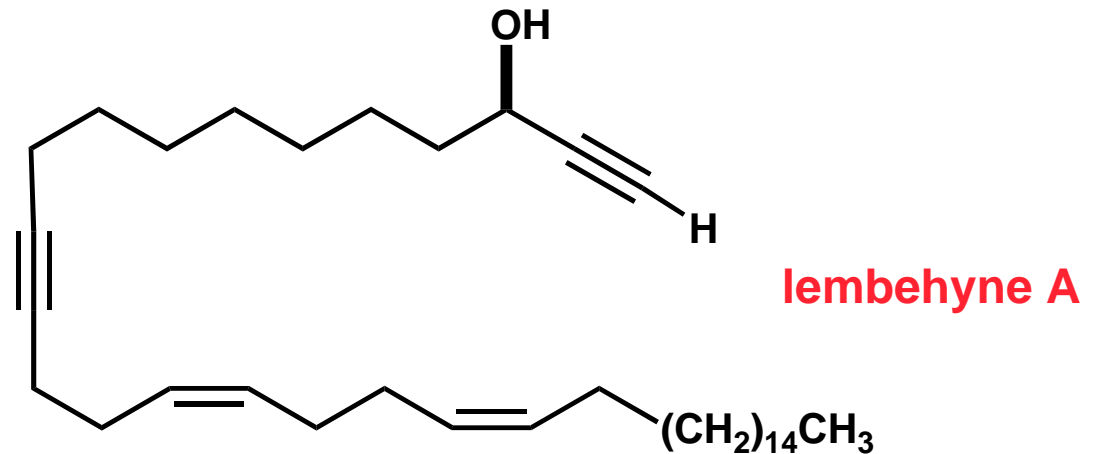
- replaced with fresh medium
- added sample as EtOH solution

↓ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>  
24 - 48 h

observed neurite outgrowth  
under microscope



# Neuritogenic Polyacetylene from Marine Sponge of *Haliclona* sp.



**neuritogenic activity**

**Neuro 2A 0.1 μg/ml**

**PC 12 2 μg/ml**

## **structure**

S. Aoki, K. Matsui, K. Tanaka, R. Satari, M. Kobayashi, *Tetrahedron* **2000**, 56, 9945.

## **activity**

S. Aoki, K. Matsui, T. Takaka, M. Kobayashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**,558-563 (2001).

## **photoaffinity labeling**

S. Aoki, K. Matsui, T. Takata, and M. Kobayashi, *FEBS Lett.*, **544**, 223-227 (2003).

# Morphological Changes of PC12 and Neuro 2A Induced by Lembehyne A

PC12

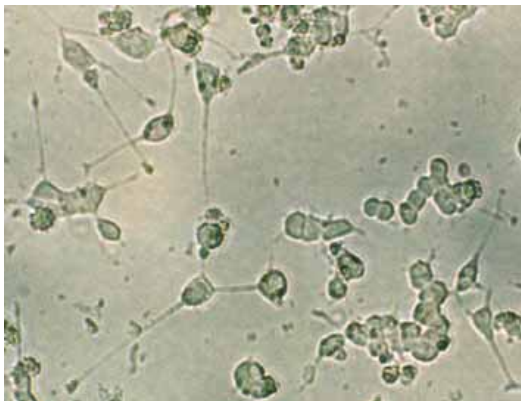
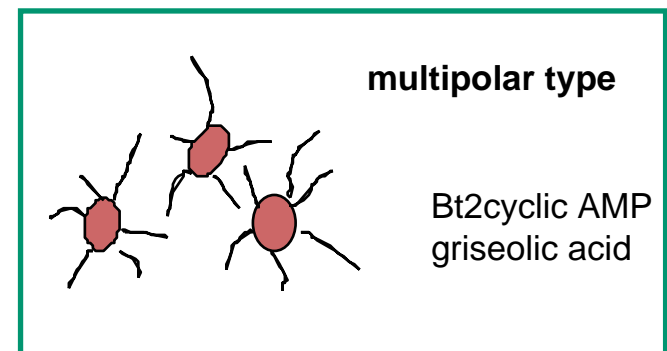
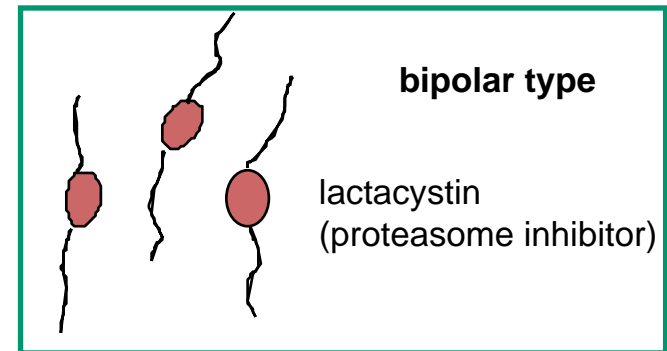
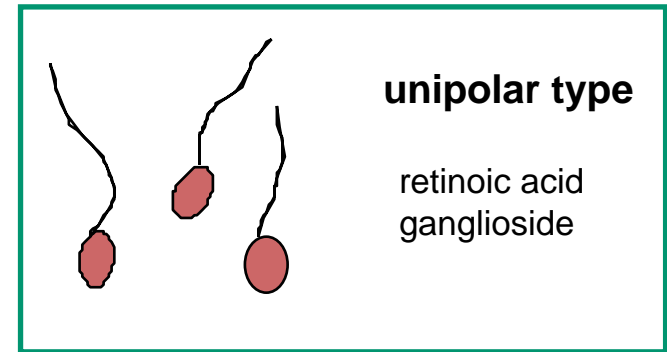


intact

Neuro 2A



intact



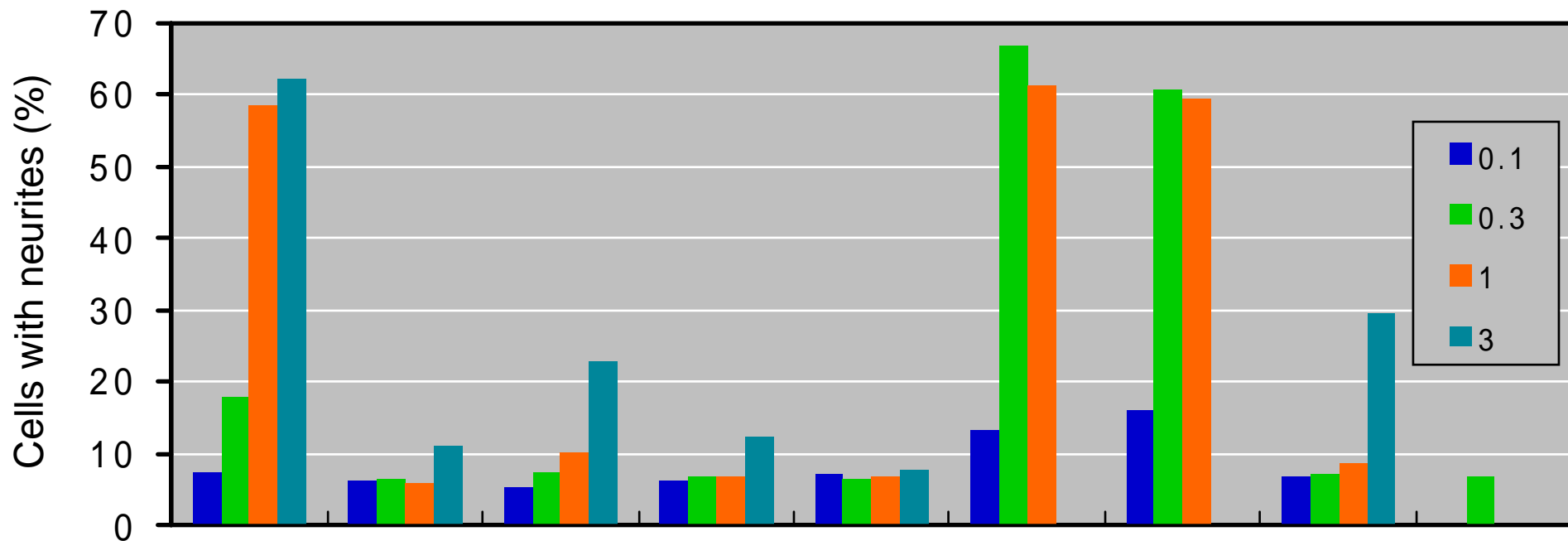
lembehyne A (4.0 μM)



lembehyne A (2.0 μM)

bipolar neurite outgrowth

# Structure-activity Relationship of Lembehynes



compound

1

2

3

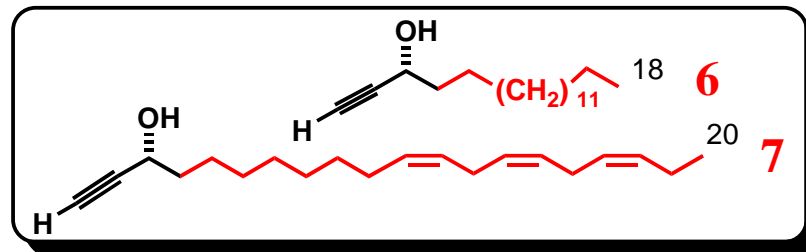
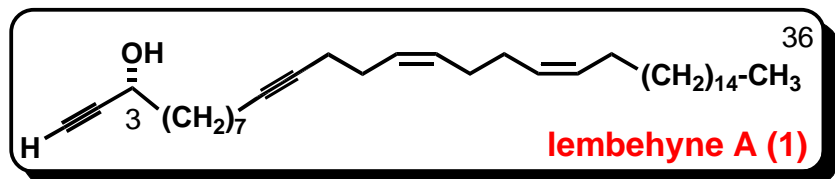
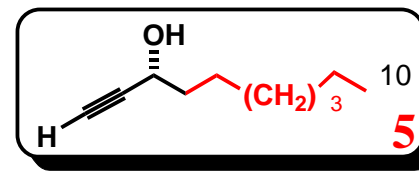
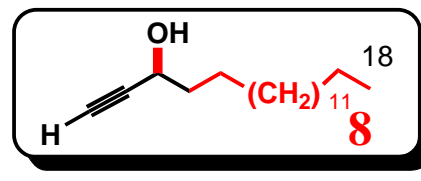
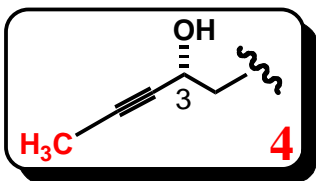
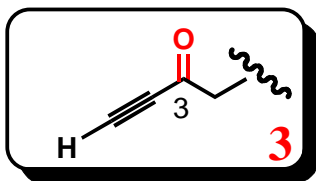
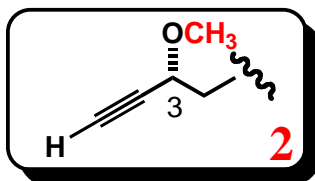
4

5

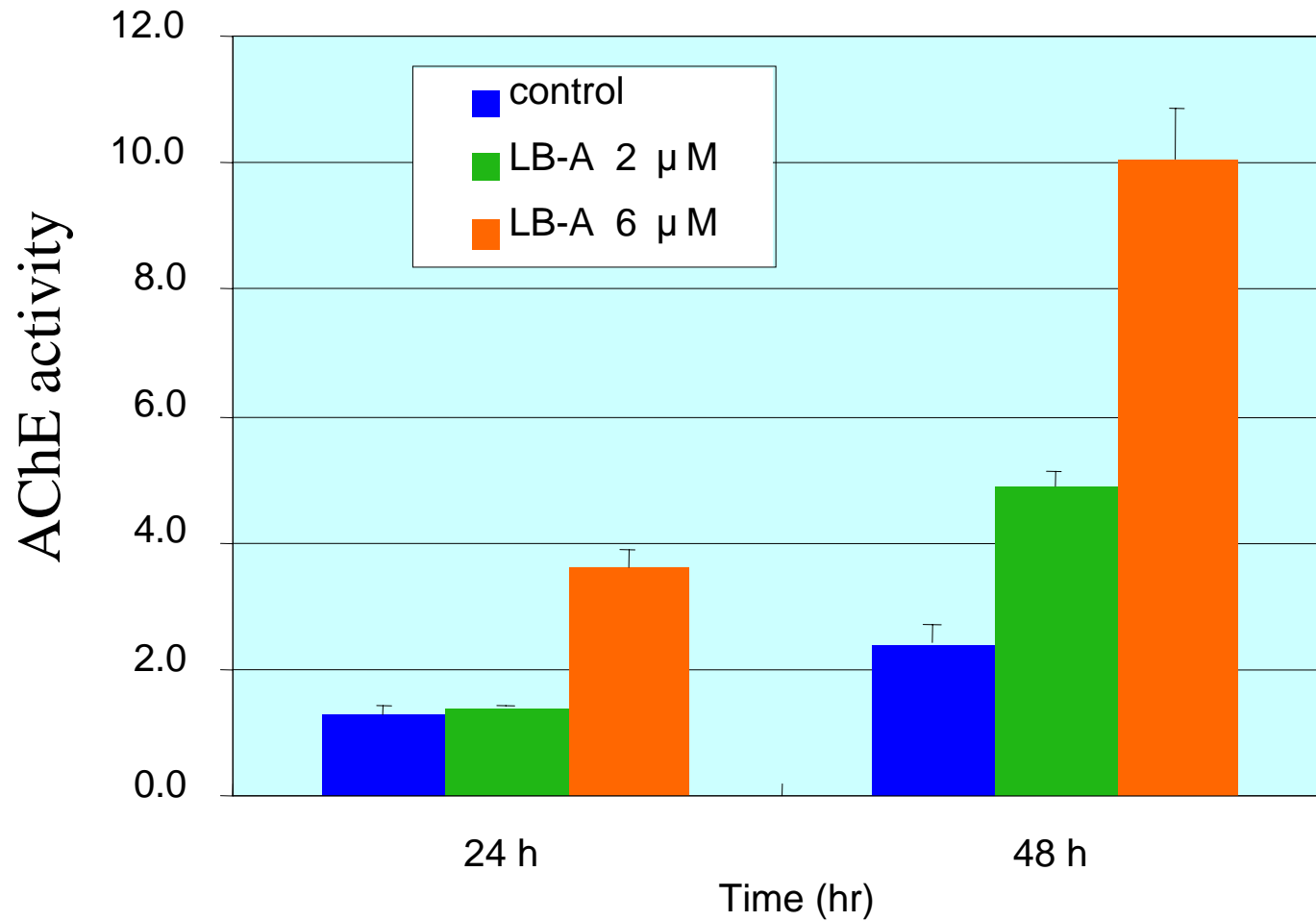
6

7

8



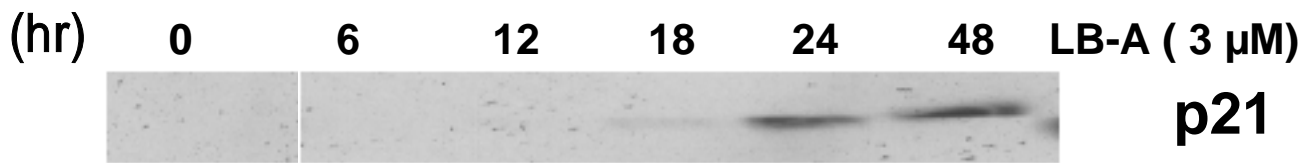
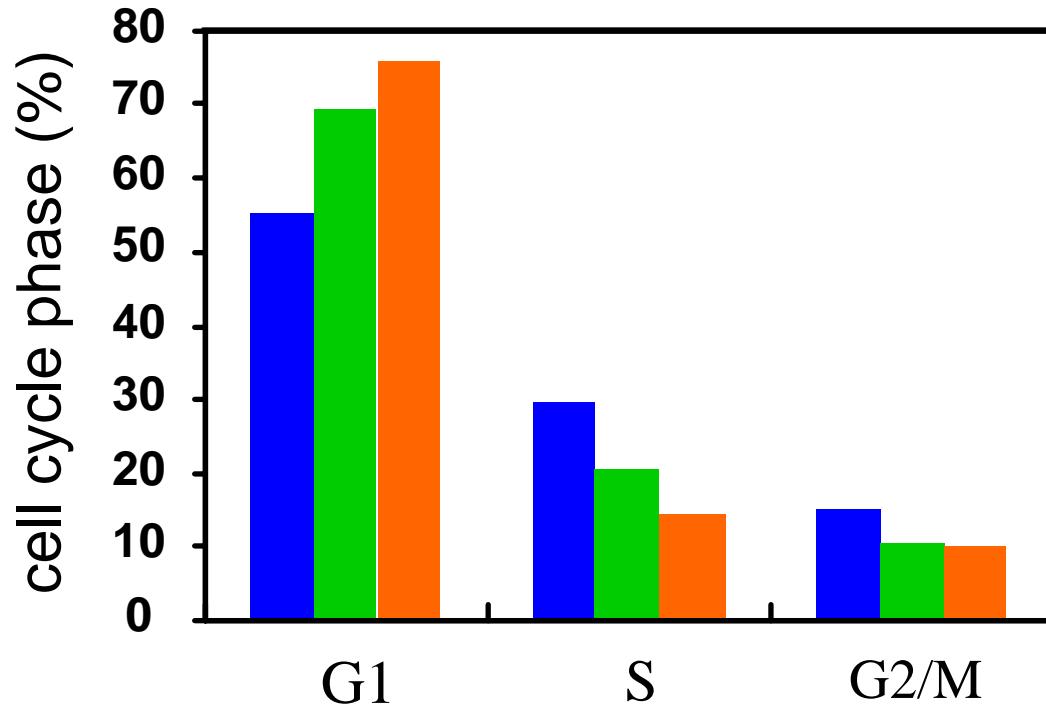
## Effect of Lembehayne A (LB-A) on Acetylcholinesterase (AChE) Activity of Neuro 2A Cells



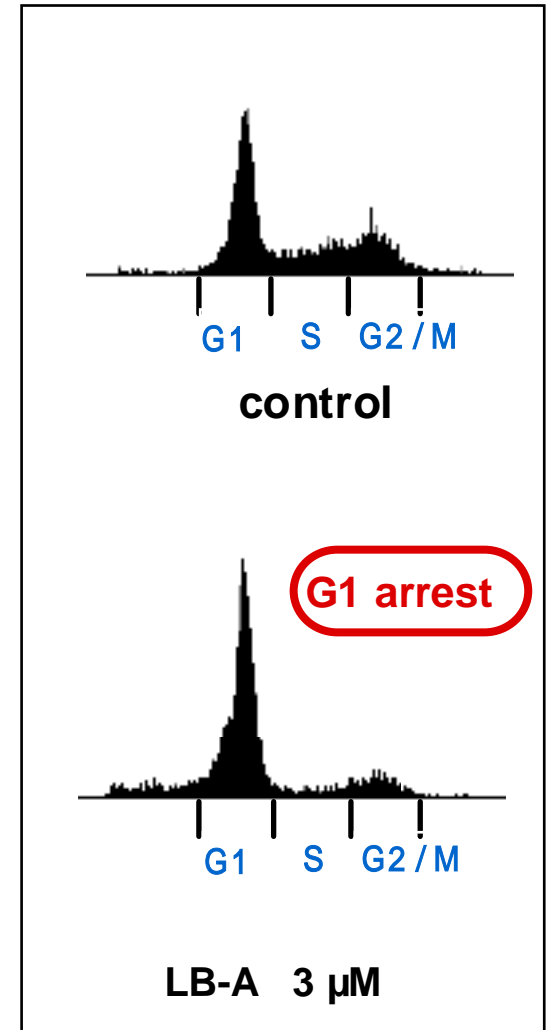
**Functional Differentiation**

# Effects of Lembehyne A (LB-A) on the Cell Cycle and the Expression of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitor Protein p21 in Neuro 2A Cells

flow cytometric analysis (24 h)

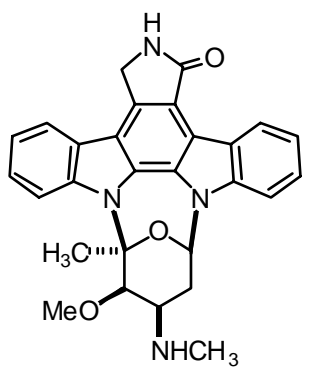


Western blotting analysis of p21 expression

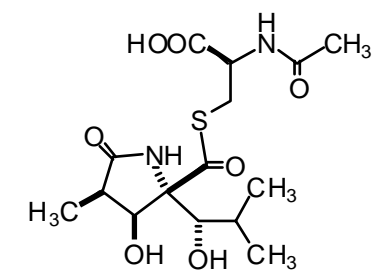


# Various Neuronal Differentiation Inducers for Neuro 2A or PC12 cells

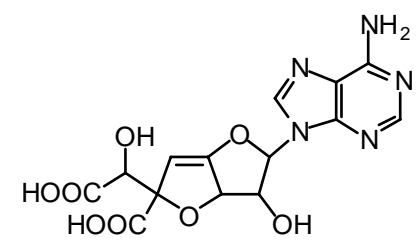
activity



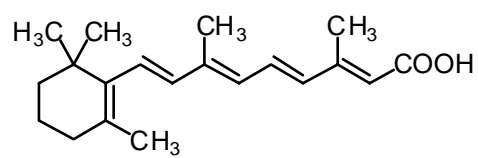
**staurosporin** 0.1  $\mu$ M for PC12, Neuro 2A  
*protein kinase C inhibitor*



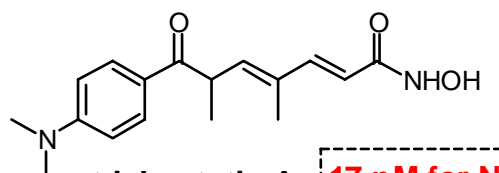
**lactacystin** 10  $\mu$ M for PC1 2  
5  $\mu$ M for Neuro 2A  
*proteasome inhibitor*



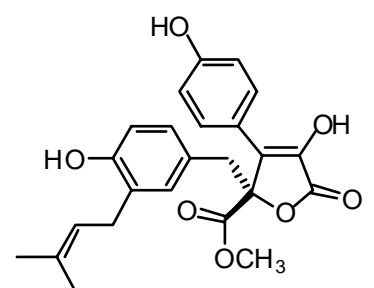
**griseolic acid** 1 mM for Neuro 2A  
*cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor*



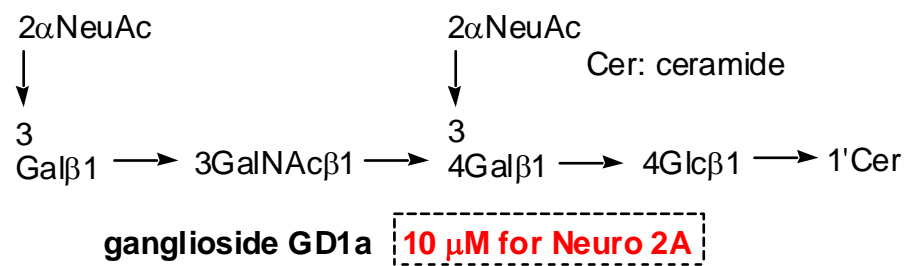
**retinoic acid** 10  $\mu$ M for Neuro 2A



**trichostatin A** 17 nM for Neuro 2A  
*histone deacetylase inhibitor*



**butyrolactone I** 24  $\mu$ M for Neuro 2A  
*cdk inhibitor*



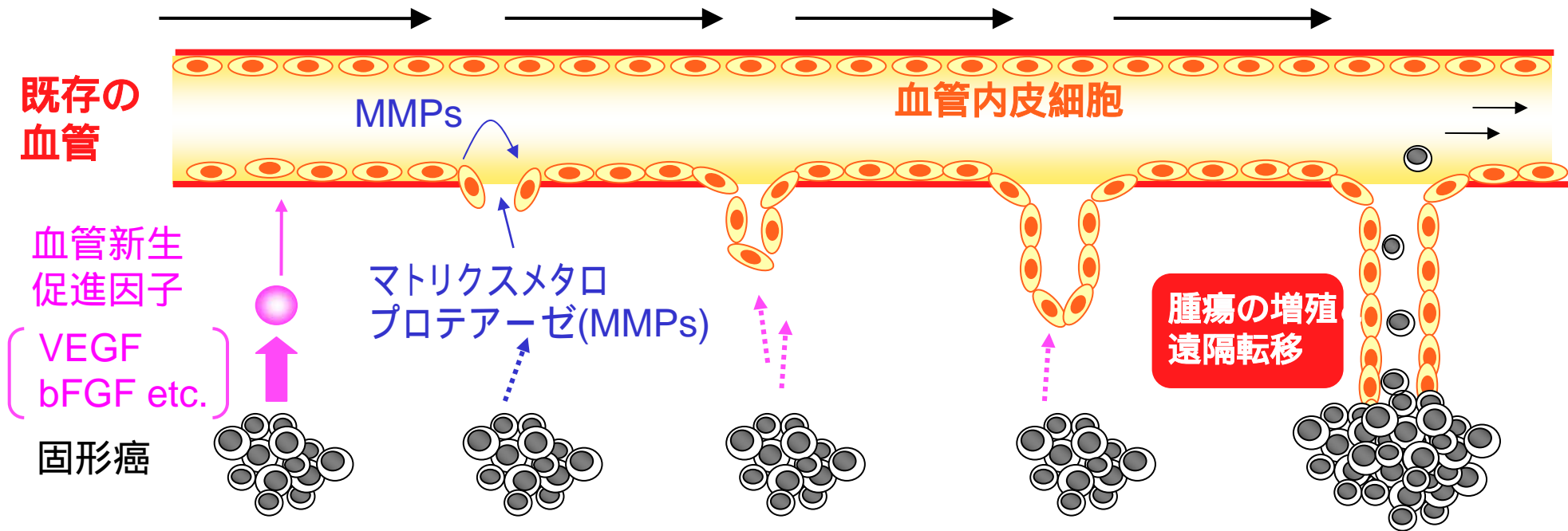
**lembehynes A (1)** 1  $\mu$ M for Neuro 2A  
4  $\mu$ M for PC12

**C18 analogue** 0.3  $\mu$ M for Neuro 2A

**Target molecule?**

血管新生阻害活性を有する  
海綿由来成分bastadin類の*in vivo*抗腫瘍効果

# 腫瘍血管新生のメカニズムと血管新生阻害剤のターゲット



過程	血管新生促進因子の産生	血管壁の消化	血管内皮細胞の増殖・遊走	血管内皮細胞の管腔形成
ターゲット	血管新生促進因子の阻害 (レセプターetc.)	消化酵素 (MMP)の阻害剤	血管内皮細胞の選択的増殖阻害	血管内皮細胞の管腔形成並びに裏打ち組織の成熟



# Assay for selective growth inhibitors against HUVEC

human umbilical vein endothelial cells  
(HUVEC)

human KB epidermoid carcinoma cells  
(KB3-1)

**HUVEC** or **KB3-1**  
plated on 96 multiwell plate  
( $2 \times 10^3$  cells/well)

37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>  
24 h

**HUVEC**

replaced with minimal medium  
including **VEGF** or **bFGF**

(VEGF or bFGF dependent growth)

**KB3-1**

added samples as EtOH solution

37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>  
48-72 h

culture medium

**HUVEC**

HuMedia-EG2 : normal medium  
HuMedia-EB2 : minimal medium

**KB3-1**

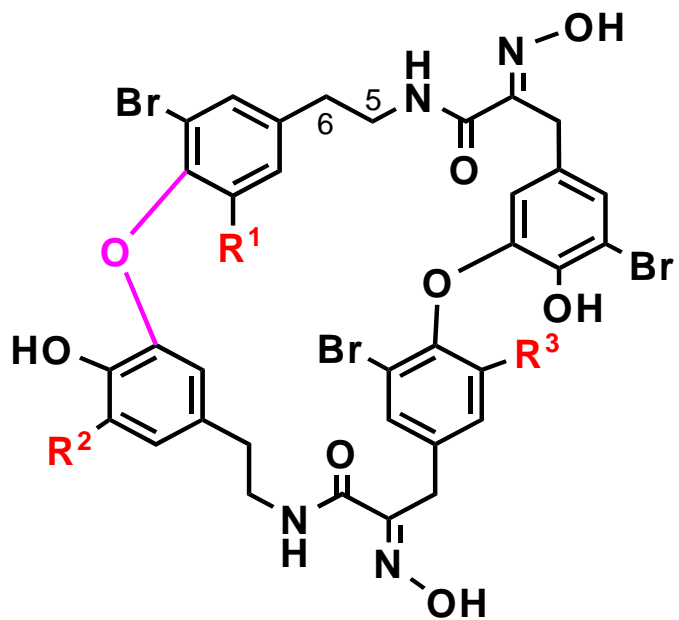
RPMI1640 with 10 % FBS

**HUVEC**  
WST-8 assay

**KB3-1**  
MTT assay

evaluation of selective growth inhibition

# 血管新生阻害物質 bastadin類の化学構造



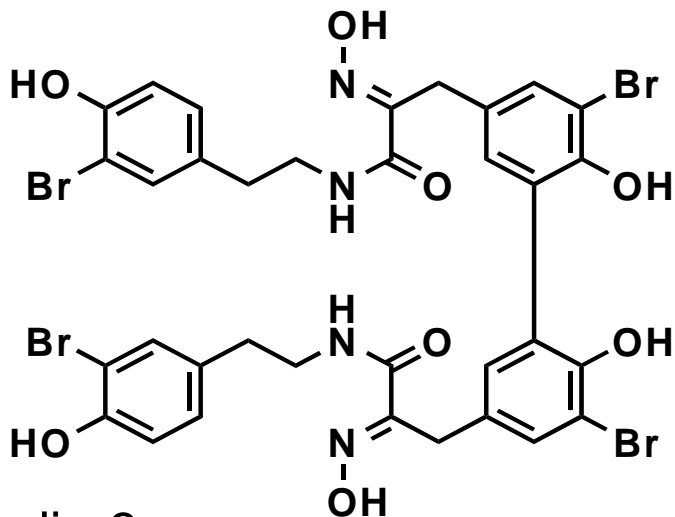
bastadin-4 :  $R^1 = H$ ,  $R^2 = Br$ ,  $R^3 = Br$ ,  $\Delta^{5,6}$

bastadin-5 :  $R^1 = H$ ,  $R^2 = Br$ ,  $R^3 = Br$

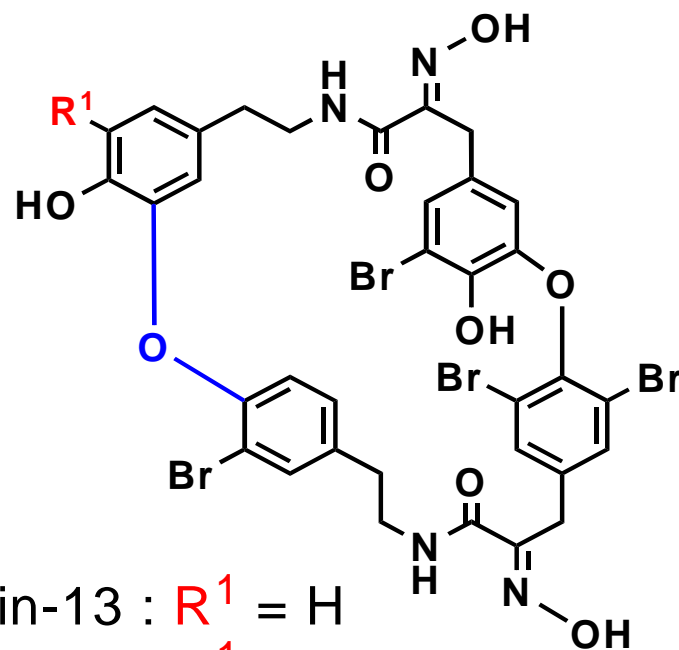
bastadin-6 :  $R^1 = Br$ ,  $R^2 = Br$ ,  $R^3 = Br$

bastadin-7 :  $R^1 = H$ ,  $R^2 = Br$ ,  $R^3 = H$ ,  $\Delta^{5,6}$

bastadin-11 :  $R^1 = H$ ,  $R^2 = H$ ,  $R^3 = Br$ ,  $\Delta^{5,6}$



bastadin-3



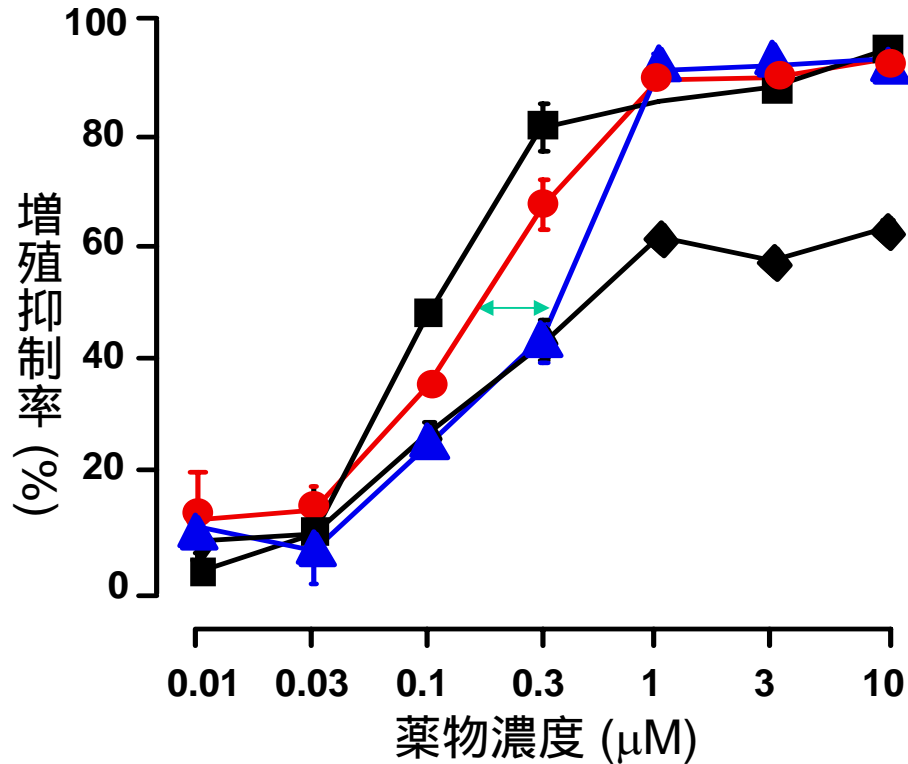
bastadin-13 :  $R^1 = H$

bastadin-19 :  $R^1 = Br$

# Bastadin 6 のヒト血管内皮細胞に対する選択的増殖抑制効果

doxorubicin

(現在臨床で使われている抗がん剤)



● HUVEC (bFGF dependent condition)

■ HUVEC (normal condition)

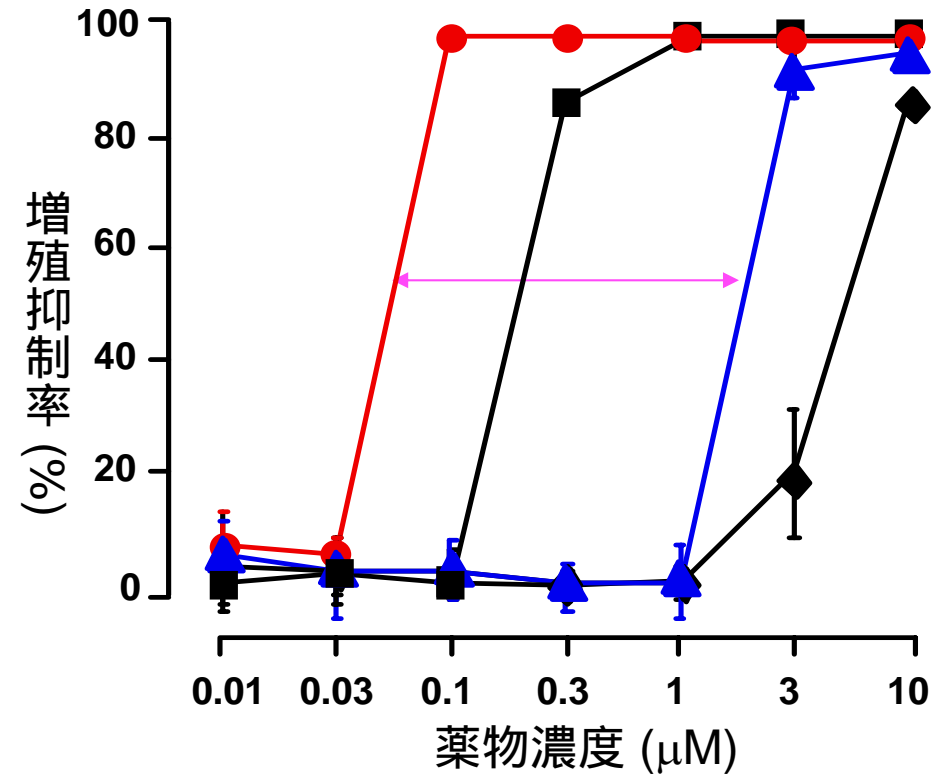
◆ 3Y1

▲ KB 3-1

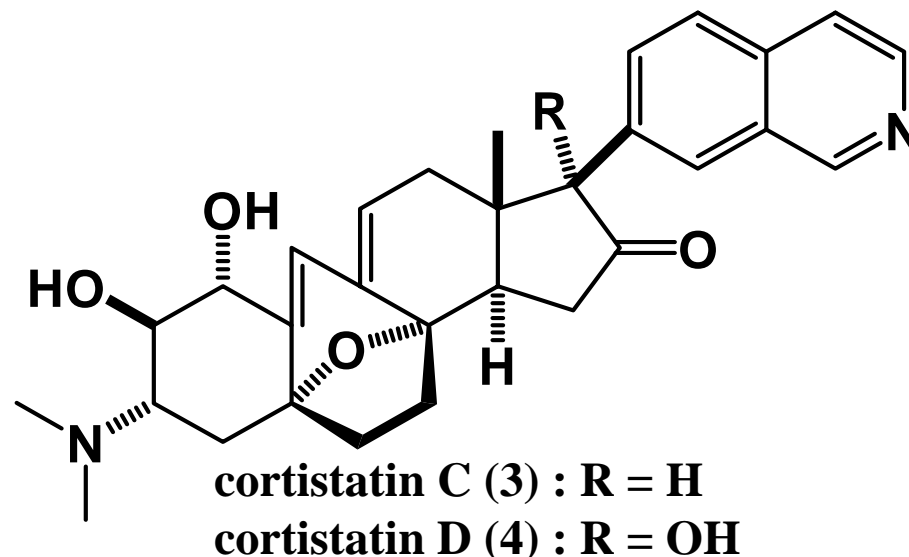
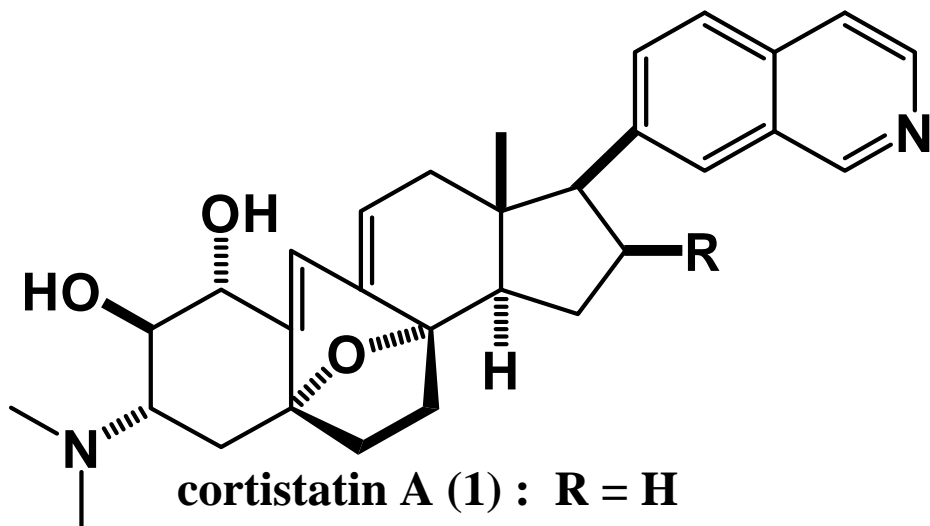
3Y1 : rat embryonic fibroblast

HUVEC: ヒト臍帯静脈血管内皮細胞

bastadin 6



# Selective growth inhibition of cortistatins



## Selective growth inhibition against HUVEC

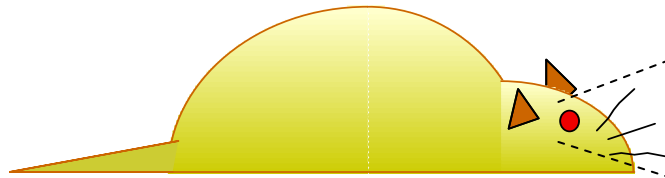
Compounds	1		2		3		4	
	IC <sub>50</sub>	S.I.	IC <sub>50</sub>	S.I.	IC <sub>50</sub>	S.I.	IC <sub>50</sub>	S.I.
<b>HUVECs</b>	<b>0.0018</b>		<b>1.1</b>		<b>0.019</b>		<b>0.12</b>	
KB3-1	7	3900	120	110	150	7900	55	460
Neuro2A	6	3300	160	150	180	9500	>300	-
K562	7	3900	200	180	>300	-	>300	-
NHDF	6	3300	>300	-	>300	-	>300	-

- : not determine      IC<sub>50</sub> = μM

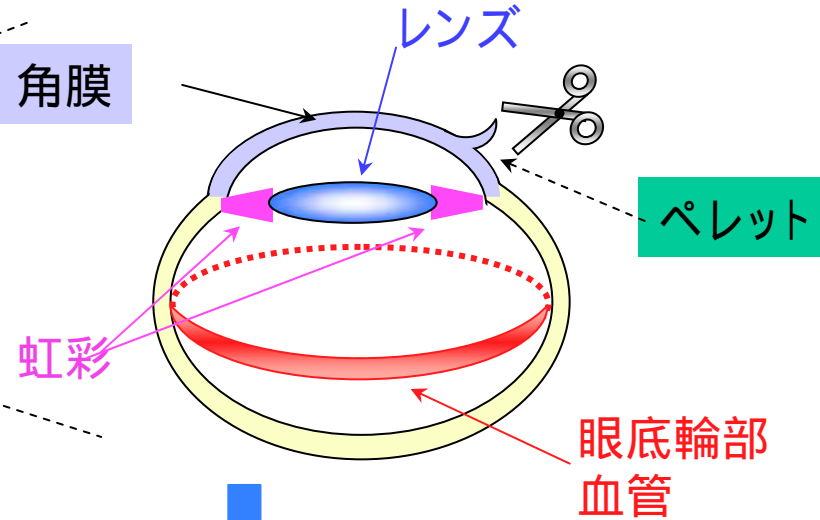
# Bastadin 6 の *in vivo*での血管新生阻害活性の評価

12 % hydon でペレットを作成し、中に血管新生促進因子を混ぜる。  
(VEGF, 200 ng or bFGF, 40 ng)

マウス角膜へのペレット移植操作

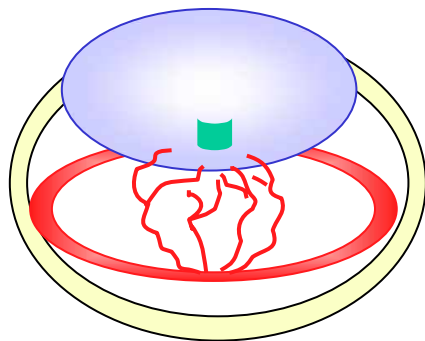


角膜

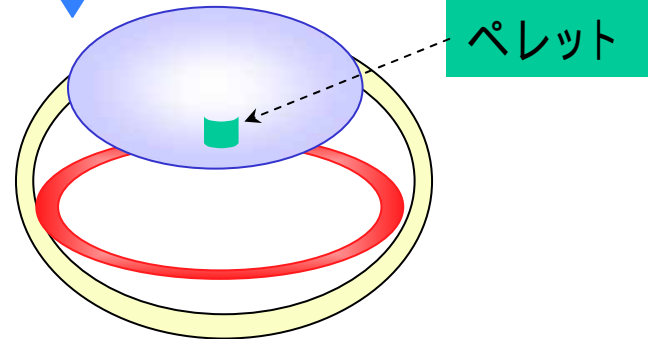


薬物処置

- ・ペレットに直接混ぜる
- ・腹腔内投与



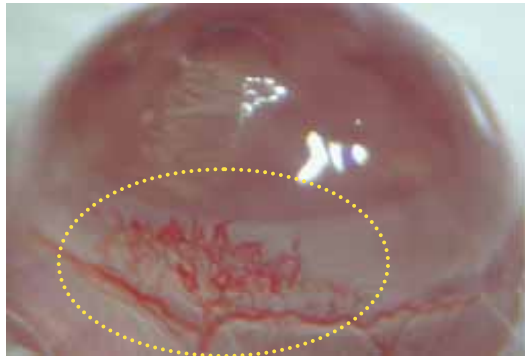
5 ~ 6日後



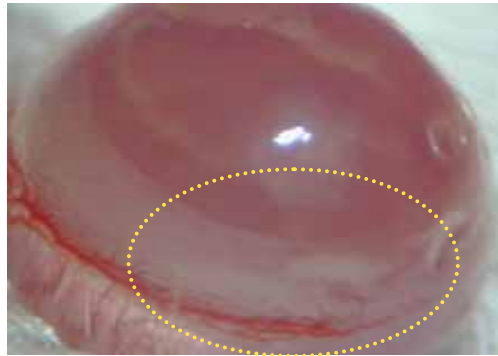
生じた新生血管を顕微鏡下で観察

# Bastadin 6 の *in vivo*での血管新生阻害活性の評価

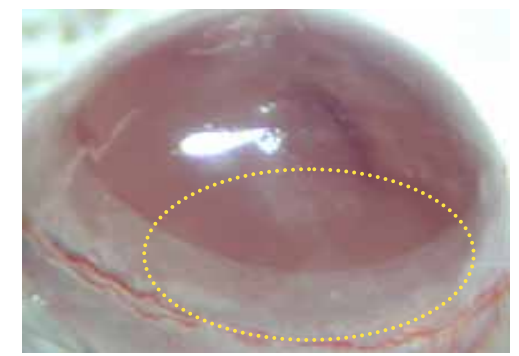
## VEGF



薬物無処置  
(VEGF, 200 ng in pellet)

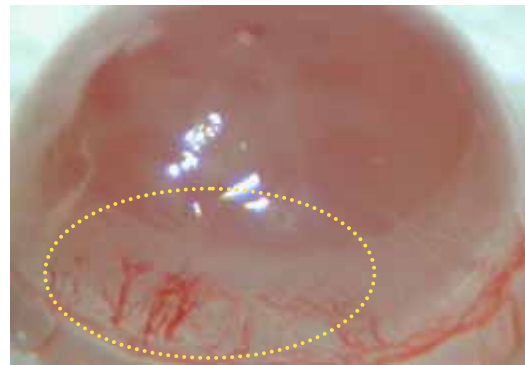


VEGF + bastadin 6  
(0.1  $\mu$ g) in pellet

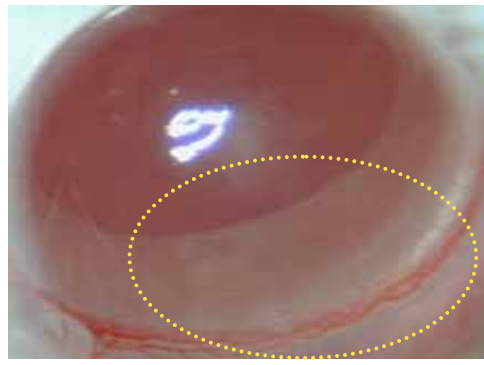


VEGF in pellet + bastadin 6  
(*i.p.*, 100 mg/kg/day X 3)

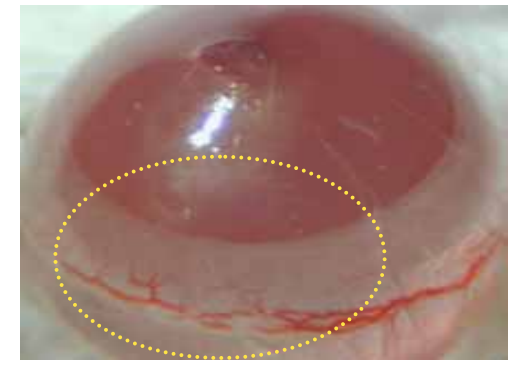
## bFGF



薬物無処置  
(bFGF, 40 ng in pellet)



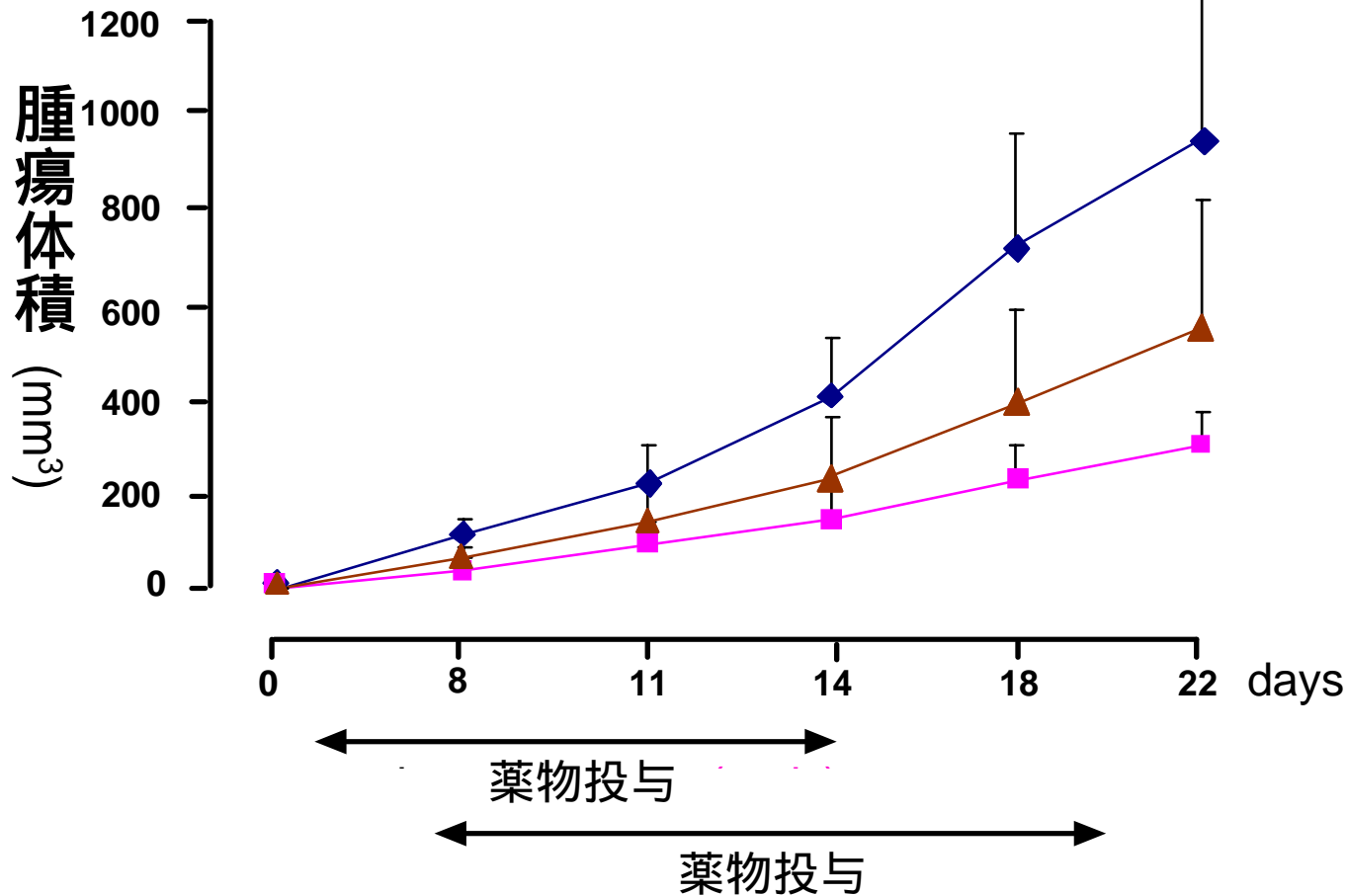
bFGF + bastadin 6  
(0.1  $\mu$ g) in pellet



bFGF in pellet + bastadin 6  
(*i.p.*, 100 mg/kg/day X 3)

マウス角膜法を用いて *in vivo*での bastadin 6の効果を検討した結果、bastadin 6をペレットに直接導入した場合も、ペレット投入後1日目から3日目まで bastadin 6を 100 mg/kg/day腹腔内投与したマウスにおいても血管新生が完全に抑制された。

# Bastadin 6 のヒト腫瘍移植モデルにおける抗腫瘍効果



control (day 22)



bastadin 6 (early) bastadin 6 (late)

(100 mg/kg, i.p., day 22)

- ◆ control
- 移植同時投与 (0 から 2 週間、7 回)
- ▲ 腫瘍形成後投与 (1 から 3 週間、7 回)

腫瘍移植モデルにおけるbastadin 6の抗がん作用を検討した結果、bastadin 6を1日目から投与した群でも7日目から投与した群においても、100 mg/kg腹腔内投与したマウスに抗腫瘍効果が確認された。