

論文の内容の要旨

氏名：市丸 嘉

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：Indirubin の生物学的親和性を利用したハイブリッド型抗腫瘍剤の創製

1. はじめに

近年、ライフスタイルの変遷とともに増加の一途をたどっている悪性新生物による疾患は、数十年にわたって日本人の主要な死因の一つであり続けている。腫瘍細胞の異常な増殖能は、関連タンパク質の機能亢進によって支えられており、この機能は多くの場合リン酸化酵素 (kinase) によって制御されている。そのため、特に腫瘍細胞内で盛んに機能する kinases を標的とした inhibitor は抗腫瘍剤としての作用が期待され、実際に imatinib や gefitinib に代表される低分子量分子標的薬が臨床で大きな成果を上げている。Kinase は ATP を補酵素として標的タンパク質をリン酸化するため、構造中に ATP-binding site が存在する。中医学において慢性骨髄性白血病に処方されてきた青黛の活性成分として見出された indirubin は、kinase の ATP-binding site に親和性をもつ化合物で、多くの低分子量分子標的薬と同様に含窒素芳香環構造をもつ化合物である (Figure 1)。Indirubin は、細胞周期を制御する glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) や cyclin-dependent kinases (CDKs) に対して強い親和性を有し、ATP-binding site への結合を介したタンパク機能の阻害によって抗腫瘍活性を発揮していると考えられている。更に indirubin の生物活性は、置換基の導入や部分構造の変換によって大きく影響を受けることも分かっており、kinase に対する特異性や腫瘍細胞選択性が変化する。本研究では、indirubin 分子の kinase 指向性を利用した新規ハイブリッド型 indirubin 誘導体の開発を行った。

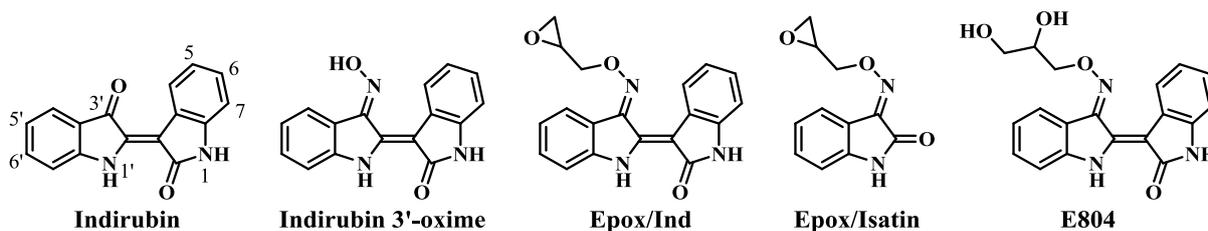


Figure 1. Structures of indirubin and its related compounds.

2. ハイブリッド型 indirubin 誘導体 Epox/Ind の開発

元来、天然物由来成分として単離された indirubin は、培養細胞を用いた検討において細胞傷害活性を示す濃度は非常に高く、そのため、これまでに indirubin の生物活性について検討してきた研究のほぼすべてが、3'位 carbonyl 基を oxime 基に変換した indirubin 3'-oxime (indox) を母化合物とする indirubin 誘導体に関するものである。申請者は indox の oxime 部位を足場として、タンパク質や核酸などの生理活性分子と強力に反応する原子団を導入したハイブリッド型 indirubin 誘導体の開発を企て、indirubin 3'-(O-oxirane-2-ylmethyl)oxime (Epox/Ind) を合成した (Figure 1)。Epox/Ind は、腫瘍細胞内で盛んに機能する protein kinases に対して親和性を有する indirubin 部分と、強力なアルキル化活性を有する oxirane を結合させた indirubin 誘導体で、非特異的な oxirane の反応性を indirubin 結合性 protein kinases に特化させたものである。Epox/Ind の合成は塩基性条件下 indox を epibromohydrin に求核置換させる 1 段階反応で完結し、比較的高い収率で目的物を得ることができる (Scheme 1)。Epox/Ind の細胞傷害活性はヒト肝がん細胞 HepG2 を用いた alamarBlue[®] assay によって評価した (Figure 2)。HepG2 に対する 50% 生育阻害濃度 (IC₅₀ 値) を比較すると、母化合物とした indox の IC₅₀ 値は 15 μ M であったのに対して、Epox/Ind のそれは 1.7 μ M であった。強力な抗腫瘍効果を示す cis-platin の IC₅₀ 値が 4.0 μ M であることから、Epox/Ind は cis-platin と同等以上の強力な抗腫瘍活性を有していることが明らかになった。また、indirubin の前駆体である isatin に対して、同様に oxime 化および oxirane の導入を行って調製した Epox/Isatin は 10 μ M でも HepG2 の増殖を阻害しなかった。以上のことから、Epox/Ind においては、indirubin 分子の構造に基づく腫瘍細胞指向性と、oxirane の導入による細胞傷害活性の向上を達成することができたとと言える。

Indirubin に導入する原子団として oxirane を選択した理由の一つに、アルキル化反応の標的として kinase の ATP-binding site 周辺に存在する Cys 残基の利用がある。とりわけ GSK-3 β における Cys199 は、酵素活性発現において最も重要なアミノ酸残基とされている。そこで Epox/Ind の反応性を確認するために、生体内環境に見立てた穏和な条件下で 2-mercaptoethanol と反応させたところ、thiol 基と oxirane が共有結合を形成することを確認した (Scheme 2)。このことから、Epox/Ind は GSK-3 β の Cys199 や、CDK5 の Cys83 のような ATP-binding site 内の Cys 残基と共有結合を形成して強力に kinase 機能を阻害しているのではないかと想定している。

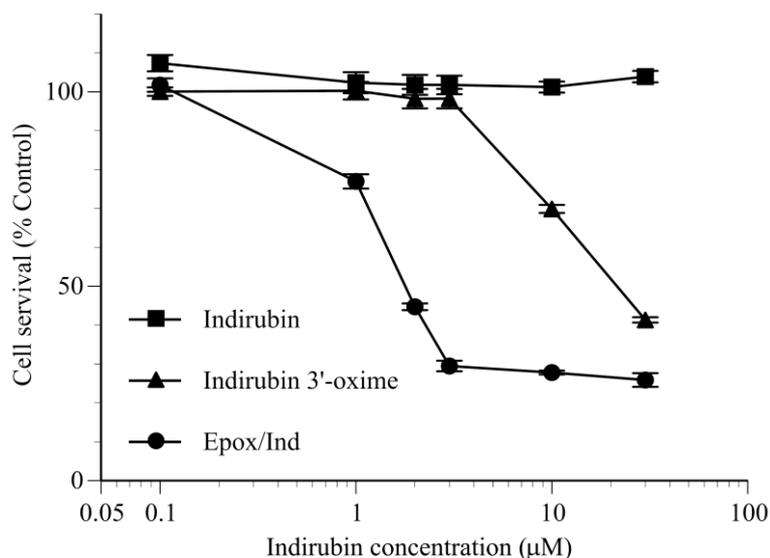
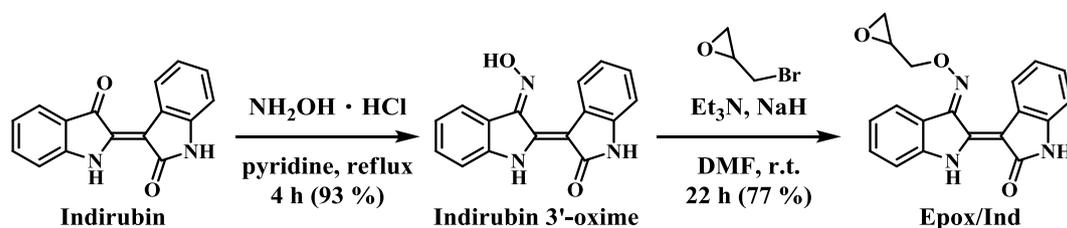
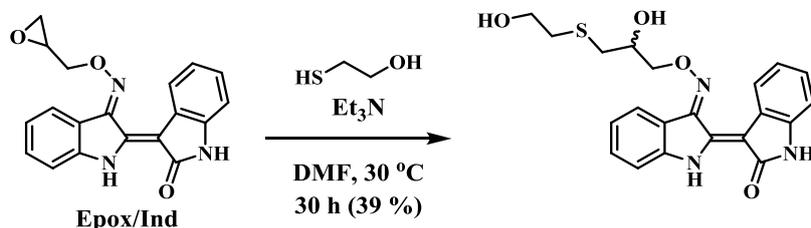


Figure 2. The cytotoxic activity of indirubins on HepG2 cells.



Scheme 1. Synthesis of Epox/Ind.



Scheme 2. Reactivity of Epox/Ind with 2-mercaptoethanol.

3. Epox/Ind の生物学的安定性

Epox/Ind の高い細胞傷害活性を担う oxirane は、高度にひずんだ環状構造のため化学的にも安定性が低く、Epox/Ind の抗腫瘍活性が代謝物あるいは分解物に基づく可能性も考慮する必要がある。そこで、代謝酵素に富む HepG2 の高濃度細胞溶解液 (cell lysate) 中で incubate したときの Epox/Ind の生物学的安定性を検討した。反応液の有機溶媒抽出画分を HPLC に付したところ、Epox/Ind の peak が一部消失して、新たな peak が出現することを見出した (Figure 3)。更に UPLC/MS を用いて、新たに現れた peak は E804 (Figure 1) であることを確認した。E804 は Epox/Ind の oxirane 部分が加水分解して diol 構造に変化した構造の化合物で、Eisenbrand らによって apoptosis の誘導による抗腫瘍活性が報告されている。そこで Epox/Ind と E804 の細胞傷害活性を alamarBlue[®] assay によって比較したところ、E804 の HepG2 に対する IC₅₀ 値は 2.1 μM であり、Epox/Ind (1.7 μM) として添加した方が、IC₅₀ 値が低くなることが示された。また、3 μM の Epox/Ind および E804 を HepG2 に曝露するとき、通常の 24 時間曝露では、Epox/Ind は 71%、E804 は 63% の細胞傷害活性を示したが、72 時間になると Epox/Ind は更に強く 89% となり、一方 E804 は 58% と両者の細胞傷害活性の差異は大きくなった。このことから、Epox/Ind は作用の持続時間にも優れていた。残存する Epox/Ind は、次第に E804 に変換されて細胞毒性が減弱化していくことが示唆されたことから、低蓄積毒性の抗腫瘍剤である可能性が示された。

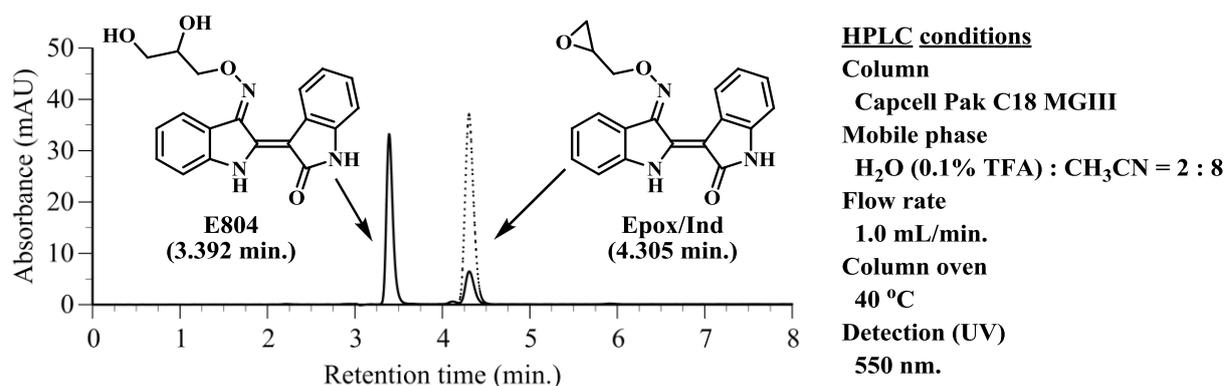


Figure 3. HPLC chromatogram of extracts following incubation of Epox/Ind with (solid line) or without (dotted line) HepG2 cell lysate for 1h.

4. Epox/Ind 誘導体の細胞傷害活性

Indirubin 誘導体は、Epox/Ind のように indox の oxime 部位に生物活性の中心となる原子団を導入したものと、indole 骨格の水素を halogen 原子や methoxy 基などと置換したものとに大別される。天然の貝類が生成する bromindirubin は、1 つないしは 2 つの Br が indole 骨格に置換した indirubin 誘導体で、高い抗腫瘍活性を示す化合物も存在する。そこで、indirubin 骨格に Br を導入する事で、Epox/Ind の抗腫瘍活性を増強することができないか検討した。Indirubin の 5, 6, 7, 5', 6'-位に Br を 1 つないしは 2 つ置換した Br-indirubin 3'-oxime を合成し、oxirane を導入する事で Epox/Br-Ind へと導いた。HepG2 を用いた alamarBlue® assay によって腫瘍細胞傷害活性を比較したところ、5 位を Br に置換した Epox/5-Br-Ind の IC₅₀ 値が 0.62 μM と最も低い値として観察されたことから、特定の位置を Br に置換することで Epox/Ind の抗腫瘍活性を増強できることが判明した (Table 1)。更に、Epox/5-Br-Ind の作用持続時間についても検討したところ、Epox/Ind よりも低濃度の 1 μM で、HepG2 に対する試薬の暴露時間を 24 時間から 72 時間に延長したことに伴う細胞傷害割合の増加が認められた。また、HepG2 cell lysate を用いて Epox/5-Br-Ind の安定性を検討したところ、Epox/Ind と同様に oxirane が加水分解した

Table 1. The IC₅₀ values of Br-substituted indirubins on HepG2 cells.

	Oxime Form IC ₅₀ values (μM)	Epox Form IC ₅₀ values (μM)
Non substituted	15	1.7
5-Br	6.9	<u>0.62</u>
6-Br	5.3	-
7-Br	4.8	37
5'-Br	11	3.3
6'-Br	14	4.5
5,6-Br ₂	4.4	1.9
5,5'-Br ₂	7.0	2.5
5,6'-Br ₂	-	-
6,5'-Br ₂	3.2	-
6,6'-Br ₂	16	-
7,5'-Br ₂	4.9	10
7,6'-Br ₂	17	-

誘導体由来する peak の出現が認められた。Epox/Ind を同様の条件で incubate すると peak 面積の約 80% が消失したが、Epox/5-Br-Ind では peak 減少は約 60% にとどまった。これは、5 位を Br に置換したことで oxirane を加水分解する生物学的あるいは化学的機構の基質となりにくくなったためと考えられる。

5. 総括

Epox/Ind は、腫瘍細胞の細胞周期制御で盛んに機能する kinases の ATP-binding site に親和性を有する indirubin とアミノ酸残基や核酸を強力にアルキル化する oxirane とを組み合わせた新規ハイブリッド型 indirubin 誘導体である。特に Cys 残基のアルキル化活性によって indirubin 結合性 kinase の機能を強力に阻害すると考えられており、cis-platin と同等以上の細胞傷害活性を有する。Epox/Ind の活性中心である oxirane は、生細胞中で徐々に加水分解を受けて diol 型の E804 に変換される。E804 の抗腫瘍活性は Epox/Ind に比べて持続性に劣るため、Epox/Ind の蓄積毒性が緩和されていることから、本誘導体は副作用の少ない抗腫瘍剤となる可能性を秘めていると言える。Epox/Ind の抗腫瘍活性は、5 位を Br に置換することによってさらに増強し、低濃度で抗腫瘍活性が持続化ようになる。これは、置換基の存在によって oxirane 部位が分解されにくくなったことに由来している。以上のことから、本研究で開発した Epox/Ind およびその誘導体は、新規分子標的薬の有望な seed 化合物となるものと期待される。