

学 位 論 文 題 名

新規細胞機能調節物質の化学構造と生物活性

学位論文内容の要旨

免疫抑制剤は、臓器移植における拒絶反応の抑制、過剰な免疫反応が誘導され発症するアレルギー疾患および自己免疫疾患等の治療に有効である。現在、cyclosporin A および FK-506 が臓器移植時の拒絶反応抑制等の治療に臨床応用されているものの、より有効性および安全性が高く、既存の免疫抑制剤と作用機序の異なる薬剤の開発が望まれている。

本研究では、マイトジェン刺激リンパ球幼若化反応と KB 細胞（ヒト口腔がん由来）増殖阻害活性の感受性の相違を指標として、微生物を起源に、新規免疫抑制物質を探索することを目的とした。

1. 新規免疫抑制物質 SNF4435 および D

放線菌 SNF4435 株の培養液が新規免疫抑制物質を生産していることを見出し、その分類学的諸性質を明らかにした結果、SNF4435 株は *Streptomyces spectabilis* と同定された。本菌株の培養液から各種精製法により 2 種の化合物、SNF4435C および D が単離された。SNF4435C および D は、各種スペクトルデータの解析からいずれも $C_{28}H_{31}NO_6$ の分子式を有し、既存の免疫抑制物質とは異なる互いにジアステレオマーな新規 nitrophenyl pyrone 化合物であることが明らかとなった (Fig. 1)。SNF4435C および D は、各種がん細胞およびラット正常肝細胞の増殖を阻害しない濃度においてマイトジェン刺激リンパ球幼若化反応を抑制した。興味深いことに、concanavalin A (Con A) 刺激よりも lipopolysaccharide (LPS) 刺激のリンパ球幼若化反応を抑制し、T 細胞より B 細胞に対して強く作用した。両化合物はマウス混合リンパ球反応 (MLR; mixed lymphocyte reaction) において interleukin-2 (IL-2) の産生をほとんど抑制せず、また IL-2 の有無に関わらず同等の抑制活性を有しており、それらの挙動は FK-506 と明らかに異なっていた。SNF4435C と D の免疫抑制活性を比較すると、マイトジェン刺激リンパ球幼若化反応および MLR のいずれにおいても SNF4435D の方が C より強い抑制作用を有し、両化合物の立体化学の相違が免疫抑制作用に影響を与えているものと推定された。比較的物量確保が容易であった SNF4435C について *in vivo* の免疫抑制作用を調べた。SNF4435C はマウス遅延型過敏症モデルに対して用量依存的に足浮腫を阻害するのみならず、ラット皮膚移植試験においても移植片の生着を延長し、*in vivo* においても免疫抑制作用が認められた。

一方、SNF4435C および D はいずれも多剤耐性がん細胞の耐性克服作用が認められた。両化合物は薬剤排出ポンプとして機能する P 糖蛋白質を発現している多剤耐性細胞 AD₁₀ の vincristine (VCR) の細胞内蓄積量を濃度依存的に増加させたことから、P 糖蛋白質を阻害することで耐性克服効果を示すことが推察された。両化合物の VCR 蓄積作用は verapamil、cyclosporin A および FK-506 よりも優れていた。SNF4435C および D は *in vitro* において多剤耐性克服作用がほぼ同じであったことから、より免疫抑制作用の弱い SNF4435C について多剤耐性マウス白血病 P388/VCR に対する *in vivo* 抗がん効果を調べた。その結果、VCR (0.2 mg/kg) に SNF4435C を 5 および 10 mg/kg 併用投与することで延命効果が認められ、本化合物の *in vivo* 多剤耐性克服作用が確認された。

2. 新規免疫抑制物質 SW-163A および B

放線菌 SNA15896 株の培養液が新規免疫抑制物質を生産していることを見出し、その分類学的諸性質を明らかにした結果、SNA15896 株は *Streptomyces* 属であると判断された。本菌株をジャー培養し、得られた培養液から各種精製操作により 2 種類の活性物質 SW-163A および B を単離した。各種スペクトルデータを解析した結果、SW-163A および B の分子式はそれぞれ $C_{34}H_{42}N_2O_{12}$ および $C_{33}H_{40}N_2O_{12}$ であり、4 分子の hydroxycarboxylic acid および 1 分子の threonine から成る大環状エステル構造を有する新規化合物であることが判明した (Fig. 1)。SW-163A および B はいずれもマイトジェン刺激リンパ球幼若反応および MLR を濃度依存的に阻害し、その阻害活性はほぼ同等であった。また、両化合物は Con A および LPS いずれで刺激したマウスリンパ球幼若化反応をほぼ同じ濃度で抑制し、活性化リンパ球にも強く作用したことから FK-506 とは異なる作用機序によりリンパ球の活性化を抑制している可能性が示唆された。

3. 新規抗がん物質 SW-163C および E

免疫抑制物質 SW-163A および B を生産する放線菌 *Streptomyces* sp. SNA15896 株の培養液中にリンパ球よりも KB 細胞の増殖を強く抑制する化合物の存在が見出された。SNA15896 株の培養液から各種精製法により SW-163C および E が単離された。SW-163C および E の分子式はそれぞれ $C_{52}H_{60}N_{10}O_{14}S_2$ および $C_{54}H_{64}N_{10}O_{14}S_2$ であり、両化合物はいずれも UV スペクトルから分子内に 3-hydroxy quinaldic acid の存在が示唆された。各種 NMR スペクトルデータの解析から SW-163C および E はクロモフォアとして 3-hydroxyquinaldic acid を有するオクタデブシペプチドであることが判明した (Fig. 1)。両化合物の構造的相違点は SW-163C が分子内架橋としてジスルフィド架橋を有するのに対して SW-163E はチオアセタール架橋を有している点のみであった。SW-163C および E はいずれも強い細胞障害活性を有し、その IC_{50} 値はそれぞれ 17~140 nM および 0.2~1.6 nM であり、SW-163E の方が C に比較して約 100 倍強い活性を示した。また、両化合物はともに HL-60 細胞に対してアポトーシス誘導活性を有しており、アポトーシス小体および DNA ラダーが確認された。さらにフローサイトメーターで SW-163C および E を作用させ HL-60 細胞の細胞周期を解析した結果、両化合物はいずれも G_1 期で細胞周期を停止させていた。SW-163C および E は総合がん・制がん剤スクリーニング委員会 (財団法人癌研究会) の細胞パネルスクリーニングにおいて既存の抗がん剤とは異なる作用機序で細胞障害性を示していることが推察され、*in vivo* 抗がん試験においてマウス白血病細胞 P388 およびマウス黒色腫 B16 のみならず多剤耐性がん細胞 P388/VCR にも有効性が確認された。

多くの疾患は特定の組織の細胞機能が異常に抑制または亢進されることにより生体内のバランスを崩してしまうことで引き起こされる。このバランスを崩した細胞機能を特異的に調節することができるならば、その多くは治療されるものと考えられる。本研究において見出された化合物は、その特異的細胞機能抑制作用により医薬品のリードとして有望であるばかりでなく、細胞生物学の研究ツールとしても有益と考えられる。

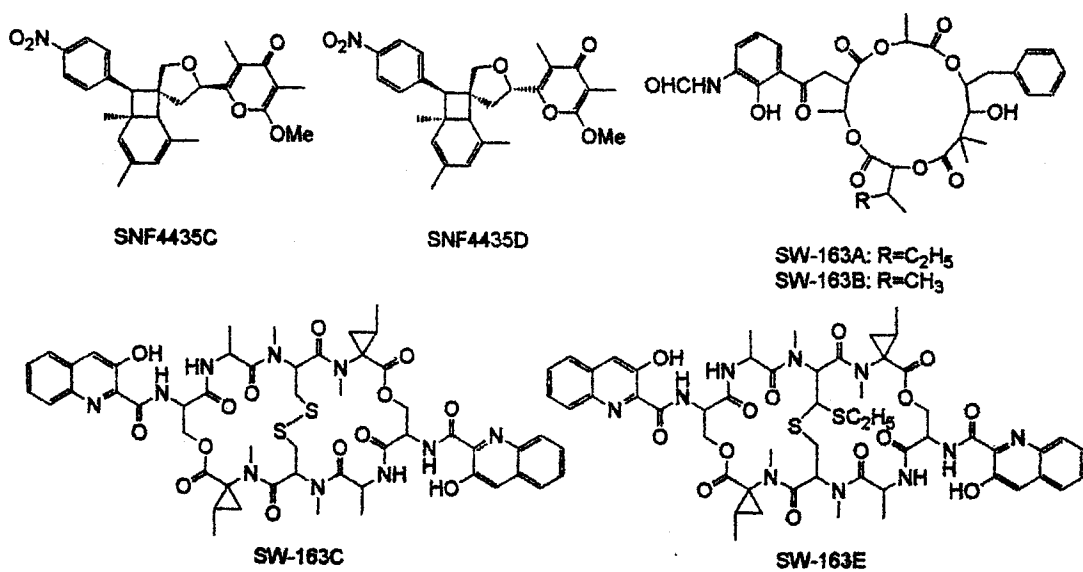


Fig. 1. Structures of SNF4435C, SNF4435D, SW-163A, SW-163B, SW-163C, and SW-163E.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 原 照 彦

副 査 教 授 佐 野 嘉 拓

副 査 教 授 田 原 哲 士

学 位 論 文 題 名

新規細胞機能調節物質の化学構造と生物活性

免疫制御剤は、臓器移植における拒絶反応の抑制、過剰な免疫反応が誘導され発症するアレルギー疾患および自己免疫疾患等の治療に有効である。現在、cyclosporin A および FK-506 が臓器移植時の拒絶反応抑制等の治療に臨床応用されているものの、より有効性および安全性が高く、既存の免疫抑制剤と作用機序の異なる薬剤の開発が望まれている。

本研究では、マイトジェン刺激リンパ球幼若化反応と KB 細胞（ヒト口腔がん由来）増殖阻害活性の感受性の相違を指標として、微生物を起源に、新規免疫抑制物質を探索することを目的としている。

1. 新規免疫抑制物質 SNF4435 および D

放線菌 *Streptomyces spectabilis* SNF4435 株の培養液が新規免疫抑制物質を生産していることを見出し、その菌株の培養液から各種精製法により 2 種の化合物、SNF4435C および D を単離した。SNF4435C および D は、いずれも $C_{28}H_{31}NO_6$ の分子式を有し、既存の免疫抑制物質とは異なる互いにジアステレオマーな新規 nitrophenyl pyrone 化合物であることが明らかとなった。(Fig.1) SNF4435C および D は FK-506 とは異なり Con A 刺激よりも LPS 刺激のリンパ球幼若化反応を抑制し、T 細胞より B 細胞に対して強く作用した。SNF4435C と D の免疫抑制活性を比較すると、マイトジェン刺激リンパ球幼若化反応において SNF4435D の方が C より強い抑制作用を有し、両化合物の立体化学の相違が免疫抑制作用に影響を与えているものと推定された。SNF4435C について、ラット皮膚移植試験を行った。結果、移植片の生着が延長され、本化合物は *in vivo* においても免疫制御作用が認められた。

一方、SNF4435C および D はいずれも *in vitro* において P 糖蛋白質を発現している多剤耐性細胞 AD₁₀ の vincristine(VCR)の細胞内蓄積量を濃度依存的に増加させたことから、P 糖蛋白質を阻害することで耐性克服効果を示すことが推察された。さらに SNF4435C は *in vivo* 多剤耐性克服作用も確認された。

2. 新規免疫抑制物質 SW-163A および B

放線菌 *Streptomyces* SNA15896 株の培養液が新規免疫抑制物質を生産していることを見出し、その培養液から各種精製操作により 2 種類の活性物質 SW-163A および B を単離した。各種スペクトルデータを解析した結果、SW-163A および B の分子式はそれぞれ $C_{34}H_{46}N_2O_{12}$ および $C_{33}H_{46}N_2O_{12}$ であり、環状エステル構造を有する新規化合物であることが判明した(Fig.1)。SW-163A および B はいずれもマイトジェン刺激リンパ

球幼若反応および MLR を濃度依存的に阻害し、その阻害活性はほぼ同等であった。また、両化合物は FK-506 とは異なり Con A および LPS いずれかで刺激したマウスリンパ球幼若化反応をほぼ同じ濃度で抑制した。

3. 新規抗がん物質 SW-163C および E

免疫抑制物質 SW-163A および B を生産する放線菌 *Streptomyces* sp. SNA15896 株の培養液中にリンパ球よりも KB 細胞の増殖を強く制御する化合物の存在が見出され、その培養液から各種精製法により SW-163C および E が単離された。SW-163C および E の分子式はそれぞれ $C_{52}H_{60}N_{10}O_{14}S_2$ および $C_{54}H_{64}N_{10}O_{14}S_2$ であり、クロモフォアとして 3-hydroxyquinaldic acid を有するオクタデシペプチドであることが判明した (Fig.1)。両化合物の構造的相違点は SW-163C が分子内架橋としてジスルフィド架橋を有するのに対して SW-163E はチオアセタール架橋を有している点のみであった。SW-163C および E はいずれも強い細胞障害活性を有し、SW-163E の方が C に比較して約 100 倍強い活性を示した。また、両化合物はともに HL-60 細胞に対してアポトーシス誘導活性を有しており、フローサイトメーターで S 細胞周期を解析した結果、両化合物はいずれも G_1 期で細胞周期を停止させていた。In vivo 抗がん試験においてマウス白血病細胞 P388 およびマウス黒色腫 B16 のみならず多剤耐性がん細胞 P388/VCR にも有効性が確認された。

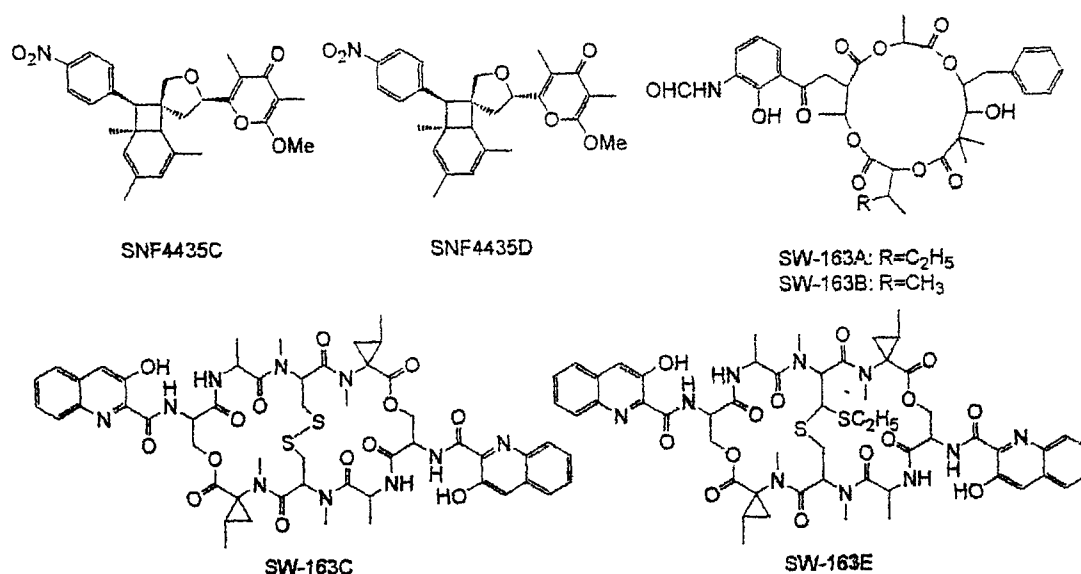


Fig. 1. Structures of SNF4435C, SNF4435D, SW-163A, SW-163B, SW-163C, and SW-163E.

本研究において見出された化合物は、その特異的細胞機能抑制作用により医薬品のシードとして有望であるばかりでなく、細胞生物学の研究ツールとしても有益と考えられる。

よって審査員一同は、高橋公咲が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。