

論文の内容の要旨

氏名：栗田 雅弘

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：神経芽腫に対する天然物由来化合物の抗腫瘍効果に関する研究

1. はじめに

神経芽腫は神経堤細胞を起源とする悪性固形腫瘍であり、副腎髄質や交感神経節から多く発生する。0歳から5歳前後に発症する胎児性腫瘍であり、白血病、脳腫瘍に次いで患者数が多く、小児での発症頻度が高い腫瘍である。特に進行症例 (stage 4) は40%を占め、5年生存率は35%を下回り、予後が極めて不良である。進行期の患者には化学療法や造血幹細胞移植療法、手術療法などの集学的治療が行われ、特に化学療法は多剤併用療法が行われる。しかし、化学療法に抵抗し、シスプラチンやシクロフォスファミドなどの高用量による治療で、腎障害、骨髄抑制などの重篤な有害事象や晩期障害を生じることが問題とされている。一方で、転移しているにもかかわらず、自然退縮して消退する予後良好症例 (stage 4S) が存在し、多様な腫瘍動態を示す。この自然退縮には、アポトーシス誘導や分化誘導の関与が報告されており、進行神経芽腫に対し、これらを導く化合物は治療薬となる可能性が期待される。

そこで本論文は、天然物に由来する種々の化合物について、抗腫瘍効果の検討を行った。抗腫瘍活性を有する候補化合物を、indirubin、burchellin、chalcone 化合物から見出し、その抗腫瘍効果のメカニズムを明らかにすることで、神経芽腫の新たな治療薬開発への有用性を検討した。

2. 実験に用いた細胞および実験方法

培養細胞は、ヒト神経芽腫細胞株 (IMR-32、LA-N-1、NB-39、SK-N-SH)、対照としてヒト正常細胞 (血管内皮細胞: HUVEC、皮膚繊維芽細胞: NHDF) を用いて行った。細胞傷害活性は、試験化合物を48h作用させ、MTT法もしくはCCK-8法により評価をした。アポトーシス誘導効果はHoechst 33324染色法により細胞核を染色し、蛍光顕微鏡にて核の形態変化を観察した。さらに、フローサイトメトリー (FCM) を用い、Annexin-V/PI染色による初期アポトーシスの検出、およびPI染色によるDNA含量の測定によって細胞周期解析の検討を行った。Caspase試験は、caspase proteaseによる蛍光基質の測定によるcolorimetric assay、caspase inhibitor (z-VAD-fmk) を用いて評価した。アポトーシスおよび細胞周期関連タンパク質の発現量を、SDS-PAGEおよびWestern blot法により評価した。

3. Indirubin 3'-epoxide の抗腫瘍効果の検討

Indirubin は板藍根に含まれる成分の一つであり、indole 骨格を有する化合物である。Indirubin は白血病をはじめ、さまざまな腫瘍に対しての活性が報告されている。また、このindirubin誘導体はサイクリン依存性キナーゼ (CDK) やグリコーゲン合成酵素 (GSK-3) の抑制作用により、細胞周期、細胞分化などに影響を与えることが知られている。そこで、さまざまなindirubin誘導体について神経芽腫に対する細胞傷害活性の検索を行い、優れた腫瘍細胞傷害活性を示したindirubin 3'-epoxide (Fig. 1) のアポトーシス誘導効果を明らかにした。

Indirubin 誘導体の細胞傷害活性をMTT法により評価した。神経芽腫細胞 (IMR-32) に対してindirubin 3'-epoxideは $IC_{50} = 0.16 \mu M$ と優れた活性を示した (Fig. 2)。IndirubinはCDKの抑制により、細胞周期に影響を与えることが報告されている。そこでFCMを用いた細胞周期解析を行ったが、indirubin 3'-epoxideの作用による細胞周期への影響は認められなかった (データ未掲載)。一方、アポトーシスに認められるsub-G₁が増加を示したため、アポトーシス誘導効果およびその作用機序について検索した。

Hoechst 33342染色法によりアポトーシスに特徴的な核の凝集が観察された (データ未掲載)。また、Annexin-V/PI二重染色法により濃度依存的な初期アポトーシス細胞群の増加が認められたことから、アポトーシスを誘導することが示唆された。Indirubin 3'-epoxideによる

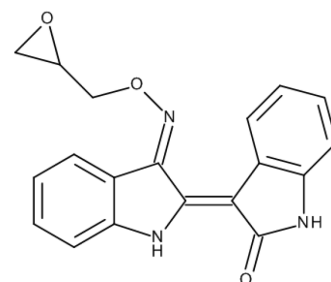


Fig. 1 Indirubin 3'-epoxide

作用機序を明らかにするため、caspase colorimetric assay による caspase 活性の評価を行った。Indirubin 3'-epoxide による caspase 活性は caspase-9 に活性傾向が認められたが、caspase-3 の活性化は認められなかった (データ未掲載)。さらに、Western blot 法によるアポトーシス関連タンパク質の検出においては、caspase-3、-7 の活性化タンパク質発現は認められなかった (Fig. 3A)。この結果から、indirubin 3'-epoxide による細胞死は、caspase 非依存型のアポトーシス誘導によるものであることが示唆された。一方で、アポトーシスの指標となる poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の断片化が認められた (Fig. 3A)。そこで caspase 経路に関与することなくアポトーシスを誘導するアポトーシス誘導因子 (AIF) に着目した。ミトコンドリア内膜に局在する AIF は細胞内シグナルにより放出され、AIF の核内移行により DNA の凝集を促進し、アポトーシスを誘導することが知られている。細胞核と細胞質のタンパク質分画抽出を行い、Western blot 法にて AIF の核への移行を評価した。その結果、核抽出タンパク質において 24 h 後に AIF の増加が認められた (Fig. 3B)。このことから、caspase 非依存型アポトーシスには、AIF の核移行によるアポトーシス誘導が関与することが示唆された。

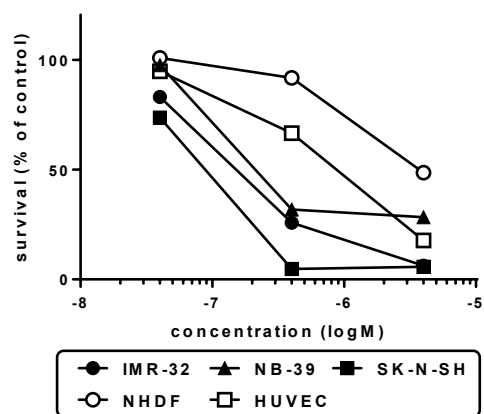


Fig. 2 Cytotoxicity of indirubin 3'-epoxide

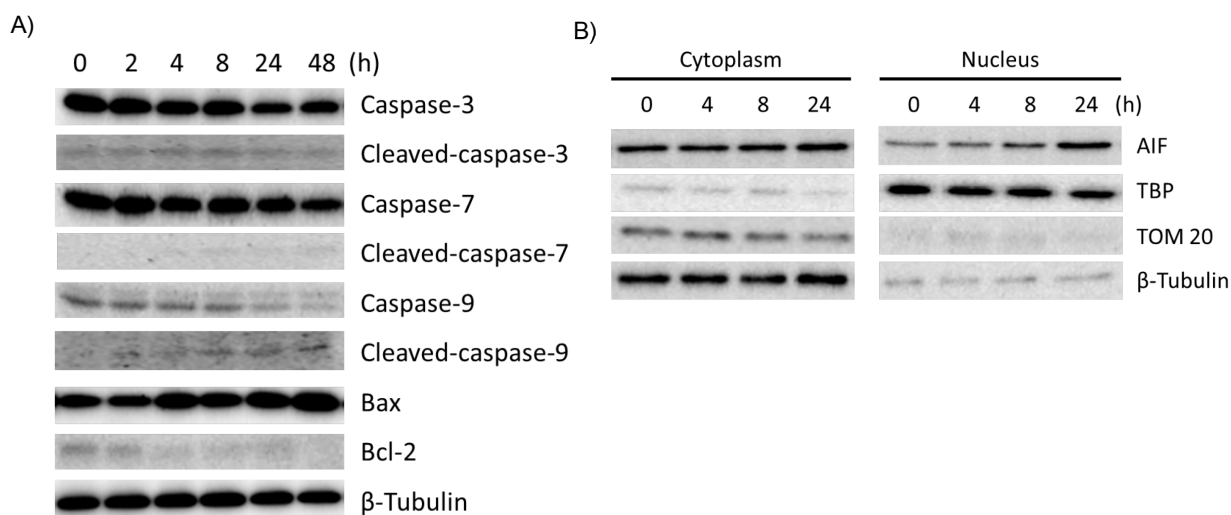


Fig. 3 Western blot analysis for apoptosis-related protein (Indirubin 3'-epoxide)

4. Burchellin 誘導体のアポトーシス誘導効果の検討

Burchellin は *Aniba burchellii* (クスノキ科) 等に含まれる neolignane 化合物である。Neolignane 化合物には、肺がん、乳がん、白血病などに対して抗腫瘍作用を示すことが報告されている。そこで burchellin を基本骨格とする合成 neolignane 誘導体について、神経芽腫に対する細胞傷害活性の検索を行い、アポトーシスを誘導する化合物を見出した。

細胞傷害活性 (MTT 法) により、化合物 4 (Fig. 4) に神経芽腫細胞への傷害活性を示した。また、正常細胞 (HUVEC、NHDF) と比較して、腫瘍細胞に選択的な活性を示した (データ未掲載)。神経芽腫への作用機序を検討するため、アポトーシスに関する評価を行ったところ、Hoechst 33342 染色法によりアポトーシスに特徴的な核の凝集が観察された (データ未掲載)。また、Annexin-V/PI 二重染色法

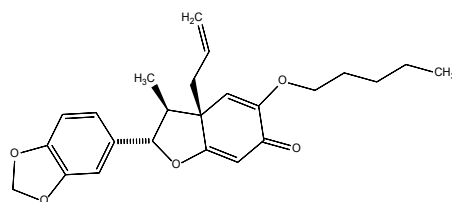


Fig. 4 Burchellin derivative (compound 4)

により濃度依存的な初期アポトーシス細胞群の増加が認められたことから、アポトーシスを誘導することが示唆された。そこでアポトーシスの作用機序に代表される caspase の関与を caspase inhibitor (z-VAD-fmk) によって評価した。その結果、z-VAD-fmk 処理により細胞傷害活性が回復したことから、化合物 4 による細胞死は caspase が関与することが推測された (Fig. 5)。そこで、Western blot 法によるアポトーシス関連タンパク質の発現変動の評価を行った。Caspase-3、-7、-9 の経時的な発現変動を示し、ミトコンドリア経路に関わる Bax の増加と Bcl-2 の減少 (Fig. 6A)、また、抗アポトーシス因子である survivin、XIAP の減少を確認した (Fig. 6B)。さらに、PARP の切断が確認された (Fig. 6B)。これによりミトコンドリアを介したアポトーシス細胞死であることが示唆された。また、増殖や分化に関わる因子 (ERK、Akt、STAT-3) についてタンパク質の発現変動を評価したところ、リン酸化を抑制することを確認した (データ未掲載)。これらの増殖因子は Bcl-2 ファミリーへのシグナル伝達が報告されており、化合物 4 はミトコンドリアを介したアポトーシスに関与することが考えられた。

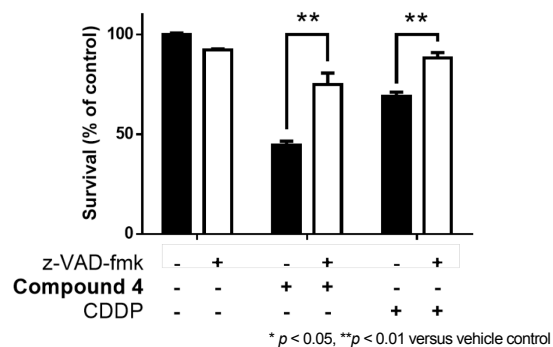


Fig. 5 Caspase inhibitor assay (z-VAD-fmk)

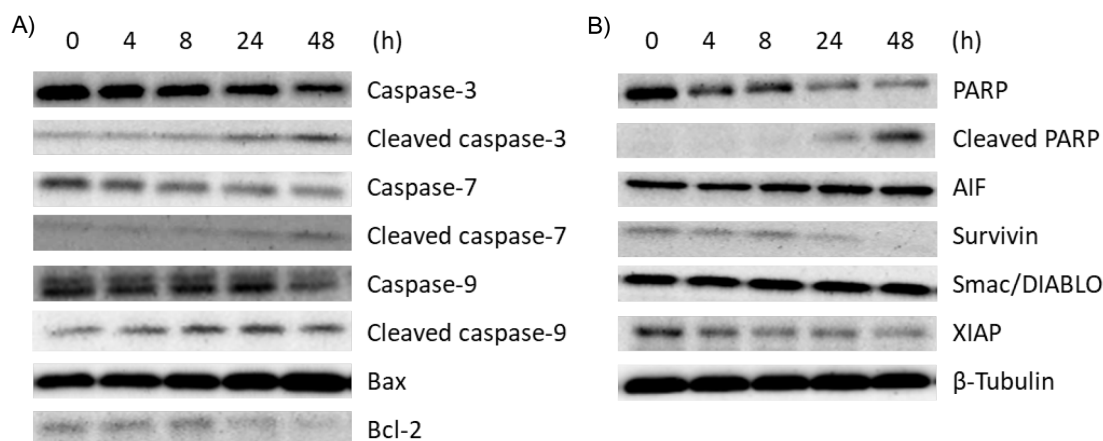


Fig. 6 Western blot analysis for apoptosis-related protein (Burchellin)

5. Chalcone 配糖体の細胞周期停止効果の検討

飛騨紅蕪 (*Brassica rapa* L.) はアブラナ科に属する植物であり、その含有成分には、flavonoid や phenylpropanoid、chalcone 類が知られている。この chalcone 類化合物には、抗腫瘍や抗炎症などの活性報告がされている。そこで飛騨紅蕪に由来する chalcone 配糖体を基本骨格に有する化合物について、神経芽腫に対する細胞傷害活性の検索を行い、細胞周期停止を誘導する化合物を見い出した。

細胞傷害活性 (CCK-8 法) により、計 8 種の chalcone 配糖体のうち化合物 6 (Fig. 7) に、神経芽腫細胞への傷害活性を示した。また、正常細胞 (HUVEC、NHDF) と比較しても、腫瘍細胞に選択的な活性を示した (データ未掲載)。この化合物 6 は、PI 染色による細胞周期解析により、濃度依存的かつ経時的に S 期の減少、G₀/G₁ 期での細胞群の増加を示した (Fig. 8)。ことから、神経芽腫に対し、G₀/G₁ 期での細胞周期停止作用を有することが明らかとなった。そこで、G₀/G₁ 期から S 期に関わる cyclin や CDK、E2F の活性に関して、Western blot 法によるタンパク質変動の評価を行った。その結果、作用後 8 時間において cyclin D の減少、Rb リン酸化抑制による転写因子 (E2F) の遊離を阻害することによって、S 期移行を阻害し、G₀/G₁ 期での停止作用を示すことが示唆された (Fig. 9A)。

また、Hoechst 33342 染色による核の形態変化により、核の凝集化が観察された (データ未掲載)。そこで、Annexin-V/PI 染色によるアポトーシスの解析を行った。

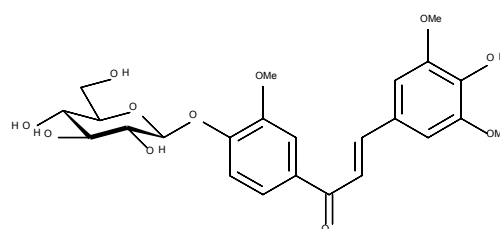


Fig. 7 Chalcone glycosidase (compound 6)

化合物 6 の作用により初期アポトーシス群の増加が認められたことから、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。また、タンパク質変動の評価により、作用後 48 時間以降にて、エフェクターである caspase-3、-7 の活性および PARP の切断により、アポトーシスを誘導することが示唆された (Fig. 9B)。

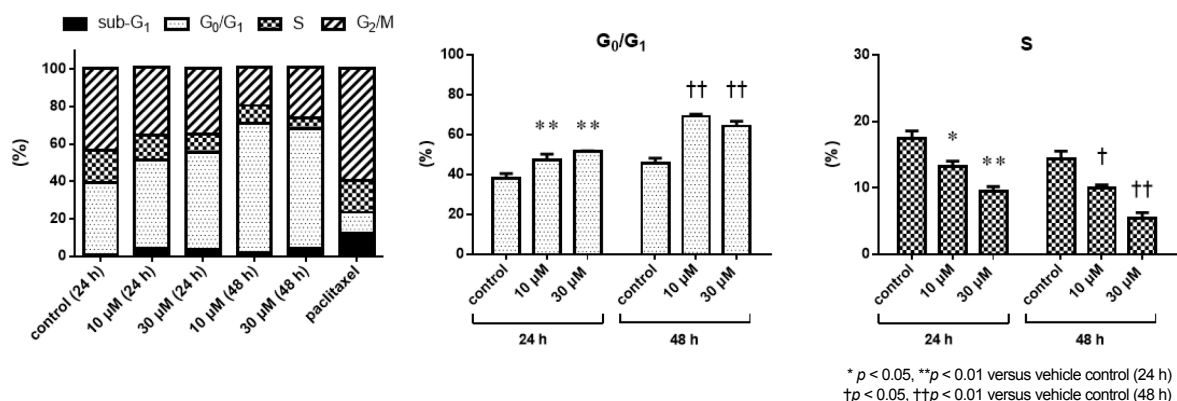


Fig. 8 Cell cycle analysis

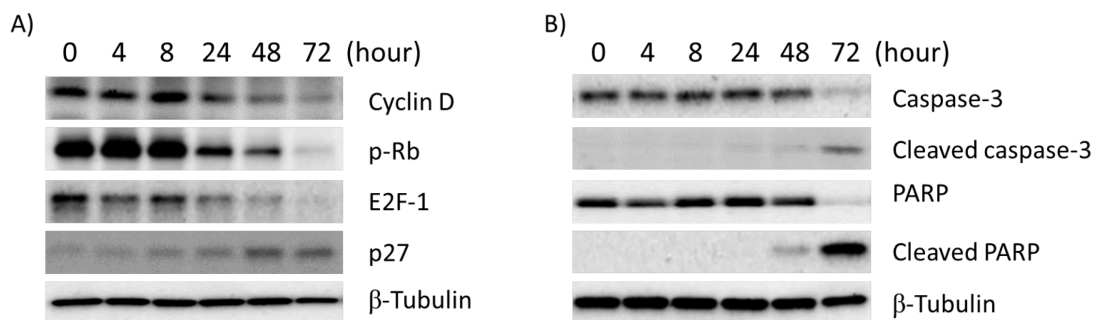


Fig. 9 Western blot analysis for cell cycle and apoptosis related protein

6. 総括および考案

本研究により、神経芽腫に対して 3 種類の抗腫瘍効果を有する化合物を見い出した。

- (1) Indirubin 3'-epoxide は、神経芽腫細胞に対し優れた抗腫瘍活性を示し、アポトーシス細胞死を誘導した。Caspase 活性や caspase-3、-7 のタンパク質量の発現に変化が認められなかったことから、caspase 非依存的なアポトーシスを誘導することが明らかとなった。そのメカニズムとして、AIF の核内での増加および PARP の断片化による細胞死であることがわかった。
- (2) Burchellin 誘導体 (化合物 4) は選択的な腫瘍細胞傷害活性を示し、アポトーシス細胞死を誘導した。Caspase inhibitor による生存率の回復、活性型である cleaved caspase-3、-7、-9 のタンパク質の発現から、ミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導することが明らかとなった。さらに、増殖などに関わる因子 (ERK、Akt、STAT-3) のリン酸化抑制が認められ、細胞死に関与することが示唆された。
- (3) Chalcone 配糖体 (化合物 6) は選択的な腫瘍細胞傷害活性を示し、G₀/G₁ 期での細胞周期停止を誘導した。化合物 6 の作用により cyclin D の発現を抑制、Rb-E2F 複合体からの E2F の遊離を阻害することにより、G₁ 期から S 期への進行阻害を起こすことが明らかとなった。さらに、caspase-3、-7 の活性および PARP の切断により、caspase 経路によるアポトーシスを誘導することがわかった。

以上のことから、本研究より見い出した上記 3 種の化合物は、神経芽腫に対する新たな治療薬としてのリード化合物となるものと期待される。