

学 位 論 文 題 名

Studies on Novel Antitumor Antibiotics Duocarmycins

（新規抗腫瘍性抗生物質デュオカルマイシンに関する研究）

学位論文内容の要旨

癌化学療法において、複数の天然物あるいは合成化合物が実際に臨床で用いられている。一部の癌は、化学療法と他の外科的処置や放射線治療との組み合わせによる治療が確立し、治癒する事も可能と成ってきた。しかし、癌の大部分を占める固形癌に対して有効な制癌剤はなく、固形癌に対する制癌剤の開発は、待望されている。

このような背景の中で本研究では、微生物の生産する代謝物をスクリーニングし、*Streptomyces* 属放線菌の生産する新規な抗腫瘍性抗生物質デュオカルマイシン類を見だし、その発酵生産、精製、物理化学的性質、*in vitro* の生物学的活性ならびに*in vivo* のマウス腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果について明らかにしたものである。

1. DNA分子に作用する抗腫瘍性物質を求め、*Bacillus subtilis* の変異株(DNA組換え能欠損)を用いて、土壌より分離した微生物の生産物をプレスクリーニングした。その結果、新規な化合物群である duocarmycins(6つの類縁体 A, B1, B2, C1, C2, SA) を見いだした。これらの生産菌である D0-88, D0-89, D0-113 の3株すべては放線菌 *Streptomyces* 属と同定された。このうち D0-88, D0-89 は cellulose を資化できないが D0-113 は資化でき、D0-88, D0-89 は D-fructose, sucrose を資化できるが D0-113 はできなかった。これら資化性およびそれ以外の性質からも D0-88 と D0-89は分類上近縁と思われる。

2. D0-88 および D0-89株による培養で、培地にKBrを添加するとduocarmycin B1 および B2 が、また KClを添加すると duocarmycin C1 および C2 が生成することが明らかとなった。Duocarmycin A は培養液中で不安定であることから、より安定な duocarmycin B1, B2, C1, C2 の培養条件を検討した。単孢子分離により生産性のより高い D0-89 No.3-88 株を選択し、種々の培養条件のうち炭素源、窒素源の最適化をはかり、また培養の途中で疎水性吸着レジンであるAmberlite XAD-7を添加することにより、フラスコおよびタンクによる発酵生産において、培養条件検討前の約 20 倍から 30倍の生産量に向上させた(2000-literタンクによる生産量:B1 17 μ g/ml, B2 138 μ g/ml)。

3. D0-113 株による培養で、duocarmycin SA の培養条件を検討した。単孢子分離により生産性のより高い D0-113 No.N-113 株を選択し、種々の培養条件のうち炭素

源、窒素源の最適化をはかり、また微量元素の添加によって、フラスコおよびタンクによる発酵生産において、培養条件検討前の約10倍の生産量に向上させた(2000-literタンクによる生産量:SA 1.1 μ g/ml)。

4. 3つの生産株 D0-88, D0-89, D0-113のすべてが duocarmycin A および SA の両方を生産することが明らかとなった。このことから、duocarmycin A および SA は共通の生合成経路により生成することが示唆された。

5. D0-88 の培養液より duocarmycin Aを、D0-89 の培養液より duocarmycin B1, B2, C1, C2を、D0-113 の培養液より duocarmycin SA を、それぞれ溶媒抽出および順相あるいは逆相シリカゲルクロマトグラフィーなどにより精製、単離した。

6. 単離した duocarmycin 類の機器分析から、duocarmycin A および duocarmycin SA の分子式はそれぞれ $C_{26}H_{25}N_3O_8$ 、 $C_{25}H_{23}N_3O_7$ であり、spirocyclopropylhexadienone という共通構造を有していた。また duocarmycin B1および B2 は同一の分子式 $C_{26}H_{26}N_3O_8Br$ であり、duocarmycin C1およびC2は同一の分子式 $C_{26}H_{26}N_3O_8Cl$ であった。(Duocarmycin B1, C1) および(duocarmycin B2, C2)は分子中にハロゲン原子の結合したそれぞれ 5 員環、6員環構造を有しているが、これらは duocarmycin A のシクロプロパン環上の異なった位置でブロムイオンあるいはクロロイオンにより攻撃され、シクロプロパン環が開裂して生じたハロゲン化セコ化合物であった。

7. Duocarmycin 類はグラム陽性および陰性細菌に対し強い抗菌活性を有していた。例えばその活性は*Bacillus subtilis*に対し、SA(0.00065), A(0.0064), B1(0.013), B2(0.0033), C1(0.01), C2(0.0065)であった。()内の数字は最少阻止濃度(μ g/ml)を表す。

8. Duocarmycin 類は強力な抗細胞活性を有しており、これらのマウス Balb 3T3 /H-ras 細胞に対する活性の強さおよびその順位は以下のものであった。すなわち、SA(0.05)> A(0.3)> B2(1.5)> B1(3.0)> C2(20)> C1(40)。()内の数字は抗細胞活性 IC_{50} 値(nM)(50%の増殖阻害を示す濃度)を表す。

9. Duocarmycin Aは水溶液中あるいはプロテックな溶媒中で、化学的に不安定であるのに対し、duocarmycin SA は安定であった。また、duocarmycin A のハロゲン化セコ化合物であるduocarmycin B1, B2, C1および C2 は中性条件下で duocarmycin A へ変換することが明らかとなった。これらハロゲン化セコ化合物の抗細胞活性の強さと duocarmycin A への変換率が良く一致することから、セコ化合物の活性本体は duocarmycin A であると思われる。

10. Duocarmycin 類はマウス in vivo モデルにおける抗腫瘍性活性を有していた。すなわち腹腔内に移植されたマウス白血病 P388 に対し、duocarmycin A,B1, C1 およびSA は延命効果を有していた。また、皮下に移植されたマウス固形癌 sarcoma 180 に対し、すべての duocarmycin が mitomycin C と同等かそれ以上の強い増殖抑制効果を示した。特に duocarmycin SAは最も強い活性を示した(T/C % = 21, 0.1 mg/kg 単回静脈内投与。T/C は薬剤を投与した場合の癌容量を薬剤無投与時の癌容量で割った値であり、薬剤の抗腫瘍活性を表す)。

11. Duocarmycin B2 の抗腫瘍活性の増強、水溶性の向上、ならびに化学的安定性の向上をめざして誘導体合成がなされた結果、duocarmycin B2 の 8-O-carbamoyl 体である KW-2189 が選択された。このKW-2189 はヌードマウスに移植された16種のヒト腫瘍のうち、14種に対して有効であり、特にほとんどの制癌剤が無効である固形癌 stomach St-4 および colon Co-3 に対し有効であった。現在 KW-2189 は臨床試験中である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 本 間 守

学 位 論 文 題 名

Studies on Novel Antitumor Antibiotics Duocarmycins

(新規抗腫瘍性抗生物質デュオカルマイシンに関する研究)

本論文は、英文83頁、図19、表19、引用文献65、6章および補遺からなり、ほかに参考論文15編が付されている。

癌化学療法において、複数の天然物あるいは合成化合物が実際に臨床で用いられている。一部の癌は、化学療法と他の外科的処置や放射線治療との組み合わせによる治療が確立し、治癒する事も可能と成ってきた。しかし、癌の大部分を占める固形癌に対して有効な制癌剤はなく、固形癌に対する制癌剤の開発は、待望されている。

本研究では、微生物の生産する代謝物をスクリーニングし、Streptomyces 属放線菌の生産する新規な抗腫瘍性抗生物質デュオカルマイシン類を見だし、その発酵生産、精製、物理化学的性質、in vitro の生物学的活性ならびにin vivo のマウス腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果について明らかにしたものである。

第一章は、癌化学療法における抗腫瘍性抗生物質の位置づけ、および近年の新しいターゲットによる抗癌剤のスクリーニングについて述べられ、またデュオカルマイシンの作用機構と考えられる、DNA分子のアルキル化に関する知見について述べられている。

第二章では、スクリーニング、デュオカルマイシン類の発見、デュオカルマイシン類の発酵生産について述べられ、下記の内容が含まれている。

1. 微生物代謝物に、DNAに作用する抗腫瘍性物質を求め、Bacillus subtilisの変異株(DNA組換え能欠損)を用いてプレスクリーニングを行った。その結果、新規抗生物質 duocarmycins(A, B1, B2, C1, C2, SA)を見いだした。またそれらの生産菌 D0-88, D0-89, D0-113の3株は Streptomyces 属と同定された。
2. 種々の培養条件検討より以下の生産量が達成された。すなわち2000-literタンクにおいてD0-89株により B1 17 μ g/ml, B2 138 μ g/ml broth、D0-113株により SA 1.1 μ g/ml brothであった。

第三章では、それぞれのデュオカルマイシンの発酵ブロスからの精製およびそれ

らの物理化学的データについて述べられ、下記の内容が含まれている。

1. すべての duocarmycin は発酵ブロスより溶媒抽出、順相および逆相シリカゲルクロマトグラフィーにより精製、単離された。
2. 機器分析より、duocarmycin A および SA の分子式はそれぞれ $C_{26}H_{25}N_3O_8$, $C_{26}H_{23}N_3O_7$ であり、共通の spirocyclopropylhexadienone 構造を有していた。
3. 機器分析より、duocarmycin B1 および B2 は同一の分子式 $C_{26}H_{26}N_3O_8Br$ であり、duocarmycin C1 および C2 は同一の分子式 $C_{26}H_{26}N_3O_8Cl$ であった。
4. Duocarmycin B1、C1 は 6 員環、duocarmycin B2、C2 は 5 員環構造を有しているが、これらは duocarmycin A のシクロプロパン環上の異なる位置でブロムイオンあるいはクロロイオンにより攻撃され、シクロプロパン環が開裂して生じたハロゲン化セコ化合物であった。

第四章では、デュオカルマイシン類の *in vitro* における生物学的活性およびそれらの相互変換との関係について述べられ、下記の内容が含まれる。

1. Duocarmycin 類はグラム陽性、陰性細菌に対し強い抗菌活性を有していた。
2. Duocarmycin 類は強力な抗細胞活性を有し、マウス Balb 3T3/H-ras細胞に対する活性の強さとその順位は以下のものであった。すなわち、SA(0.05) > A (0.3) > B2 (1.5) > B1 (3.0) > C2 (20) > C1 (40)。()内の数字は増殖阻害活性の IC_{50} 値 (nM)を示す。
3. ハロゲン化セコ化合物 duocarmycin B1、B2、C1およびC2 は中性の水溶性溶媒中で duocarmycin A へ変換することがわかった。
4. これらハロゲン化セコ化合物の抗細胞活性の強さとduocarmycin A への変換率が良く一致することから、活性本体は、閉環により生じる duocarmycin Aと思われる。

第五章では、デュオカルマイシン類のマウス *in vivo* モデルにおける抗腫瘍活性について述べられ、下記の内容が含まれている。

1. Duocarmycin A, B1, C1 および SA は移植性白血病 P388 に対し、延命効果を有していた。
2. すべての duocarmycin (A, B1, B1, C1, C2, SA)は、移植性固形癌のsarcoma 180 に対し有効な制癌作用を有していた。

以上のように、新規物質デュオカルマイシンを見だし、その精製、単離を行うとともに、マウス*in vivo* モデルにおける制癌活性を明らかにし、今後の癌化学療法剤あるいはリード化合物としての可能性を示した。

以上は基礎的にも応用的にも寄与するところが大きな成果であり、よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者 市村 通朗は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。