

論文審査の結果の要旨

クロコブタケからの血管新生阻害活性物質の探索 ～血管内皮細胞増殖阻害活性を指標として～

Search for Antiangiogenic Constituents from *Hypoxylon truncatum*
~Evaluation of Antiproliferative Activities against Vascular Endothelial Cells~

論文提出者 深井 みゆき (Fukai, Miyuki)

本研究は、血管新生阻害を機序とする抗がん剤開発のシードとなり得る化合物をキノコから探索するものである。HUVEC（ヒト臍帯静脈内皮細胞）増殖試験を一次スクリーニングとして用い、74種のキノコから得た143種の抽出エキスについて試験を行った。その結果41種のキノコ抽出エキスに活性が認められた。この内、活性化合物の単離、構造決定を行うに十分なエキス量があり、さらに、文献から天然において非常に珍しい骨格を有する化合物の単離報告のあるキノコということで、クロコブタケ (*Hypoxylon truncatum*) を材料として選り研究を行っている。

クロコブタケ CHCl_3 抽出エキスから、活性試験と各種クロマトグラフィーを用いた分離操作を並行して行い、benzo[j]fluoranthene 骨格を有する化合物12種を単離し各種機器データを用いて平面構造を明らかにした。7種は新規化合物、5種は既知化合物であった。しかしながら5種の既知化合物に関

しては立体構造が未決定であったので、12種すべてに関して X線結晶構造解析および CD スペクトルを用いて立体構造を明らかにした。

得られた 12 種の benzo[j]fluoranthene 化合物について HUVEC 増殖試験を行ったところ、9 種は IC₅₀ が 5.8~24 μM の範囲で阻害活性を示したが、3 種は IC₅₀ が 50 μM 以上であった。さらに、血管内皮細胞の増殖の他に、血管新生で必須な過程である「細胞の遊走」、「管腔形成」に関しても含量の一番多かった (HUVEC 増殖抑制; IC₅₀= 21 μM) を用いて検討を行った。その結果、HUVEC 増殖抑制の IC₅₀ 値より低い濃度で濃度依存的に HUVEC の遊走阻害及び管腔形成の阻害を示した。従って、hypoxylonol C は血管新生阻害活性を有している事が明らかとなった。

血管新生阻害剤で現在臨床応用されている薬剤は VEGF (血管内皮増殖因子) のヒト化モノクローナル抗体である bevacizumab (Avastin®) と VEGF 受容体などのキナーゼを阻害するマルチキナーゼ阻害剤の sunitinib (Sutent®) や solafenib (Nexavar®) などである。そこで、benzo[j]fluoranthene 化合物の血管新生阻害作用の作用機序を明らかにする研究を行った。

初めに、VEGF-VEGFR が関与する可能性が考えられるので、血管新生で重要な役割を担っている VEGFR-2 (KDR) のチロシンキナーゼ阻害活性試験を検討した。その結果、hypoxylonol C は 300 μM の高濃度においてもほとんど阻害活性を示さなかった。そこで、血管新生阻害作用の作用機序解明のため、cDNA マイクロアレイ解析を用いて網羅的に遺伝子への影響を検討した。その結果、細胞周期関連の遺伝子と接着因子関連の遺伝子に多くの発現低下が認められた。さらにこれら関連遺伝子についてリアルタイム RT-PCR を行った。細胞周期に関しては cyclin A や CDK1 の mRNA の発現低下が認められ、また、接着関連に関しては、インテグリンや血管内皮細胞特異的な

細胞間接着因子である VE-cadherin の mRNA 発現低下が認められた。以上の結果から、hypoxylonol C は VEGF-VEGFR 系には関与せず、cyclin A や CDK1 の mRNA の発現低下により血管内皮細胞の増殖を抑え、さらにインテグリンや VE-cadherin の mRNA の発現低下により管腔形成を阻害して血管新生を阻害している事が示唆された。従って、hypoxylonol C は従来の血管新生阻害薬とは全く異なったユニークな骨格で、さらに細胞増殖と管腔形成の 2 点に作用点を持つという特徴を持っていることから、新たなタイプの血管新生阻害薬のシードになり得ることを明らかにした。

以上より、本研究は血管新生阻害剤開発において貢献度が高く、博士（薬学）の学位に十分値するものと判断する。

平成 26 年 3 月 1 日

主査 明治薬科大学 教授

小山清隆 印

副査 明治薬科大学 教授

岡田嘉仁 印

副査 明治薬科大学 教授

齋藤直樹 印