

学 位 論 文

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

日本大学大学院薬学研究科

臨床医学研究室

栗田 雅弘

本文中の略語を以下に示す。

Akt	AKT8 virus oncogene cellular homolog
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AIF	Apoptosis-inducing factor
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-Cell lymphoma 2 Protein
BSA	Bovine serum albumin
CCK-8	Cell counting kit-8
CDDP	<i>cis</i> -Diammine-dichloroplatinum
CDK	Cyclin-dependent kinase
c-IAP1	Cellular inhibitor of apoptosis protein 1
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FBS	Fetal bovine serum
FCM	Flow cytometry
HEPES	4-(2 -Hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NHDF	Normal human dermal fibroblast
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffer saline
PI	Propidium iodide
PTX	Paclitaxel
PVDF	Polyvinylidene difluoride
Rb	Retinoblastoma protein
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
TBP	TATA binding protein
TBS	Tris-buffer saline
TOM 20	Translocase of outer membrane 20
TTBS	Tris-buffer saline with Tween 20
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

目 次

1. 序論	1
2. 実験材料及び方法	
2.1. 実験試料	4
2.2. 培養細胞株	5
2.3. 実験方法	6
3. 実験結果と考案	
3.1. Indirubin 3'-epoxide の抗腫瘍効果検討	
3.1.1. 結果	
1) Indirubin の細胞傷害活性	13
2) Indirubin 3'-epoxide の細胞周期への影響	14
3) Indirubin 3'-epoxide のアポトーシス誘導効果	15
4) Colorimetric assay による caspase 活性	17
5) アポトーシス関連タンパク質の発現変動	18
3.1.2. 小括	22
3.1.3. 考案	22
3.2. Burchellin 誘導体のアポトーシス誘導効果の検討	
3.2.1. 結果	
1) Burchellin 誘導体の細胞傷害活性	24
2) Burchellin のアポトーシス誘導効果	25
3) Caspase inhibitor (z-VAD-fmk) による細胞死への影響	27
4) アポトーシス関連タンパク質の発現変動	28
3.2.2. 小括	33
3.2.3. 考案	33
3.3. Chalcone 配糖体の細胞周期停止効果の検討	
3.3.1. 結果	
1) Chalcone 配糖体の細胞傷害活性	35
2) Chalcone 配糖体による細胞周期への影響	36
3) 細胞周期関連タンパク質の発現変動	38
4) Chalcone 配糖体のアポトーシス誘導効果	40

5) アポトーシス関連タンパク質の発現変動の評価	42
3.3.2. 小括	45
3.3.3. 考案	45
4. 総括	47
5. 謝辞	48
6. 参考文献	49

1. 序 論

神経芽腫 (neuroblastoma) は0歳から5歳前後に発症する胎児性腫瘍であり、小児での発症頻度は高く、白血病、脳腫瘍に次いで患者数が多い腫瘍である。小児悪性腫瘍の死亡率の約10%を神経芽腫が占めている¹⁾。胚発生初期に生じる神経堤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²⁾。その内、約65%が腹部に発生し、そのほかに、頸部、胸部、骨盤などから発生する²⁾。病期分類には、国際標準として定められている International Neuroblastoma Staging System (INSS) が広く用いられている (Table 1)³⁾。病期は原発腫瘍の広がりや、骨、骨髄、肝臓、皮膚などの転移の有無によって決定される。この病期分類に加えて、診断時の年齢や生物学的因子 (染色体数、1p の欠失、MYCN 増幅、Trk A 発現、H-ras 発現など) を組み合わせることにより、低リスク、中間リスク、高リスク群と層別化が行われている^{4,5)}。神経芽腫には多数の生物学的特徴が知られているが、MYCN 遺伝子の増幅は強力な予後不良因子である^{6,7)}。MYCN の増幅は神経芽腫患者の約20%に認められ、その多くが進行期 (stage 3、4) である⁴⁾。その他にも、Trk A 発現^{8,9)} やテロメラーゼ活性¹⁰⁻¹²⁾ などが予後因子として挙げられる。

Table 1 International Neuroblastoma Staging System (INSS).³⁾

病期	定義
1	限局性腫瘍で、肉眼的に完全切除。組織学的な腫瘍残存は不問。同側のリンパ節に組織学的な転移を認めない (原発腫瘍に接し、一緒に切除されたリンパ節転移はあってもよい)。
2A	限局性腫瘍で、肉眼的に不完全切除。原発腫瘍に接しない同側リンパ節に組織学的に転移を認めない。
2B	限局性腫瘍で、肉眼的に完全または不完全切除。原発腫瘍に接しない同側リンパ節に組織学的に転移を認める。対側のリンパ節に転移を認めない。
3	切除不能の片側性腫瘍で、正中線 (対側錐体縁) を超えて浸潤。同側の局所リンパ節の転移は不問。または、片側発生の限局性腫瘍で対側リンパ節転移を認める。または、正中発生の腫瘍で錐体縁を超えた両側浸潤 (切除不能) か、両側リンパ節転移を認める。
4	いかなる原発腫瘍であるかにかかわらず、遠隔リンパ節、骨、骨髄、肝、皮膚、および/または他の臓器に播種している (4S は除く)。
4S	限局性腫瘍 (病期 1、2A、2B) で、播種は皮膚、肝、および/または骨髄に限られる (1歳未満の患者のみ)。骨髄中の腫瘍細胞は有核細胞の10%未満で、それ以上は病期4である。MIBG シンチグラフィーが行われるならば骨髄への集積は陰性。

治療として、進行症例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る。化学療法では、ホスファミド (IFM) やシスプラチン (CDDP)、ビンクリスチン (VCR) などによる多剤併用療法が行われる¹³⁻¹⁵⁾。しかし、進行症例 (stage 4 で発症18ヶ月以上) における5年間の event-free survival (EFS) や overall survival (OS) は、35%を下回るのが現状であり (Fig. 1 赤線)、発症年齢が高いほど、予後が不良となる¹⁶⁾。また、化学

療法に抵抗し、CDDP やシクロフォスファミド (CPA) などの高用量による強力な治療により、腎障害、骨髄抑制などの重篤な有害事象や晩期障害が問題とされている¹⁷⁾。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^{18,19)}。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^{20,21)}、進行神経芽腫に対してこれらを導く化合物は治療薬としての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 の各誘導体から見出し、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。

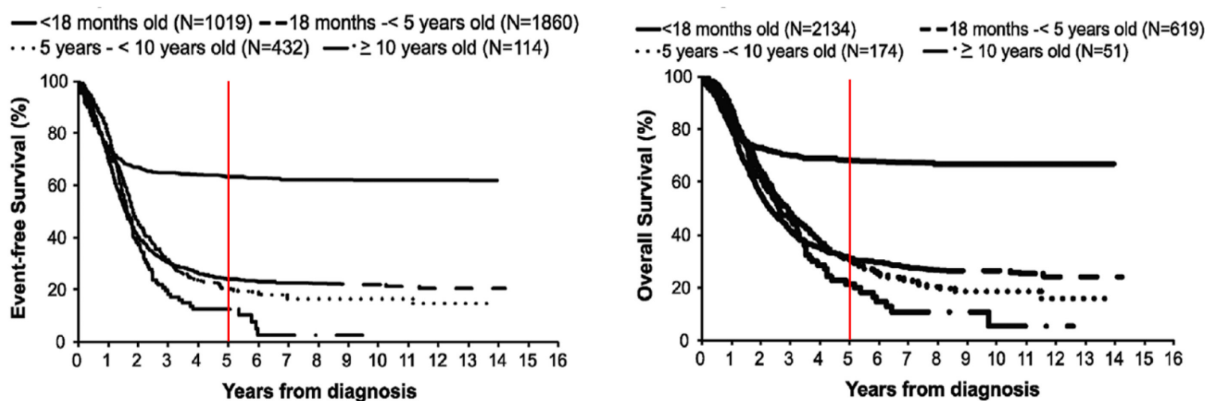


Fig. 1 EFS and OS of stage 4 patient by diagnostic age cohort.¹⁶⁾

* EFS; Event-free survival, OS; Overall survival

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 は中医薬処方 (indigo naturalist) において慢性骨髄性白血病の治療に用いられ²²⁾、また、先行研究にて indirubin 3'-oxime の誘導体に、さまざまな腫瘍に対してアポトーシス誘導や細胞周期停止などの活性が報告されている²³⁻²⁷⁾。この indirubin 誘導体の作用機序には、サイクリン依存性キナーゼ (CDK)²²⁾ やグリコーゲン合成酵素 (GSK-3)^{28,29)} 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。更に、indirubin 3'-oxime が神経芽腫細胞に対して CDK 抑制による G₀/G₁ 期での細胞周期停止効果が報告されている³⁰⁾。本研究室においても、indirubin や indirubin 3'-oxime などのさまざまな誘導体について抗腫瘍効果の検討を行っており³¹⁾、本論文では優れた腫瘍細胞傷害活性を示した indirubin 3'-epoxide (Fig. 2) のアポトーシス誘導効果について報告する。

Burchellin は *Aniba burchellii* (クスノキ科) 等に含まれる neolignane 化合物である^{32,33)}。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^{34,35)}。当研究室でも神経芽腫に対してさまざまな neolignane 誘導体について検

索を行い、抗腫瘍効果を有する化合物を見い出した³⁶⁾。そこで本論文では burchellin を基本骨格に有する合成ネオリグナン誘導体 (**Fig. 3**) について、神経芽腫に対する細胞傷害活性の検索を行い、抗腫瘍効果を見い出したので報告する。

Chalcone は飛騨紅蕪 (*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、NO 産生抑制 (抗炎症作用)^{37,38)} や好塩基球の脱顆粒抑制 (抗アレルギー作用)³⁹⁾などの活性報告がされている。また、本化合物の糖を除いた chalcone 部 (アグリコン) の誘導体にも活性の報告がされており、compound 5 のアグリコン部類似体が肺がん細胞などの腫瘍に対する抗腫瘍効果の報告がされ、優れた活性を示している^{40,41)}。そこで本論文では、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 (**Fig. 4**) について、神経芽腫に対する細胞傷害活性の検索を行い、compound 6 の抗腫瘍効果を見い出したので報告する。

2. 実験材料及び方法

2.1. 実験に用いた試料

本研究に用いた indirubin 誘導体 (日本大学薬学部宮入伸一教授より供与) を **Fig. 2** に示す。それぞれを DMSO で溶解し、20 mM を原液として調製し、原液から段階希釈したものを実験で用いた。

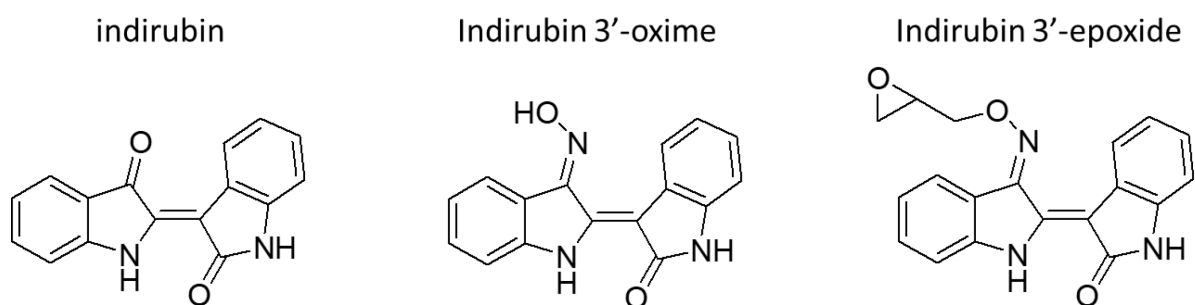


Fig. 2 Chemical structure of indirubin derivatives.

本研究で用いた burchellin 誘導体 (日本大学薬学部内山武人教授より供与) を **Fig. 3** に示す。それぞれを DMSO で溶解し、50 mM を原液として調製し、原液から段階希釈したものを実験で用いた。

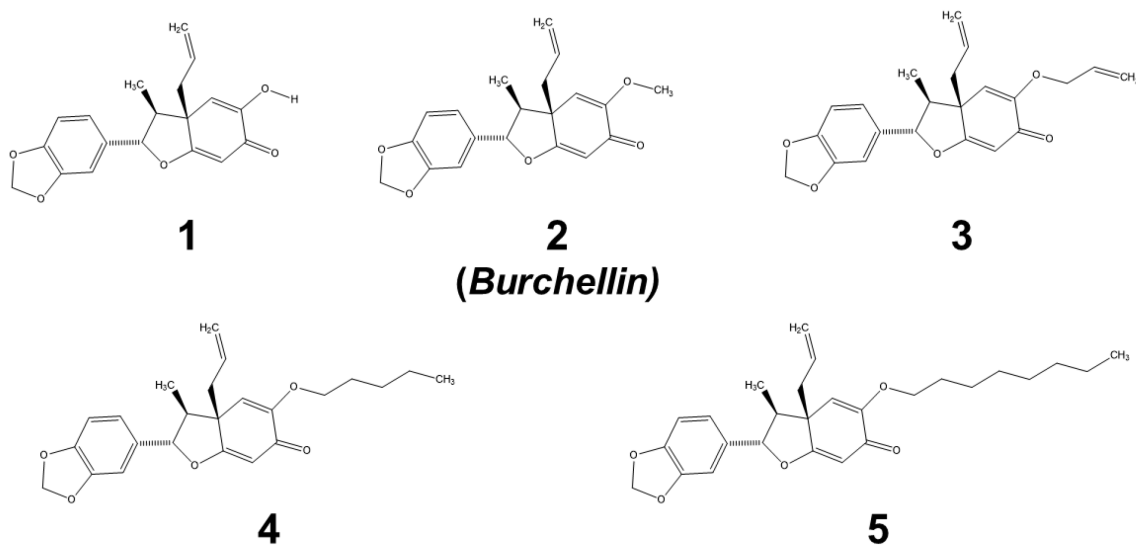


Fig. 3 Chemical structure of burchellin derivatives.

本研究で用いた chalcone 配糖体 (日本大学理工部仁科淳良教授より供与) を Fig. 4 に示す。それぞれを DMSO で溶解し、50 mM を原液として調製し、原液から段階希釈したものを実験で用いた。

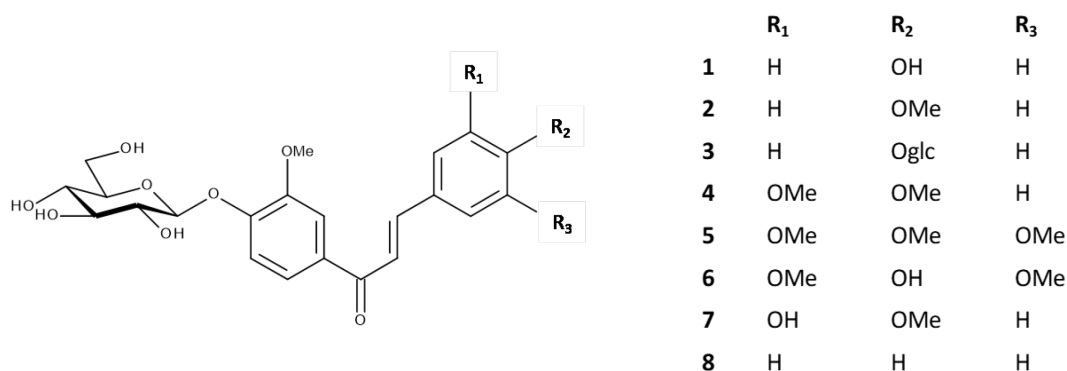


Fig. 4 Chemical structure of chalcone glycosidase derived from *Brassica rapa* L.

2.2. 実験に用いた培養細胞株

本研究に用いた細胞及び培養条件を以下に示す。

1) 神経芽腫細胞株

IMR-32 [Riken BRC より購入]

LA-N-1 [Riken BRC より購入]

NB-39 [福島県立医科大学 鈴木利光教授より供与]

SK-N-SH [Riken BRC より購入]

2) 正常細胞

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) [Lonza より購入]

正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) [Lonza より購入]

神経芽腫細胞は、RPMI 1640 培地に 10% FBS を加えた溶液で培養した。FBS は補体を失活させるため、56 °C、30 min 加熱処理を行い、非動化したものを使用した。細胞の培養は、CO₂ インキュベーターにて 37°C、5% CO₂ 飽湿条件下にて培養した。正常細胞も同様に、それぞれの培地 (HUVEC: EGM-2 medium, NHDF: FGM-2 medium) で 37°C、5% CO₂ 飽湿条件下にて培養した。

2.3. 実験方法

実験に用いた試薬・装置

培地・試薬・装置は、以下のものを用いた。

培地	EGM-2 Bullet Kit	[Lonza]
	FBS (Lot No.1375701)	[CORNING]
	FBS (Lot No. AYD62674)	[Hyclone]
	FGM-2 Bullet Kit	[Lonza]
	RPMI 1640	[Life Technologies]
	RPMI 1640 (phenol red free)	[Life Technologies]
試薬	0.25% Trypsin/ EDTA	[Lonza]
	0.5% Trypsin/ EDTA	[Life Technologies]
	2-Mercaptoethanol	[Wako]
	Alexa Fluor [®] 488 Annexin V/ Dead Cell Apoptosis kit	[life technologies]
	Bisbenzimidazole H33342 trihydrochloride (Hoechst 33342)	[SIGMA]
	Bromophenol Blue	[Wako]
	BSA	[Wako]
	Caspase-3 Colorimetric Assay Kit	[Bio Vision]
	Caspase-8 Colorimetric Assay Kit	[Bio Vision]
	Caspase-9 Colorimetric Assay Kit	[Bio Vision]
	CCK-8	[Dojindo]
	CDDP	[Wako]
	(±) Dithiothreitol	[Wako]
	DMSO	[SIGMA]
	Dulbecco's PBS (-)	[Nissui]
	Dyna marker protein multi color III	[Bio Dynamics Laboratory]
	ECL Western blotting detection reagents	[GE Healthcare]
	Ethanol	[Wako]
	Glycerol	[Wako]
	Glycine	[Wako]
	HEPES buffered saline solution (HBSS)	[Lonza]
	Hydrochloric acid (HCl)	[Wako]
	Isopropanol	[Wako]

試薬	Methanol	[Wako]	
	MTT	[SIGMA]	
	NE-PER [®] Nuclear and Cytoplasm Extraction Reagents	[Thermo Fisher Scientific]	
	N, N'-Methylene-bis-(acrylamide)	[Wako]	
	N, N, N', N'-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)	[Wako]	
	Nonident P-40	[Nacalai tesque]	
	Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	[SIGMA]	
	Phosphatase inhibitor cocktail 2	[SIGMA]	
	PI	[Merck Millipore]	
	Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20)	[Wako]	
	Protease inhibitor cocktail 1	[SIGMA]	
	Protein Assay Rapid Kit <i>Wako</i> II	[Wako]	
	PTX	[Wako]	
	PVDF transfer membrane	[GE Healthcare]	
	Immobilon [®] -P transfer membranes	[Merck Millipore]	
	Ribonuclease A (RNase)	[SIGMA]	
	Skim milk powder	[Wako]	
	Sodium azide (NaN ₃)	[Wako]	
	Sodium chloride (NaCl)	[Wako]	
	Sodium dodecyl Sulfate (SDS)	[Wako]	
	Sodium hydrogen carbonate (NaHCO ₃)	[Wako]	
	Sodium hydroxide (NaOH)	[Wako]	
	Trizma base	[SIGMA]	
	Trypsin neutralizing solution (TNS)	[Lonza]	
	z-VAD-fmk (pan-caspase inhibitor)	[MBL]	
	抗体	anti-AIF antibody (#4642)	[Cell Signaling]
		anti-Akt antibody (#4691)	[Cell Signaling]
anti-Bax antibody (#2772)		[Cell Signaling]	
anti-Bcl-2 antibody (#2876)		[Cell Signaling]	
anti-β-tubulin antibody (T4026)		[SIGMA]	
anti-Caspase-3 antibody (#9665)		[Cell Signaling]	
anti-cleaved caspase-3 antibody (#9661)		[Cell Signaling]	
anti-Caspase-7 antibody (#9494)		[Cell Signaling]	
anti-Caspase-9 antibody (#9502)		[Cell Signaling]	

抗体	anti-Cdk 2 antibody (sc-748)	[SANTA CRUZ]
	anti-Cdk 4 antibody (559677)	[BD Biosciences]
	anti-Cdk 6 antibody (sc-177)	[SANTA CRUZ]
	anti-c-IAP-1 antibody (#4952)	[Cell Signaling]
	anti-Cyclin D ₁ antibody (MS-210-P0)	[Thermo Fisher Scientific]
	anti-Cyclin E antibody (551159)	[BD Biosciences]
	anti-E2F-1 antibody (sc-48334)	[SANTA CRUZ]
	anti-p27 antibody (sc-528)	[SANTA CRUZ]
	anti- p44/42 MAPR (ERK1/2) antibody (#9102)	[Cell Signaling]
	anti-PARP antibody (611038)	[BD Biosciences]
	anti-phospho-p44/42 MAPR (ERK1/2) antibody (#9101)	[Cell Signaling]
	anti-phospho-Akt antibody (#5106)	[Cell Signaling]
	anti- phospho -RB antibody (#9307)	[Cell Signaling]
	anti-phospho-Stat3 antibody (#9145)	[Cell Signaling]
	anti-RB antibody (#9313)	[Cell Signaling]
	anti-Smac/DIABLO antibody (612246)	[BD Biosciences]
	anti-Stat3 antibody (#9139)	[Cell Signaling]
	anti-Survivin antibody (#2808)	[Cell Signaling]
	anti-TOM20 antibody (612278)	[BD Biosciences]
	anti-TPB antibody (#8515)	[Cell Signaling]
anti-XIAP antibody (#2042)	[Cell Signaling]	
Anti-Rabbit IgG peroxidase conjugated (A9169)	[SIGMA]	
Anti-MOUSE IgG peroxidase conjugated (A9044)	[SIGMA]	
装置	AE-6500 Dual Mini Slab electrophoresis system	[ATTO]
	Cytomics FC 500	[BECKMAN COULTER]
	Luminescent Image Analyzer LAS-1000	[FUJIFILM]
	Model 3550 MICROPLATE REASER	[BIO-RAD]
	Power Pac™ HC High-Current Power Supply	[BIO-RAD]
	Research inverted system microscope IX71	[OLYMPUS]
	Ultrospec Visible Plate Reader II 96	[GE Healthcare]
	Wet/Tank Blotting Systems Mini Trans-Blot® Cell	[BIO-RAD]

2.3.1. 細胞傷害活性の評価

1) MTT 法

神経芽腫細胞を 96 well plate に RPMI 1640 (phenol red free) 培地にて 1×10^4 cells/well で播種し、 37°C 、5% CO_2 飽湿条件下にて 24 h 培養した。正常細胞はそれぞれの培地 (HUVEC: EGM-2 medium, NHDF: FGM-2 medium) にて培養した。細胞を 96 well plate に培地にて 2×10^4 cells/well で播種し、 37°C 、5% CO_2 飽湿条件下にて 24 h 培養した。培養後、DMSO によって調製した試験化合物を、培養液の 0.2% となるよう添加し、各濃度 (終濃度: 1~100 μM) を細胞に 48 h 作用させた (37°C 、5% CO_2 飽湿条件下)。

試験化合物作用後、培養液中に 0.5% MTT 溶液を 10 μL 添加し、3 h インキュベートした (37°C 、5% CO_2 飽湿条件下)。インキュベート後、反応停止液 (0.04N HCl/isopropanol) を 100 μL 添加し、生成したホルマザンが完全に溶解するまでピペティングした。マイクロプレートリーダーにて波長 570 nm (test)、655 nm (reference) で吸光度を測定し、吸光度から各 plate の blank control の平均値を引いた値を全体の vehicle control の平均値で除し、百分率 (%) とし、これを生存率とした。

2) CCK-8 法

神経芽腫細胞、正常細胞ともに、細胞の播種、化合物の添加は MTT 法と同様に操作を行い、試験化合物を 48 h 作用させた。試験化合物作用後、培養液中に CCK-8 試液を 10 μL 添加し、3 h インキュベートした (37°C 、5% CO_2 飽湿条件下)。インキュベート後、マイクロプレートリーダーにて波長 450 nm で吸光度を測定し、測定した吸光度から生存率を計算した。

2.3.2. Hoechst33342 染色による細胞及び核の形態変化の観察

神経芽腫細胞を 6 well plate に RPMI 1640 培地にて 1×10^5 cells/well で播種し、 37°C 、5% CO_2 飽湿条件下にて 24 h 培養した。培養後、試験化合物を培養液の 0.2% となるよう添加し、各濃度 (終濃度: 1~100 μM) を細胞に 24 or 48 h 作用させた (37°C 、5% CO_2 飽湿条件下)。また、ポジティブコントロールとして、CDDP (終濃度: 30 μM or 100 μM) を同条件で用いた。試験化合物作用後、0.02% Hoechst 33342 試薬を 100 μL 添加し、15 min 反応させた (37°C 、5% CO_2 飽湿条件下)。反応後、倒立型蛍光顕微鏡 (IX-71) にて位相差像及び蛍光像を撮影した。また、マイクロルーラーの目盛り 50 μm を撮影し、細胞径の指標とした。

2.3.3. Flow cytometry (FCM)

1) アポトーシス誘導の解析 (Annexin-V/PI stainig)

アポトーシスによる細胞膜での膜リン脂質 (ホスファチジルセリン: PS) の露出を FCM により検出するために、Alexa Fluor® 488 Annexin V/ Dead Cell Apoptosis kit を用いた。神経芽腫細胞を 6 well plate に RPMI 1640 培地にて 1×10^6 cells/well で播種し、 37°C 、5% CO_2 飽湿条件下にて 24 h 培養した。培養後、試験化合物を培養液の 0.2% となるよう添加し、各濃度 (終濃度: 1~100 μM) を細胞に 24 or 48 h 作用させた (37°C 、5% CO_2 飽湿条件下)。

試験化合物作用後、氷冷下にて細胞を回収し、遠心分離 (1500 rpm、5 min、 4°C) を行い、PBS で洗浄した。再度、遠心分離を行い、上清を除去し、annexin-binding buffer (500 μL) を加えて懸濁して、これを 100 μL 分取したものを試験細胞液とした。この試験細胞液に、Annexin-V (5 μL) 及び PI (1 μL) を加え、暗所、室温にて 15 min 反応させた。反応後、annexin-binding buffer (400 μL) を加え希釈し、40 μm ナイロンメッシュに通して FCM (FC500) により測定した。

2) 細胞周期解析

細胞周期の検出は、蛍光色素 (PI) で DNA を染色し、核 DNA 量の変化を FCM により測定することで評価した。神経芽腫細胞を 6 well plate に RPMI 1640 培地 (FBS (-)) にて 1×10^6 cells/well で播種し、 37°C 、5% CO_2 飽湿条件下にて 24 h 培養した。培養後、FBS を添加後、試験化合物を培養液の 0.2% となるよう添加し、各濃度 (終濃度: 1~100 μM) を細胞に 24 or 48 h 作用させた (37°C 、5% CO_2 飽湿条件下)。

試験化合物作用後、氷冷下にて細胞を回収し、遠心分離 (1500 rpm、5 min、 4°C) を行い、PBS で 2 回洗浄した。遠心分離を行い、上清を除去し、70% EtOH (10 mL) を加え、氷冷下にて 2 h 放置し細胞の固定化を行った。固定化後、遠心分離を行い PBS で 2 回洗浄した後、RNase (0.25 mg/mL) を 37°C の恒温槽にて 30 min 反応させ、RNA を分解した。終濃度が 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう PI を添加し、30 min 暗所で作用させた。試験細胞液を 40 μm ナイロンメッシュに通して FCM (FC500) により測定した。

2.3.4. Caspase assay

1) Colorimetric Assay

カスパーゼ活性による細胞死の評価を行うため、カスパーゼプロテアーゼにより切断される蛍光基質の測定を原理とした colorimetric assay kit を用いた。

神経芽腫細胞を 6 well plate に RPMI 1640 培地にて 1×10^6 cells/well で播種し、 37°C 、5% CO_2 飽湿条件下にて 24 h 培養した。培養後、試験化合物を培養液の 0.2% となるよう添加し、各濃度 (終濃度: 10 μM) を細胞に 48 h 作用させた (37°C 、5% CO_2 飽湿条件下)。また、ポジティブコントロールとして、CDDP (終濃度: 100 μM) を同条件で用いた。

試験化合物を作用させた細胞を回収し、氷冷下で操作を行った。回収した細胞は遠心分離し (1500 rpm、5 min、4°C)、lysis buffer で懸濁した後、エッペンチューブに回収した。回収した細胞懸濁液は、lysis buffer に 10 min 氷冷で作用させ、遠心分離 (11300 rpm、5 min、4°C) によって不純物を沈殿させた。上清のタンパク質抽出液をサンプル原液とし、含量タンパク質濃度を Protein Assay Rapid Kit *Wako* II によって測定した。タンパク質量を 150 µg/75 µL となるよう lysis buffer で希釈し、基質、reaction buffer を添加後、1 h インキュベートした (37°C、5% CO₂ 飽湿条件下)。インキュベート後、マイクロプレートリーダーにて波長 405 nm で吸光度を測定した。

2) Caspase inhibitor (z-VAD-fmk) による細胞死への影響

神経芽腫細胞を 96 well plate に RPMI 1640 培地にて 1×10^4 cells/well で播種し、37°C、5% CO₂ 飽湿条件下にて 24 h 培養した。培養後、試験化合物添加の 1 h 前に z-VAD-fmk を終濃度 40 µM で添加し、caspase inhibitor 処理群と非処理群を調製した。その後、試験化合物を培養液の 0.2% となるよう添加し、各濃度 (終濃度: 100 µM) を細胞に 48 h 作用させた (37°C、5% CO₂ 飽湿条件下)。また、ポジティブコントロールとして、CDDP (終濃度: 30 µM) を同条件で用いた。

試験化合物作用後の細胞傷害活性での吸光度測定までの操作は、CCK-8 法 (実験の部 1.2) と同様に行い、生存率を計算した。

2.3.5. 関連タンパク質の経時的変化の評価

1) タンパク抽出及び定量

神経芽腫細胞を 60 mm cell culture dish に RPMI 1640 培地にて 2×10^6 cells/well で播種し、37°C、5% CO₂ 飽湿条件下にて 24 h 培養した。培養後、DMSO によって調製した試験化合物を、培養液の 0.2% となるよう添加し、細胞に 0~72 h の間で作用させた (37°C、5% CO₂ 飽湿条件下)。各時間作用させた細胞を回収し、氷冷下で操作を行った。

回収した細胞は遠心分離し (2000 rpm、5 min、4°C)、TBS [20 mM Tris-HCl (pH 7.6)、137 mM NaCl] で懸濁した後、エッペンチューブに回収した。回収した細胞懸濁液は、再び遠心分離し (5000 rpm、5 min、4°C)、上清除去後、lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、137 mM NaCl、1% Nonidet P-40、10% glycerol、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, protease inhibitor cocktail I (1:200)、phosphatase inhibitor cocktail II (1:100)、1 mM dithiothreitol] で溶解した。Lysis buffer で処理した細胞懸濁液を超音波処理 (30 sec × 2 回) にて細胞粉碎した後、遠心分離 (15000 rpm、10 min、0°C) によって不純物を沈殿させ、上清のタンパク質抽出液をサンプル原液とした。

サンプル原液の含量タンパク質濃度は、Protein Assay Rapid Kit *Wako* II によって測定した。BSA 標準液での検量線より、各サンプル原液のタンパク質量を算出し、タンパク質量を 10 µg/7.5 µL となるよう lysis buffer 及び sample buffer [0.24 M Tris-HCl (pH 6.8)、312 mM

SDS、30% glycerol、15% 2-mercaptoethanol、1% bromophenol blue] で希釈し、泳動用の調整サンプル液とした。

2) SDS-PAGE 及びメンブレンへの転写

SDS-PAGE によりタンパク質の分離を行った。電気泳動用のゲルはタンパク質の分子量により、10%、12.5%、15% を作製した。調整サンプル液は 100°C、3 min の熱処理を行い SDS 化した後、遠心分離し (15000 rpm、1 min、0°C)、その上清をゲルの各レーンに 7.5 μ L、タンパク質分子量ラダーマーカーを 5 μ L のせ、running buffer [24 mM Tris、190 mM glycine、3.47 mM SDS] 浸水下にて約 2 h 電気泳動を行った (100 V、室温)。

その後、transfer buffer [24.1 mM Tris、191.8 mM glycine、20% MeOH] で満たした転写装置にて 3 h 転写し、PVDF メンブレン上にタンパク質を固定した (100 V、氷冷)。

3) Western blotting 及び 化学発光撮影

転写終了後、メンブレンを TBS で洗浄し、blocking solution [0.5% skim milk in TTBS or 0.5% BSA in TTBS] を用いて室温、1 h ブロッキングを行った。ブロッキング後、メンブレンを TTBS で 3 回洗浄し、1 次抗体を加えて振盪反応させた (4°C、overnight)。

1 次抗体反応後、TTBS による洗浄を 4 回行い、2 次抗体 [0.5% skim milk in TTBS or 0.5% BSA in TTBS (1/10000)] を室温下で 1 h 振盪反応させた。その後、TTBS 4 回、TBS 3 回洗浄し、暗所にて ECL 液を 1 min 反応させ、Luminescent Image Analyzer (LAS-1000) によりバンドを撮影した。バンドの解析は、NIH Image-J で行った。

2.3.6. 統計学的解析

MTT assay、CCK-8 assay による細胞傷害活性は、3 回試験により得られた実験データから、Graph Pad Prism を用いて非線形回帰分析を行い IC₅₀ 値を算出した。

各試験の統計学的有意差判定は、3 回試験により得られた実験データにより Graph Pad Prism を用いて行った。one-way ANOVA もしくは two-way ANOVA により分散分析を行った後、Bonferroni 法により有意差検定を行い、*p* 値が 0.05 以下を有意差ありと判定した。

3. 実験結果と考案

3.1. Indirubin 3'-epoxide の抗腫瘍効果の検討

3.1.1. 結果

1) Indirubin の細胞傷害活性

ヒト神経芽腫細胞 (IMR-32、NB-39、SK-N-SH) 及びヒト正常細胞 (HUVEC、NHDF) に対して indirubin の細胞傷害活性を MTT 法によって評価した (Fig. 5)。その結果、indirubin 3'-oxime は神経芽腫細胞に対し、 IC_{50} 値が $15 \mu\text{M}$ 以下と優れた活性を示した (Table 2)。また、indirubin 3'-epoxide は、 $0.4 \mu\text{M}$ にて正常細胞と比較し選択的な傷害活性が認められた (Fig. 5)。Indirubin はさまざまな腫瘍細胞に対する活性報告がされており、神経芽腫細胞についても、indirubin 3'-oxime に優れた細胞傷害が報告されている³⁰⁾。他の細胞株であるが IC_{50} 値が $10 \mu\text{M}$ 前後と本研究と同程度の活性が得られている (Fig. 5、Table 2)。本論文では、oxime より強い活性を示した indirubin 3'-epoxide を見出し、詳しい細胞死のメカニズム解析を行った。

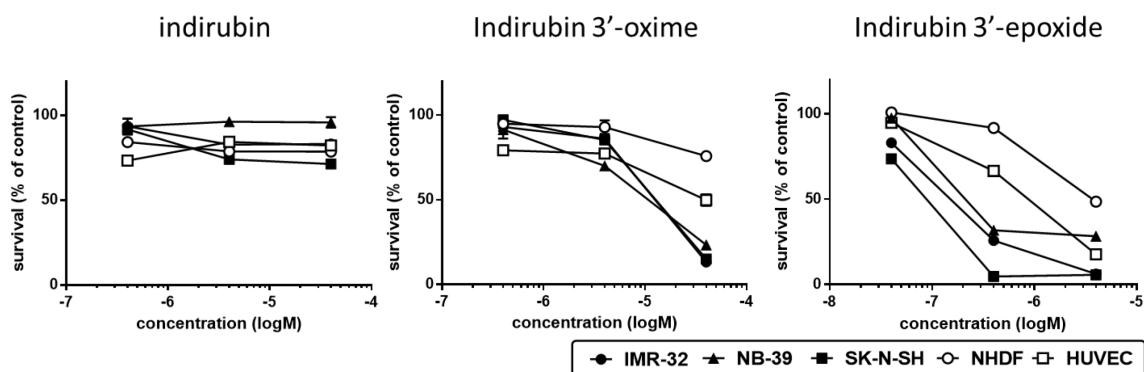


Fig. 5 Cytotoxicity of indirubin derivatives against neuroblastoma cell lines and normal cells.

Cytotoxicity was determined by the MTT assay. The cells were treated with indirubin derivatives (4×10^{-8} - 4×10^{-6} M) for 48 h. Vertical axis indicates the % cell survival as compared to that in vehicle control.

Table 2 IC_{50} values (μM) of indirubin derivatives for cytotoxicity.

	Cytotoxicity IC_{50} values (μM)				
	Neuroblastoma cell lines			Normal cells	
	IMR-32	NB-39	SK-N-SH	HUVEC	NHDF
Indirubin	>100	>100	>100	>100	>100
Indirubin 3'-oxime	12.38	10.23	12.75	53.75	37.04
Indirubin 3'-epoxide	0.16	0.32	0.07	0.82	3.80

2) Indirubin 3'-epoxide の細胞周期への影響

これまでの indirubin に関する研究により indirubin 3'-oxime に優れた細胞傷害活性が報告され、CDK の優位な抑制により細胞周期停止効果を有することが報告されている³⁰⁾。そこで、indirubin が細胞周期に与える影響について、FCM を用いた PI 核酸染色によって検索を行った。Fig. 6 に核細胞周期における細胞比率 (%) を示し、統計解析のデータを Table 3 に示す。その結果、indirubin 3'-oxime にて G₂/M 期での細胞周期停止が認められた (Fig. 6-D)。しかし、indirubin 3'-epoxide については細胞周期の停止効果は認められず、Sub-G₁ の増加が認められた (Fig. 6-A)。

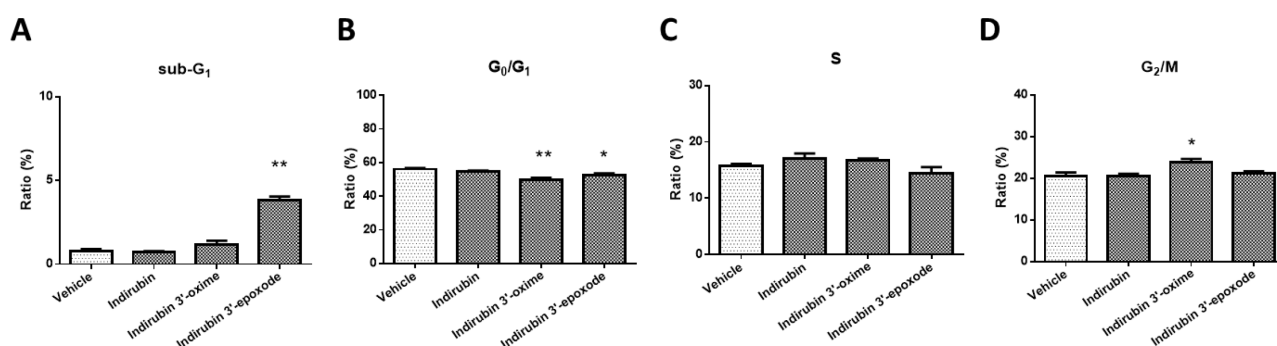


Fig. 6 Analysis of cell cycle status by flow cytometry.

IMR-32 cells were treated with indirubin derivatives (10 μ M) or DMSO (as a vehicle) for 24 h. Percentage of cells at the stage of the cell cycle, as analyzed in A. * p < 0.05, ** p < 0.01 versus vehicle. (A) sub-G₁ phase, (B) G₀/G₁ phase, (C) S phase, and (D) G₂/M phase.

Table 3 Cell cycle analysis of indirubin derivatives. (Analysis data)

	Vehicle		Indirubin		p value	Indirubin 3'-oxime		p value	Indirubin 3'-epoxide		p value
	mean (%)	SEM	mean (%)	SEM		mean (%)	SEM		mean (%)	SEM	
Sub-G ₁	0.77	0.12	0.74	0.03	> 0.9999	1.14	0.26	0.6142	3.81	0.23	< 0.0001 **
G ₀ /G ₁	56.03	0.66	54.77	0.43	0.7127	49.82	1.10	0.0019 **	52.53	1.13	0.0319 *
S	15.77	0.31	17.07	0.89	0.9536	16.66	0.41	> 0.9999	14.43	1.09	0.9067
G ₂ /M	20.54	0.87	20.45	0.60	> 0.9999	23.77	0.86	0.0491 *	21.26	0.43	> 0.9999

One-way ANOVA * p < 0.05, ** p < 0.01 vs vehicle

3) Indirubin 3'-epoxide のアポトーシス誘導効果

細胞周期解析により indirubin 3'-epoxide にアポトーシス誘導を示唆する結果が得られたことから、Hoechst 33342 染色による核の形態変化の観察及び FCM を用いた Annexin-V / PI 染色による初期アポトーシス細胞の検出を行った。細胞核の形態観察により indirubin 3'-epoxide 低濃度 (0.1 μM) 作用にて、アポトーシスの形態学的特徴である核の凝集・断片化が観察された (Fig. 7 矢印)。また、高濃度 (10 μM) では殆どの細胞に核の凝集・断片化が顕著に観察された (Fig. 7)。

更に、初期アポトーシスを検出するために FCM による解析を行った。アポトーシスの特徴である細胞膜の反転により、細胞膜内のホスファチジルセリン (PS) が細胞膜外へ露出する。そのため、PS のプローブとなる Annexin-V を用いアポトーシス細胞 (Annexin-V 陽性) を検出した。その結果、indirubin 3'-epoxide 作用により初期アポトーシスの増加を示し、高濃度 (10 μM) において後期アポトーシスの増加が認められた (Fig. 8)。統計解析のデータを Table 4 に示す。

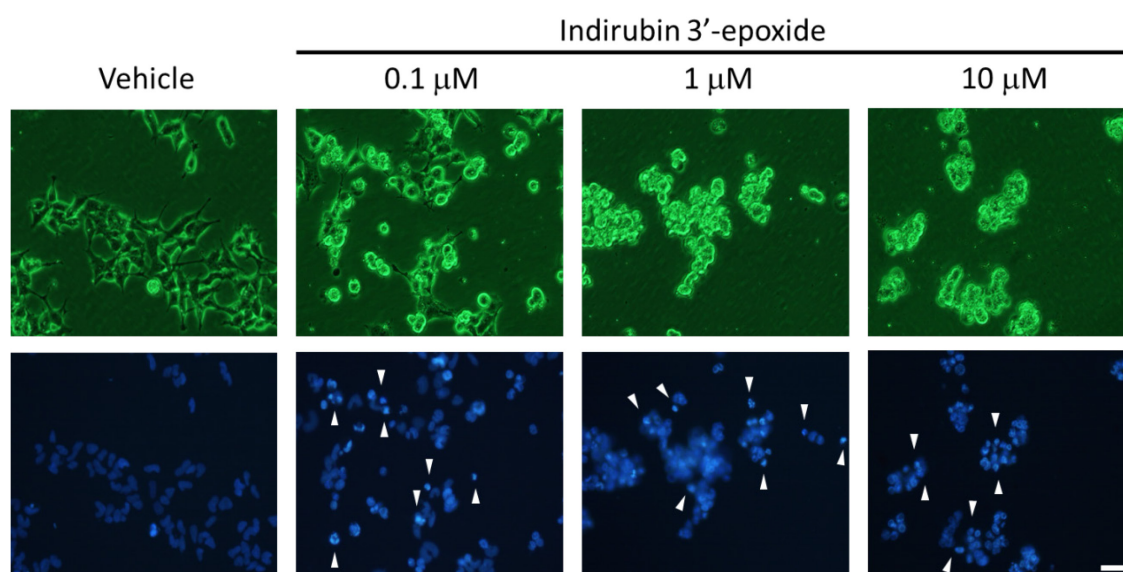


Fig. 7 Morphological observation by Hoechst 33342 staining.

IMR-32 cells were treated with indirubin 3'-epoxide (0.1, 1, 10 μM) or DMSO (as a vehicle) for 24 h. Phase-contrast images (upper) and fluorescence images (lower) were obtained. White arrows at 30 and 100 μM indicate the morphological features of apoptosis, including cell shrinkage, nuclear condensation and nuclear fragmentation. Scale bar: 50 μm

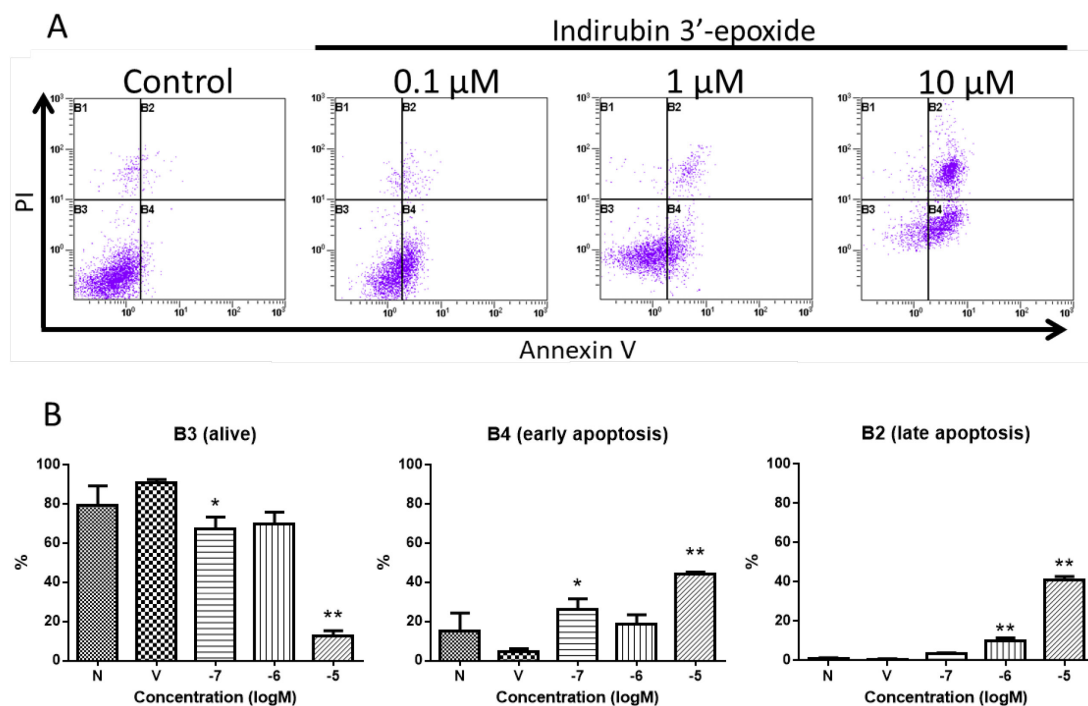


Fig. 8 Analysis of early apoptotic cells by flow cytometry.

IMR-32 cells were treated with indirubin 3'-epoxide (0.1, 1, 10 μ M) or DMSO (as a vehicle) for 24 h. (A) B2: late apoptotic and necrotic cells, B3: live cells, B4: early apoptotic cells. The vertical axis indicates PI-stained cells (FL4 Log) and the horizontal axis indicates annexin V-Alexa Fluor[®] 488-stained cells (FL1 Log). (B) The percentages of the cell populations in each area of (A). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus vehicle control.

Table 4 Analysis of early apoptotic cells by flow cytometry. (Analysis data)

	Vehicle		0.1 μ M		p value	1 μ M		p value	10 μ M		p value
	mean (%)	SEM	mean (%)	SEM		mean (%)	SEM		mean (%)	SEM	
Necrosis (B1)	3.57	0.62	2.99	0.89	> 0.9999	1.47	0.41	0.1439	2.09	0.49	0.3942
Late apoptosis (B2)	91.04	1.51	67.20	6.21	0.3141	69.97	6.00	0.3391	12.80	2.55	0.0028 **
Alive (B3)	0.63	0.23	3.42	0.45	0.2799	9.93	1.63	0.0005 **	41.09	1.73	< 0.0001 **
Early apoptosis (B4)	4.77	1.32	26.38	5.24	0.0476 *	18.64	4.83	0.2853	44.02	1.31	0.0015 **

One-way ANOVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs vehicle

4) Colorimetric assay による caspase 活性

Caspase は、アポトーシスに関わる細胞死メカニズムの中心的な制御因子として知られている。そこで、Caspase Colorimetric Assay により caspase-3、-8、-9 の活性の評価を行った (Fig. 9)。統計解析のデータを Table 5 に示す。Caspase assay によりミトコンドリア経路に関与する caspase-9 は活性が認められ、エフェクターカスパーゼである caspase-3、及びデスレセプター経路に関与する caspase-8 の活性は認められなかった (Fig. 9-B)。

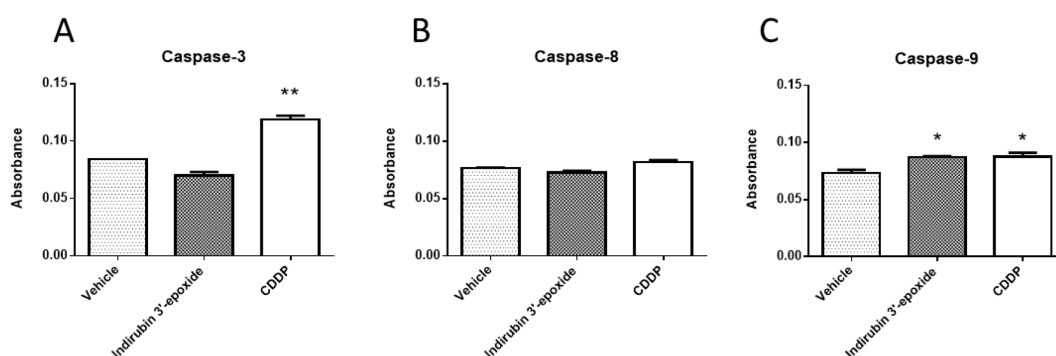


Fig. 9 Measurement of the caspase activities.

IMR-32 cells were treated with indirubin 3'-epoxide (10 μ M), cisplatin (CDDP: 100 μ M as a positive control) or DMSO (as a vehicle control) for 48 h. Each column shows the fold-change relative to that in the vehicle control corresponding to (A) caspase-3, (B) caspase-8 or (C) caspase-9. * p <0.05, ** p <0.01 versus vehicle control.

Table 5 Measurement of the caspase activities. (Analysis data)

	Vehicle		Indirubin 3'-epoxide			CDDP		
	mean (%)	SEM	mean (%)	SEM	p value	mean (%)	SEM	p value
Caspase-3	0.0840	0.0000	0.0700	0.0031	0.0557	0.1187	0.0034	0.0022 **
Caspase-8	0.0763	0.0007	0.0727	0.0015	0.2869	0.0817	0.0018	0.1149
Caspase-9	0.0733	0.0026	0.0870	0.0010	0.0479 *	0.0877	0.0033	0.0411 *

One-way ANOVA * p < 0.05, ** p < 0.01 vs vehicle

5) アポトーシス関連タンパク質の発現変動

Indirubin 3'-epoxide 作用の各アポトーシス関連タンパク質発現の経時的変化 (0 ~ 48 h) を **Fig. 10** に示す。また各タンパク質の経時的変化をグラフにしたものを **Fig. 12** に、統計解析のデータを **Table 6** に示す。アポトーシス誘導因子である Smac/DIABLO の増加やアポトーシス抑制因子である survivin、c-IAP-1、XIAP の減少が認められた。また、pro-PARP の減少及び切断型の cleaved -PARP の増加が認められた。caspase の発現変動はエフェクターカスパーゼである caspase-3、-7 には認められず、ミトコンドリアに関わる caspase-9 や Bax /Bcl-2 に変動が認められた。更に、Indirubin 3'-epoxide 作用による AIF のタンパク質発現の経時的変化 (0 ~ 24 h) を **Fig. 11** に示す。また、グラフ (**Fig. 13**)、有意差検定のデータ (**Table 6**) を示す。その結果、核抽出タンパク質において 24 h 後に AIF の有意な増加が認められた。

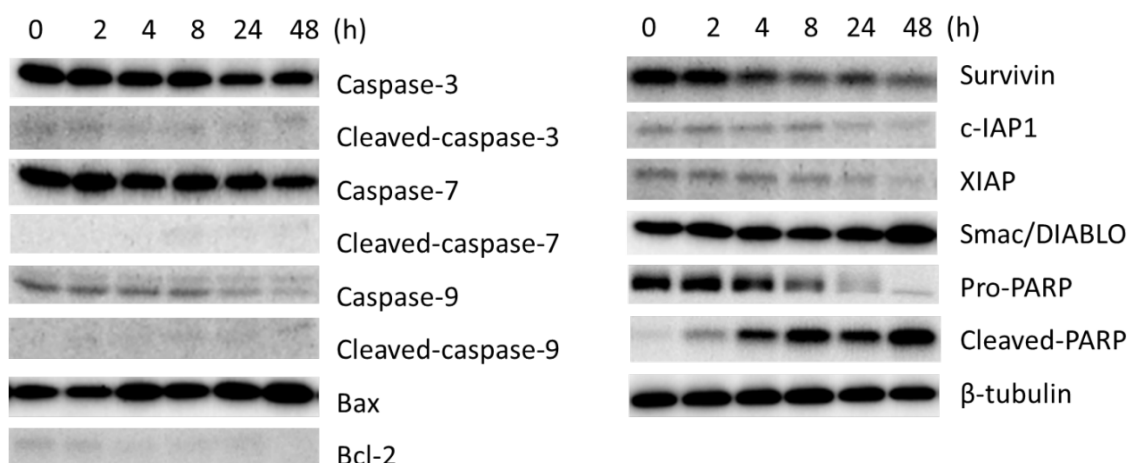


Fig. 10 Western blot analysis for apoptosis-related proteins.

IMR-32 cells were treated with indirubin 3'-epoxide (10 μ M) for 0-48 h. The expression levels of the apoptosis-related proteins were assessed by western blotting; β -tubulin was used as the loading control.

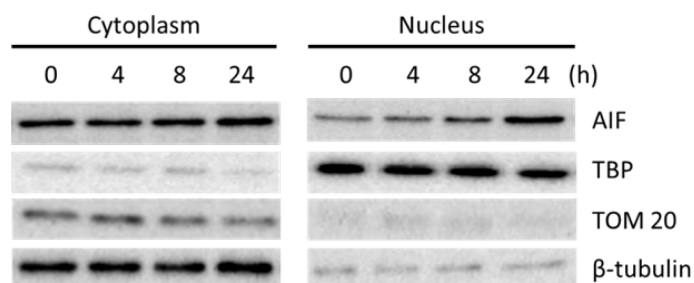


Fig. 11 Western blot analysis for the apoptosis-inducing factor (AIF) protein.

IMR-32 cells were treated with indirubin 3'-epoxide (10 μ M) for 0-48 h. The expression levels of the proteins were assessed by western blotting; TBP (nucleus), TOM 20 (mitochondria), and β -tubulin (cytoplasm) were used as the loading control.

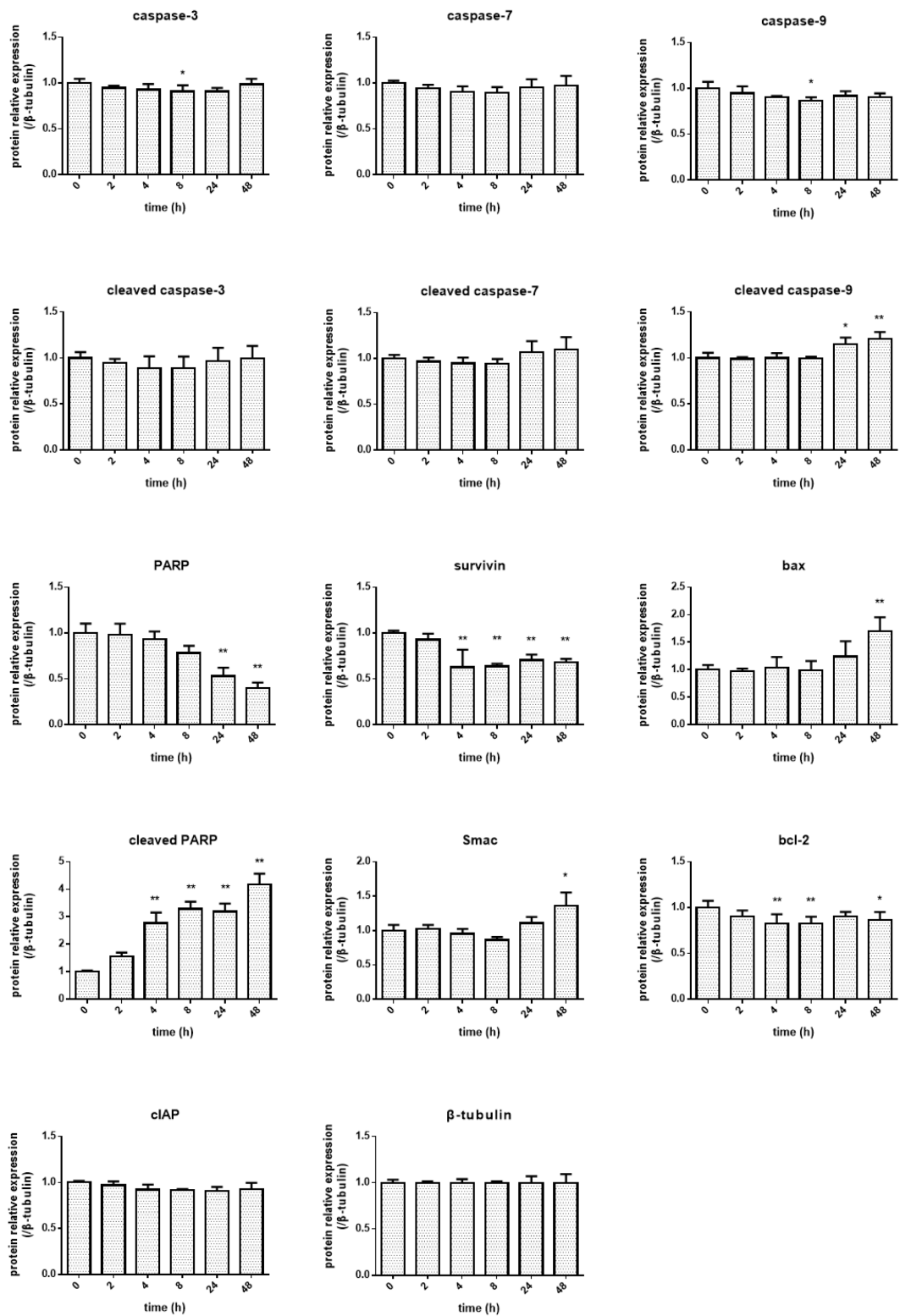


Fig. 12 Western blot analysis for apoptosis-related proteins. (Analysis data)

Vertical axis indicates protein relative expression as compared to that in the loading control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus 0 h.

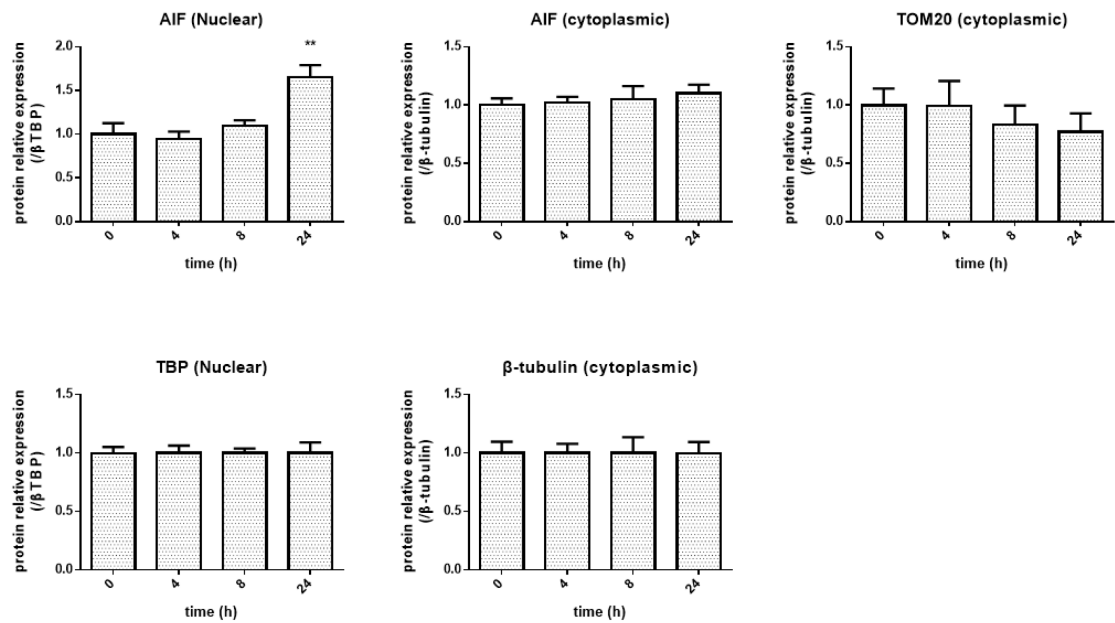


Fig. 13 Western blot analysis for the apoptosis-inducing factor (AIF) protein. (Analysis data)

Vertical axis indicates protein relative expression as compared to that in the loading control. $*p < 0.05$,

$**p < 0.01$ versus 0 h.

Table 6 Western blot analysis. (Analysis data)

	0h			2h			4h			8h			24h			48h		
	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value
caspase-3	1	0.03	0.95	0.01	0.7642	0.93	0.04	0.1034	0.91	0.04	0.0180 *	0.91	0.02	0.2032	0.98	0.04	0.1153	
cleaved caspase-3	1	0.04	0.94	0.03	>0.9999	0.89	0.08	0.3751	0.89	0.07	0.4354	0.96	0.08	>0.9999	0.99	0.08	>0.9999	
caspase-7	1	0.01	0.94	0.02	>0.9999	0.90	0.04	0.3870	0.89	0.04	0.2798	0.95	0.05	>0.9999	0.97	0.06	>0.9999	
cleaved caspase-7	1	0.02	0.97	0.02	>0.9999	1.01	0.04	>0.9999	0.94	0.03	>0.9999	1.07	0.07	>0.9999	1.10	0.08	0.5134	
caspase-9	1	0.04	0.95	0.04	0.7642	0.90	0.01	0.1034	0.87	0.02	0.0180 *	0.92	0.03	0.2032	0.90	0.02	0.1153	
cleaved caspase-9	1	0.03	0.99	0.01	>0.9999	1.00	0.03	>0.9999	0.99	0.01	>0.9999	1.15	0.04	0.0363 *	1.21	0.04	0.0042 **	
Bax	1	0.05	0.97	0.03	>0.9999	1.03	0.12	>0.9999	0.99	0.10	>0.9999	1.24	0.16	0.3286	1.70	0.14	0.0006 **	
Bcl-2	1	0.04	0.90	0.04	0.1882	0.82	0.06	0.0080 **	0.82	0.04	0.0083 **	0.90	0.03	0.2120	0.87	0.05	0.0446 *	
PARP	1	0.06	0.98	0.07	>0.9999	0.93	0.05	>0.9999	0.78	0.05	0.1136	0.53	0.05	0.0009 **	0.40	0.03	0.0001 **	
cleaved PARP	1	0.02	1.57	0.08	0.0513	2.76	0.22	<0.0001 **	3.28	0.16	<0.0001 **	3.19	0.17	<0.0001 **	4.18	0.22	<0.0001 **	
survivin	1	0.01	0.93	0.04	>0.9999	0.63	0.11	0.0003 **	0.64	0.02	0.0004 **	0.71	0.03	0.0020 **	0.68	0.02	0.0012 **	
XIAP	1	0.04	0.96	0.02	>0.9999	0.89	0.05	0.5747	0.83	0.04	0.1380	0.88	0.06	0.4498	0.87	0.10	0.3664	
Smac	1	0.05	1.03	0.03	>0.9999	0.95	0.04	>0.9999	0.86	0.03	0.7086	1.11	0.05	>0.9999	1.36	0.11	0.0100 *	
clAP	1	0.01	0.97	0.02	>0.9999	0.92	0.03	0.4283	0.91	0.01	0.3034	0.91	0.03	0.2275	0.93	0.04	0.4864	
AIF (cytoplasm)	1	0.07	0.95	0.05	>0.9999	—	—	—	1.09	0.04	0.8859	1.66	0.08	0.1622	—	—	—	
AIF (nucleus)	1	0.03	1.02	0.03	>0.9999	—	—	—	1.05	0.07	>0.9999	1.10	0.04	0.0012 **	—	—	—	

One-way ANOVA *p<0.05, **p<0.01 vs control (0h)

3.1.2 小括

Indirubin 3'-epoxide の抗腫瘍効果はアポトーシス誘導による細胞死であった。アポトーシス抑制因子の発現減少 (Bcl-2、XIAP、survivin)、アポトーシス誘導因子 (Bax、AIF、Smac) の発現増加により、ミトコンドリアを介したカスパーゼ-9 の活性を誘導するが、それ以外のカスパーゼの活性は認められなかった。ミトコンドリアから放出されるアポトーシス誘導因子 (AIF) の核内への移行が認められ、アポトーシスを誘導した。更に、カスパーゼを介さない機序で PARP 切断によるアポトーシスを誘導した。

3.1.3 考案

神経芽腫細胞に対し、強力な活性を示した indirubin 3'-epoxide は 0.4 μ M にて正常細胞と比較し選択的な傷害活性が認められた。本研究で用いた indirubin 3'-oxime などの誘導体には、CDK の優位な抑制により細胞周期停止効果を有することが報告されている³⁰⁾。しかしながら、indirubin 3'-epoxide は細胞周期の停止効果は認められず、Sub-G₁ の増加が認められた。Sub-G₁ は G₁ 期よりも少ない DNA 含有量を示す細胞であり、DNA の断片化やアポトーシス小体の形成により DNA 量が減少したアポトーシス細胞を示している^{42,43)}。このことから、indirubin 3'-epoxide はアポトーシスを誘導していることが示唆された。更に Hoechst 33342 染色による核の形態変化の観察及び FCM を用いた Annexin-V / PI 染色による初期アポトーシス細胞の検出により、indirubin 3'-epoxide は神経芽腫細胞に対しアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

そこで、Colorimetric Assay により caspase の関与を検討した。Caspase-8 に関して、indirubin 3'-epoxide と同様に CDDP でも活性が認められなかった。神経芽腫は DNA のメチル化により caspase-8 の欠失することが知られているが^{44,45)}、本研究で用いた IMR-32 細胞には caspase-8 の欠失が報告されているためであると思われる⁴⁶⁾。一方で、caspase-9 の活性を示したのにも関わらず、アポトーシス誘導の下流に位置する caspase-3 の活性が認められなかった (Fig. 9-A,C)。このことから、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る。

更に詳しい細胞死メカニズムを Western blot により検討し、Indirubin 3'-epoxide 作用により、アポトーシス抑制因子である survivin、c-IAP-1、XIAP の発現を減少した。Survivin は caspase のシグナル伝達に関わる Smac/DIABLO 阻害や XIAP 安定化、活性型 caspase の分解などを誘導する^{47,48)}。本研究におけるこれらのタンパク質の発現変動は、アポトーシスを促進するシグナル伝達を誘導している。また PARP は DNA の修復や細胞死、分化に関わるタンパク質であり、アポトーシスの指標とされる^{49,50)}。pro-PARP の減少及び切断型の cleaved -PARP の増加が 4~8 h 以降に認められ、このことから 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。

一方、アポトーシス誘導、抑制因子の変動が認められたものの、アポトーシス経路で知ら

れる caspase の発現変動はエフェクターカスパーゼである caspase-3、-7 ともに認められなかった。Caspase-3 に関しては colorimetric assay による caspase 活性と同様の結果が得られ、indirubin 3'-epoxide は caspase 非依存アポトーシスを誘導することが示唆された。本化合物と同じく epoxide を構造に有する Bisphenol A di-glycidyl ether (BADGE) に Jarkat (白血病細胞) に対する caspase 非依存アポトーシスが報告されている⁵¹⁾。BADGE 作用による細胞死は Bax/Bid 依存に伴うミトコンドリアからの AIF の放出によるアポトーシス誘導であった⁵²⁾。Fig. 14 に示すように、AIF はミトコンドリア膜間腔に存在し、核内に移行することによってアポトーシスを誘導することが知られている^{53,54)}。本研究においても、Indirubin 3'-epoxide 作用により caspase-9 及び Bax/Bcl-2 の発現変動が認められたことから、ミトコンドリア内在タンパク質の放出が考えられる。そこで、細胞質と核とでタンパク質の分画抽出を行い、核抽出部にて AIF の増加を確認した。このことから、caspase 非依存型アポトーシスには、AIF の核内増加によるアポトーシス誘導が関与することが示唆された。しかし、細胞質抽出部での AIF 減少は認められなかった。これは細胞内の AIF が恒常的を産生していることが考えられる。本研究での細胞質抽出部はミトコンドリアのタンパク質も含まれているため、ミトコンドリアについても分画抽出を行い、AIF の変動を確認する必要がある。

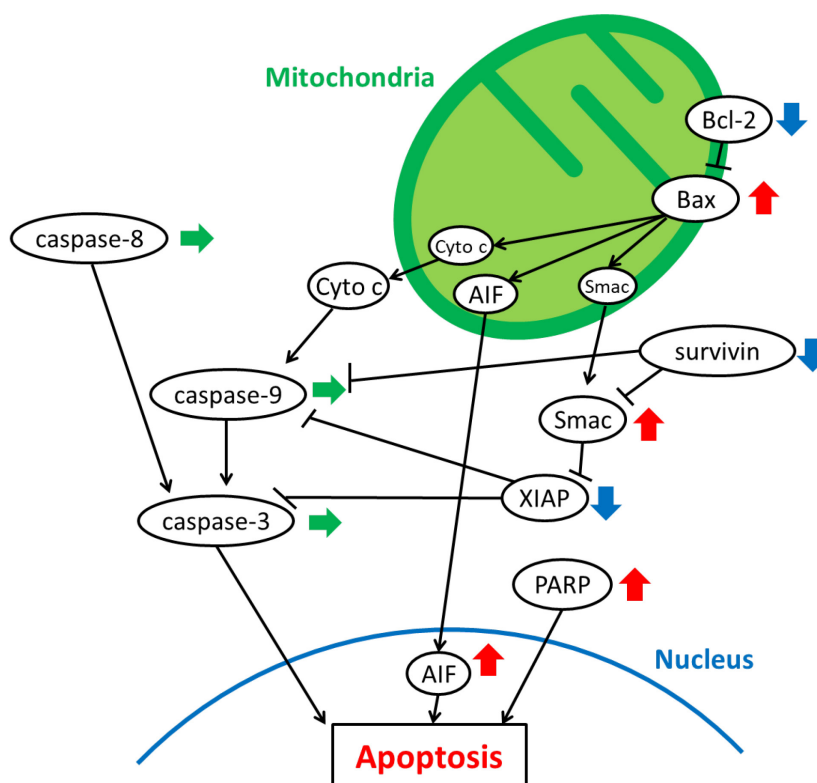


Fig. 14 Cell death mechanism by indirubin 3'-epoxide.

3.2 Burchellin 誘導体のアポトーシス誘導効果の検討

3.2.1 結果

1) Burchellin 誘導体の細胞傷害活性の評価

ヒト神経芽腫細胞 (IMR-32、LA-N-1、NB-39、SK-N-SH) 及びヒト正常細胞 (HUVEC、NHDF) に対して burchellin 誘導体の細胞傷害活性を MTT 法によって評価した (Fig. 15)。その結果、compound 1 と比較し compound 5 は活性を示さず、compound 2、compound 3 は 100 μ M において正常細胞との選択性を示したものの、神経芽腫に対する活性向上は認められなかった (Fig. 15)。また、compound 4 は神経芽腫細胞に対し IC₅₀ 値は中程度の活性であるが (Table 7)、10~100 μ M の作用にて正常細胞と比較し選択的な傷害活性が認められ、神経芽腫に対する活性の増加を示した (Fig. 15)。本論文では、神経芽腫細胞に選択的な活性を示した compound 4 について詳しい細胞死のメカニズム解析を行った。

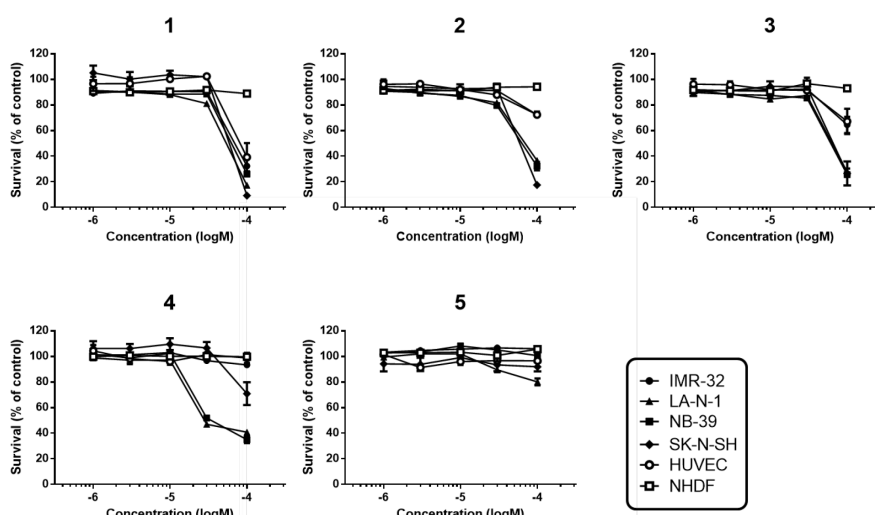


Fig. 15 Cytotoxicity of burchellin derivatives against neuroblastoma cell lines and normal cells.

Cytotoxicity was determined by the MTT assay. The cells were treated with burchellin derivatives (1×10^{-6} - 1×10^{-4} M) for 48 h. Vertical axis indicates the % cell survival as compared to that in the vehicle control.

Table 7 IC₅₀ values (μ M) of burchellin derivatives for cytotoxicity.

Compounds	Cytotoxicity IC ₅₀ values (μ M)					
	Neuroblastoma cell lines				Normal cells	
	IMR-32	LA-N-1	NB-39	SK-N-SH	HUVEC	NHDF
1	73.17	52.75	65.43	84.05	>100	95.99
2	>100	71.82	63.73	63.49	>100	>100
3	>100	62.55	62.19	72.15	>100	>100
4	>100	49.67	48.03	>100	>100	>100
5	>100	>100	>100	>100	>100	>100

2) Burchellin のアポトーシス誘導効果の評価

アポトーシス誘導効果を、Hoechst 33342 染色による核の形態変化の観察及び FCM を用いた Annexin-V / PI 染色による初期アポトーシス細胞の検出を行った。細胞核の形態観察により compound 4 は、CDDP と同様に 30、100 μM 作用にて、アポトーシスの形態学的特徴である核の凝集・断片化が観察された (Fig. 16)。

更に、初期アポトーシスを検出するために FCM による解析を行った。その結果、compound 4 作用により 10 ~ 100 μM にて初期アポトーシスの増加を示し、100 μM において初期アポトーシス、後期アポトーシスともに有意な増加が認められた (Fig. 17)。統計解析のデータを Table 8 に示す。

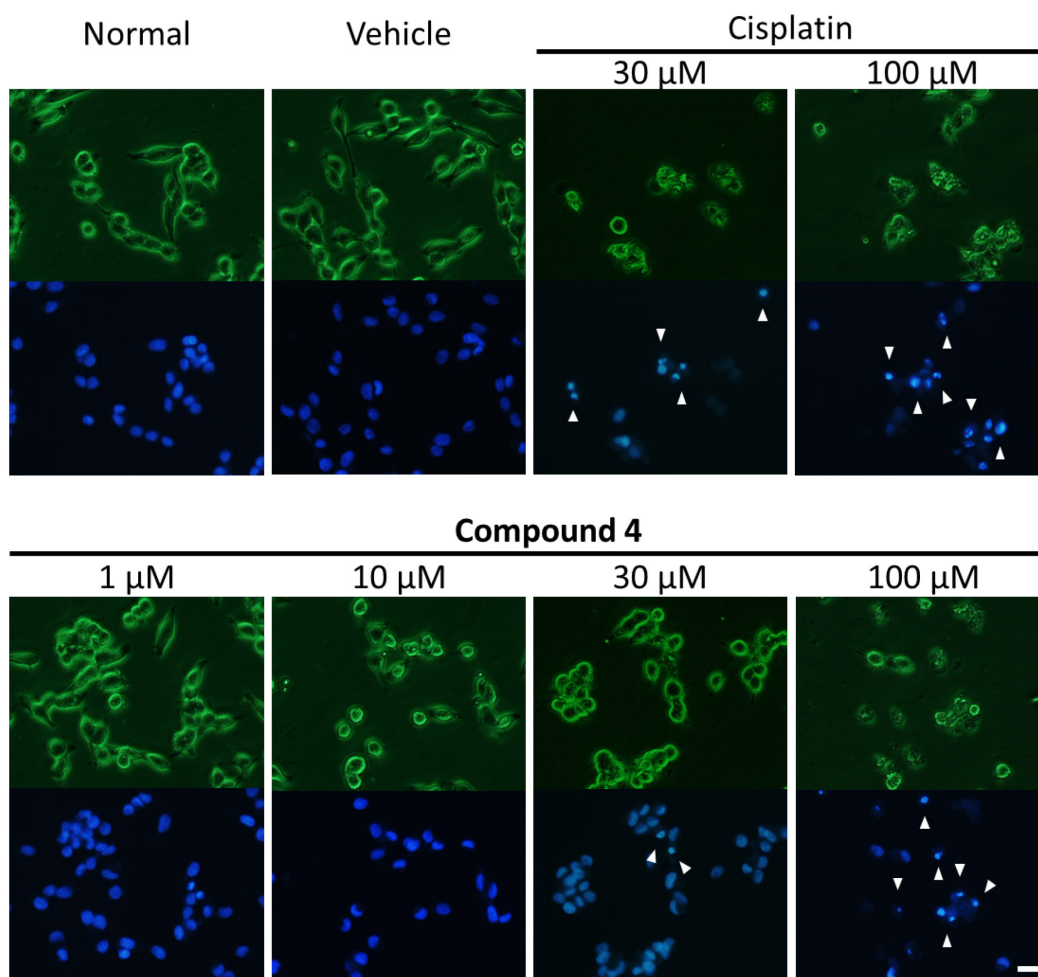


Fig. 16 Morphological observation by Hoechst 33342 staining.

NB-39 cells were treated with Compound 4 (1, 10, 30, 100 μM) or DMSO (as a vehicle) for 24 h. Phase-contrast images (upper) and fluorescence images (lower) were obtained. White arrows at 30 and 100 μM indicate the morphological features of apoptosis, including cell shrinkage, nuclear condensation and nuclear fragmentation. Scale bar: 20 μm

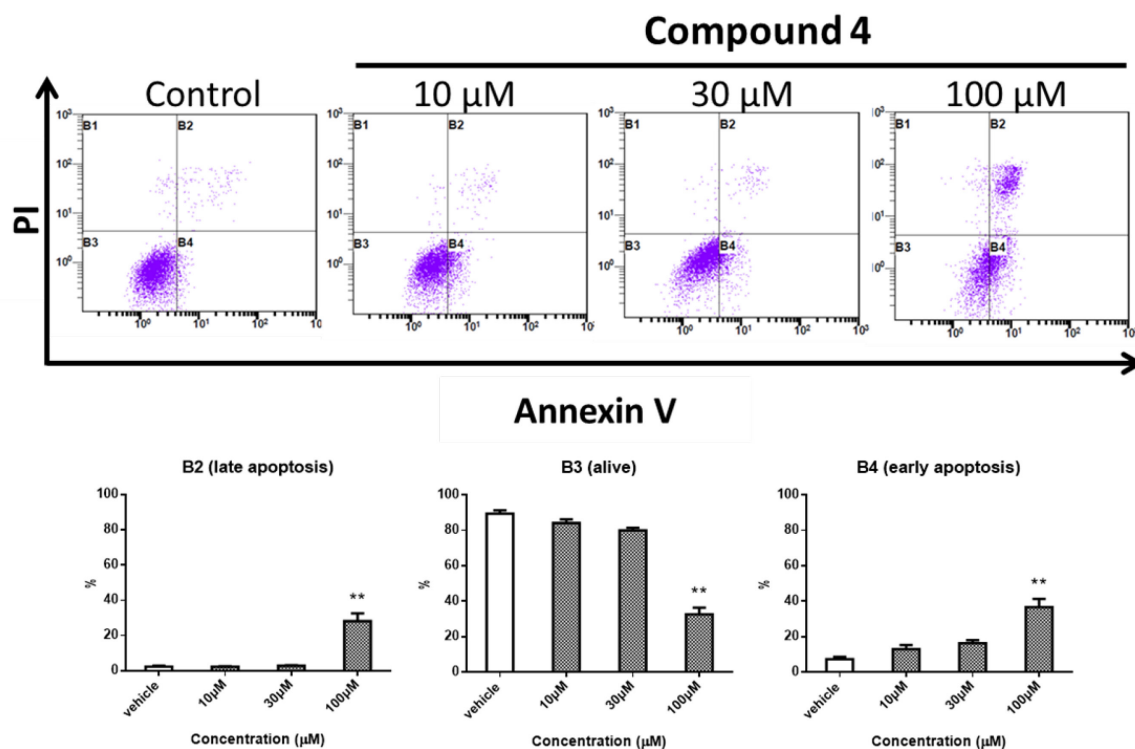


Fig. 17 Analysis of early apoptotic cells by flow cytometry.

NB-39 cells were treated with compound 4 (10, 30, 100 μM) or DMSO (as a vehicle) for 24 h. (A) B2: late apoptotic and necrotic cells; B3: viable cells; B4: early apoptotic cells. Vertical axis indicates PI-stained cells (FL4 Log) and the horizontal axis indicates annexin V-Alexa Fluor[®] 488-stained cells (FL1 Log). (B) Percentages of the cell populations in each area of (A). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus vehicle control

Table 8 Analysis of early apoptotic cells by flow cytometry. (Analysis data)

	Vehicle		10 μM		p value	30 μM		p value	100 μM		p value
	mean (%)	SEM	mean (%)	SEM		mean (%)	SEM		mean (%)	SEM	
Necrosis (B1)	0.90	0.24	0.67	0.09	> 0.9999	0.79	0.11	> 0.9999	2.52	0.42	0.0029 **
Late apoptosis (B2)	2.27	0.50	2.29	0.11	> 0.9999	2.81	0.25	> 0.9999	28.17	4.44	0.0005 **
Alive (B3)	89.46	1.85	84.10	2.23	0.5170	80.05	1.45	0.1042	32.61	3.74	< 0.0001 **
Early apoptosis (B4)	7.37	1.15	12.95	2.32	0.4060	16.36	1.78	0.0964	36.71	4.58	0.0003 **

One-way ANOVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs vehicle

3) Caspase inhibitor (z-VAD-fmk) による細胞死への影響

アポトーシスに関わる細胞死メカニズムとして caspase の関与を検討した。pan-caspase inhibitor である z-VAD-fmk を用い、細胞への caspase inhibitor 処理群との比較により評価を行った。z-VAD-fmk を処理していない細胞 (黒) と z-VAD-fmk を処理した細胞 (白) とを比較し、compound 4 作用による細胞生存率が、44.5% から 74.9% と有意に回復した (Fig. 18)。統計解析のデータを Table 9 に示す。また、CDDP にも同様な傾向が認められた。

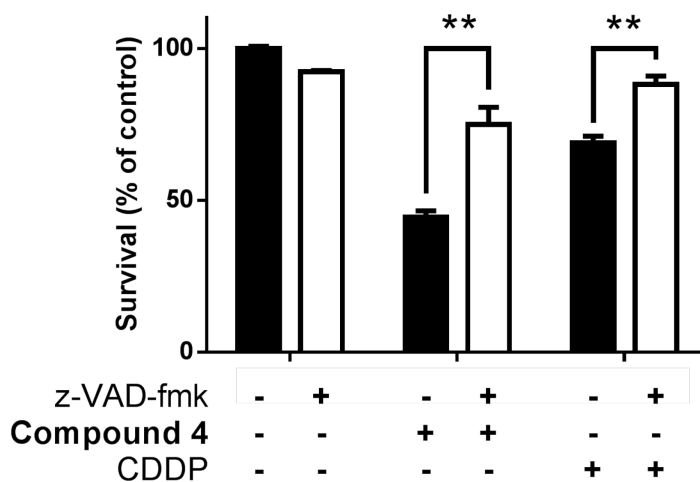


Fig. 18 Caspase inhibitor assay. (z-VAD-fmk)

NB-39 cells were treated with z-VAD-fmk (40 μ M), compound 4 (100 μ M), CDDP (10 μ M as a positive control) or DMSO (as a vehicle control) for 48 h. * p < 0.05, ** p < 0.01 versus vehicle control

Table 9 Caspase inhibitor assay. (Analysis data)

	Survival rate (%)				p value	
	z-VAD-fmk(-)		z-VAD-fmk(+)			
	mean	SEM	mean	SEM		
vehicle	100.00	0.67	92.26	0.43	0.2469	
compound 4	44.51	2.01	74.92	5.73	< 0.0001	**
CDDP	68.92	2.20	88.13	2.76	0.0015	**

Two-way ANOVA * p < 0.05, ** p < 0.01 vs z-VAD-fmk(-)

4) アポトーシス関連タンパク質の発現変動の評価

Compound 4 作用の各アポトーシス関連タンパク質発現の経時的変化 (0 ~ 48 h) を **Fig. 19** に示す。また、各タンパク質の経時的変化をグラフにしたものを **Fig. 21** に、統計解析のデータを **Table 10** に示す。PARP であるが、切断型である cleaved PARP の発現が 24 ~ 48 h にかけて有意に増加していた。また、caspase に関して、caspase-3、-7 とともに 48 h にて cleaved 型の有意な増加が認められ、caspase-9 についても増加を示し、Bax、Bcl-2 の変動が認められた。

次に、細胞の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。Compound 4 作用の各細胞増殖関連タンパク質発現の経時的変化 (0 ~ 48 h) を **Fig. 20** に示す。また、グラフ (**Fig. 22**)、有意差検定のデータ (**Table 10**) を示す。本研究で用いた NB-39 細胞は IMR-32 細胞と比較し ERK、Akt、STAT-3 のリン酸化が発現していることを確認し、更に、NB-39 細胞への compound 4 作用によりリン酸化を抑制を示した (**Fig. 20**、**Table 10**)。

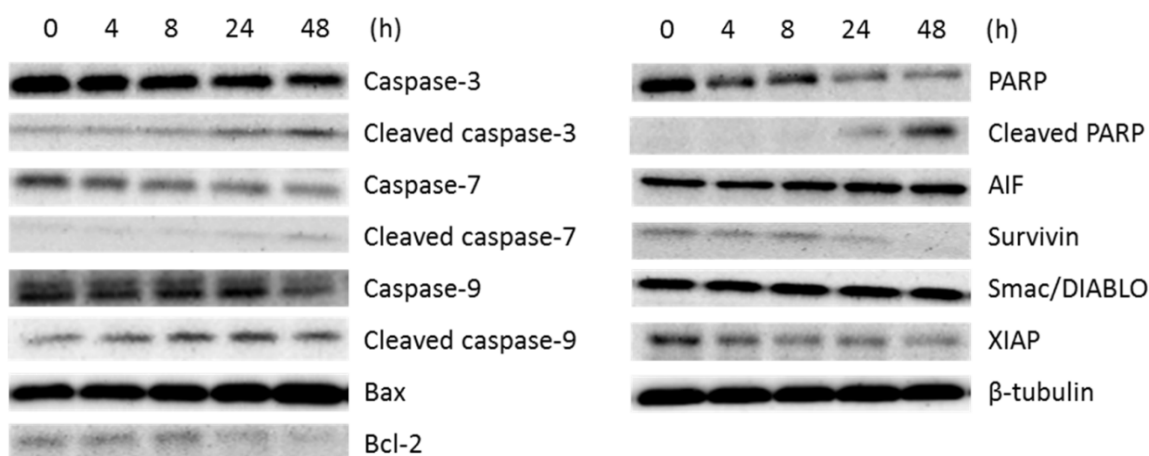


Fig. 19 Western blot analysis for apoptosis-related proteins.

NB-39 cells were treated with compound 4 (30 μ M) for 0-48 h. The expression levels of the apoptosis-related proteins were assessed by western blotting; β -tubulin was used as the loading control.

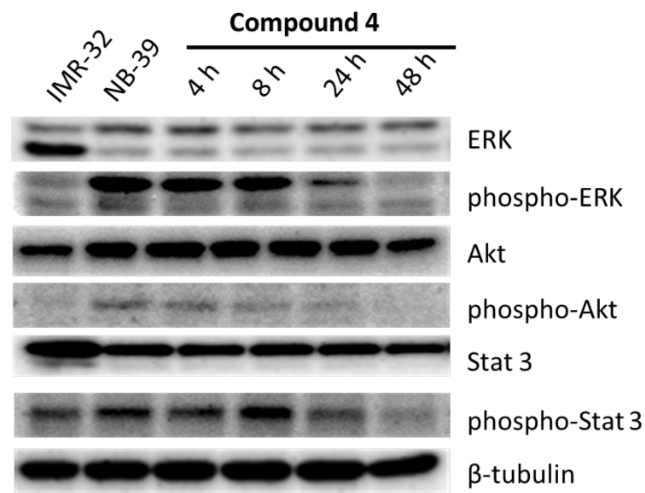


Fig. 20 Western blot analysis for cell growth-related proteins.

NB-39 cells were treated with compound 4 (30 μ M) for 0-48 h. The expression levels of the cell growth-related proteins were assessed by western blotting; β -tubulin was used as the loading control.

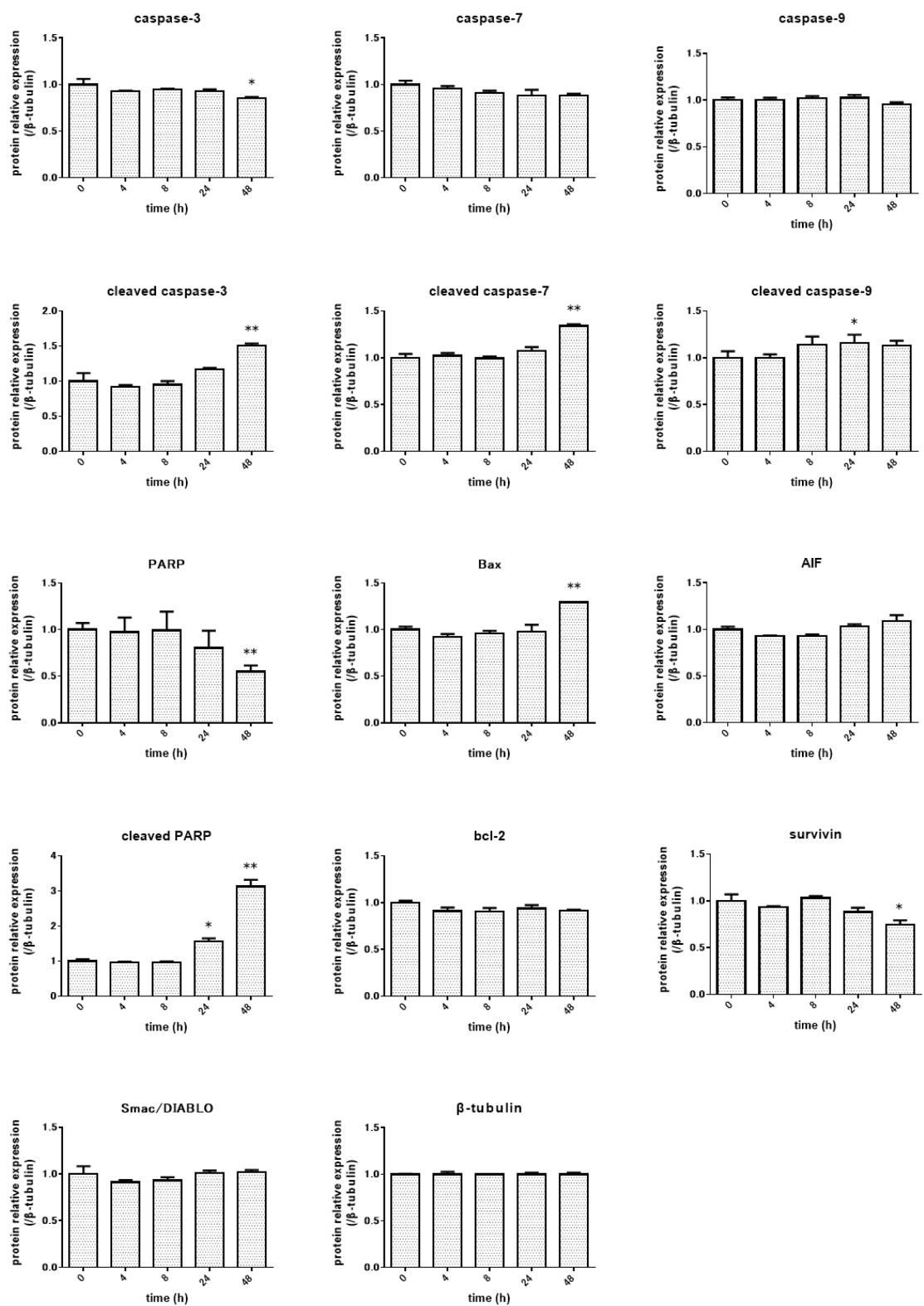


Fig. 21 Western blot analysis for apoptosis-related proteins. (Analysis data)

Vertical axis indicates protein relative expression as compared to that in the loading control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus 0 h.

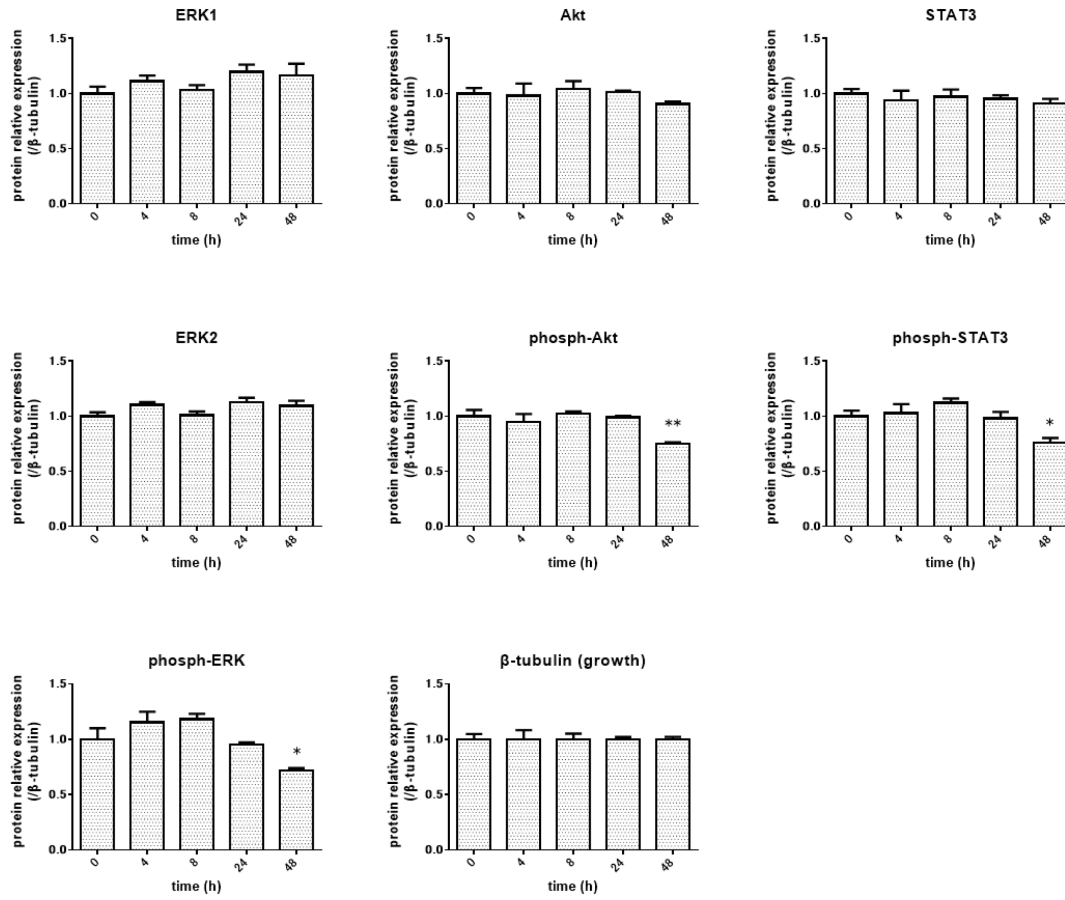


Fig. 22 Western blot analysis for cell growth-related proteins. (Analysis data)

Vertical axis indicates protein relative expression as compared to that in the loading control. * $p < 0.05$,

** $p < 0.01$ versus 0 h.

Table 10 Western blot analysis. (Analysis data)

	0h (NB-39)			4h			8h			24h			48h			IMR-32			
	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value	
caspase-3	1	0.06	0.93	0.01	0.4740	> 0.9999	0.95	0.01	> 0.9999	0.93	0.02	0.5359	0.86	0.01	0.0342	*	—	—	—
cleaved caspase-3	1	0.12	0.92	0.03	> 0.9999	> 0.9999	0.95	0.05	> 0.9999	1.17	0.02	0.2170	1.50	0.04	0.0006	**	—	—	—
caspase-7	1	0.04	0.96	0.03	> 0.9999	> 0.9999	0.91	0.03	0.4999	0.88	0.06	0.2433	0.88	0.02	0.2418	—	—	—	—
cleaved caspase-7	1	0.04	1.02	0.03	> 0.9999	> 0.9999	1.00	0.02	> 0.9999	1.07	0.04	0.5957	1.34	0.02	0.0003	**	—	—	—
caspase-9	1	0.03	1.00	0.02	> 0.9999	> 0.9999	1.02	0.03	> 0.9999	1.03	0.03	0.4145	0.96	0.02	0.4145	—	—	—	—
cleaved caspase-9	1	0.07	1.00	0.04	> 0.9999	> 0.9999	1.14	0.09	0.0518	1.16	0.09	0.0262	1.13	0.05	0.0626	—	—	—	—
Bax	1	0.03	0.92	0.03	0.7427	> 0.9999	0.96	0.03	> 0.9999	0.98	0.08	> 0.9999	1.29	0.00	0.0030	**	—	—	—
Bcl-2	1	0.02	0.91	0.04	0.3658	> 0.9999	0.90	0.04	0.3069	0.94	0.03	0.9722	0.91	0.01	0.4179	—	—	—	—
PARP	1	0.07	0.97	0.16	> 0.9999	> 0.9999	0.99	0.20	> 0.9999	0.90	0.19	0.3074	0.55	0.07	0.3074	**	—	—	—
cleaved PARP	1	0.06	0.96	0.03	> 0.9999	> 0.9999	0.96	0.03	> 0.9999	1.56	0.09	0.0269	3.12	0.20	< 0.0001	**	—	—	—
AIF	1	0.03	0.93	0.01	0.5179	> 0.9999	0.93	0.01	0.6056	1.03	0.02	> 0.9999	1.09	0.06	0.2811	—	—	—	—
survivin	1	0.07	0.94	0.01	> 0.9999	> 0.9999	1.03	0.02	> 0.9999	0.88	0.04	0.5106	0.75	0.05	0.0242	*	—	—	—
Smac	1	0.08	0.91	0.02	0.8703	> 0.9999	0.93	0.04	> 0.9999	1.01	0.03	> 0.9999	1.02	0.02	> 0.9999	—	—	—	—
ERK 1	1	0.06	1.11	0.05	> 0.9999	> 0.9999	1.03	0.05	> 0.9999	1.20	0.07	0.3773	1.17	0.10	0.5891	0.83	0.10	0.2237	—
ERK 2	1	0.04	1.10	0.03	0.4689	> 0.9999	1.01	0.03	> 0.9999	1.13	0.04	0.2480	1.09	0.05	0.5863	2.32	0.11	0.0003	††
phospho-ERK	1	0.10	1.15	0.10	0.3830	> 0.9999	1.18	0.05	0.2192	0.95	0.02	> 0.9999	0.72	0.02	0.0337	*	0.76	0.04	0.1271
Akt	1	0.05	0.98	0.11	> 0.9999	> 0.9999	1.04	0.07	> 0.9999	1.01	0.01	> 0.9999	0.91	0.02	0.7140	1.04	0.04	0.2987	—
phospho-Akt	1	0.06	0.95	0.07	> 0.9999	> 0.9999	1.02	0.02	> 0.9999	0.99	0.02	> 0.9999	0.75	0.01	0.0014	**	0.74	0.01	0.0108
STAT 3	1	0.04	0.94	0.09	0.7018	> 0.9999	0.97	0.07	> 0.9999	0.95	0.03	> 0.9999	0.91	0.04	0.2339	1.26	0.04	0.0111	†
phospho-STAT 3	1	0.05	1.03	0.08	> 0.9999	> 0.9999	1.12	0.04	0.4387	0.98	0.06	> 0.9999	0.76	0.04	0.0312	*	0.98	0.06	0.8104

One-way ANOVA *p < 0.05, **p < 0.01 vs control (0h)

t test † p < 0.05, †† p < 0.01 vs control (NB-39)

3.2.2 小括

Burchellin 誘導体である compound 4 は、神経芽腫 (NB-39、LA-N-1) に対して細胞傷害活性を示した。また、正常細胞と比較しても、神経芽腫細胞に選択的な細胞傷害活性を示した。Hoechst 33342 染色法により、compound 4 の作用によって核の凝集が認められ、アポトーシスを誘導していることが、Flow cytometry による Annexin-V/PI 染色法によって、初期アポトーシス細胞の増加が認められた。また、z-VAD-fmk 処理により細胞傷害活性が回復したことから、compound 4 による細胞死は caspase が関与していることが示唆され、アポトーシス関連タンパク質の発現変動より、ミトコンドリアを介する caspase-9、caspase-3 の活性によってアポトーシス細胞死を誘導することが明らかとなった。更に、増殖や分化に関わるタンパク質 (Erk、Akt、Stat 3) のリン酸化の抑制により増殖を阻害することが明らかとなった。

3.2.3 考案

神経芽腫細胞に選択的な傷害活性が認められた compound 4 は、Hoechst 33342 染色による核の形態変化の観察及び FCM を用いた Annexin-V / PI 染色による初期アポトーシス細胞の検出により、神経芽腫細胞に対しアポトーシスを誘導することが明らかとなった。更に、pan-caspase inhibitor である z-VAD-fmk を用いたところ、compound 4 作用による細胞生存率が有意に回復した。このことから、compound 4 作用による caspase 細胞死を z-VAD-fmk によって阻害したことが考えられる。よって compound 4 は Fig. 23 に示すように、caspase を介したアポトーシス細胞死を誘導することが示唆された。また、Western blot においてもエフェクターカスパーゼである caspase-3、-7、ミトコンドリア経路に関する caspase-9 の cleaved 型の有意な増加が認められ、更にミトコンドリア膜の透過性変化により cytochrome c などの放出に関わる Bax、Bcl-2 の発現変動を示した。以上のことから compound 4 は、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、アポトーシスの指標となる PARP であるが、切断型である cleaved PARP の発現が有意に増加していた。これによりアポトーシスを誘導することが示された。

更に、細胞の増殖や分化に関わる因子 (ERK、Akt、STAT-3) は多くの腫瘍細胞にて活性化していることが知られており、神経芽腫においても ALK の遺伝子変異によって ERK、Akt、STAT-3 の活性が亢進していることが報告されている^{55,56)}。IMR-32 細胞は ALK の wild-type であることが知られ⁵⁷⁾、また、NB-39 細胞は ALK 活性型であり、その阻害によって、ERK のリン酸化を抑制しアポトーシスを誘導することが報告されている⁵⁸⁾。本研究で用いた NB-39 細胞は IMR-32 細胞と比較し ERK、Akt、STAT-3 のリン酸化が発現していることを確認した (Fig. 20、Table 10)。更に、NB-39 細胞への compound 4 作用によりリン酸化を抑制することを認めた。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⁵⁹⁻⁶¹⁾、本化合物による発現変動によってミトコンドリアを介したアポトーシスのシグナル伝達に関与することが示唆される。

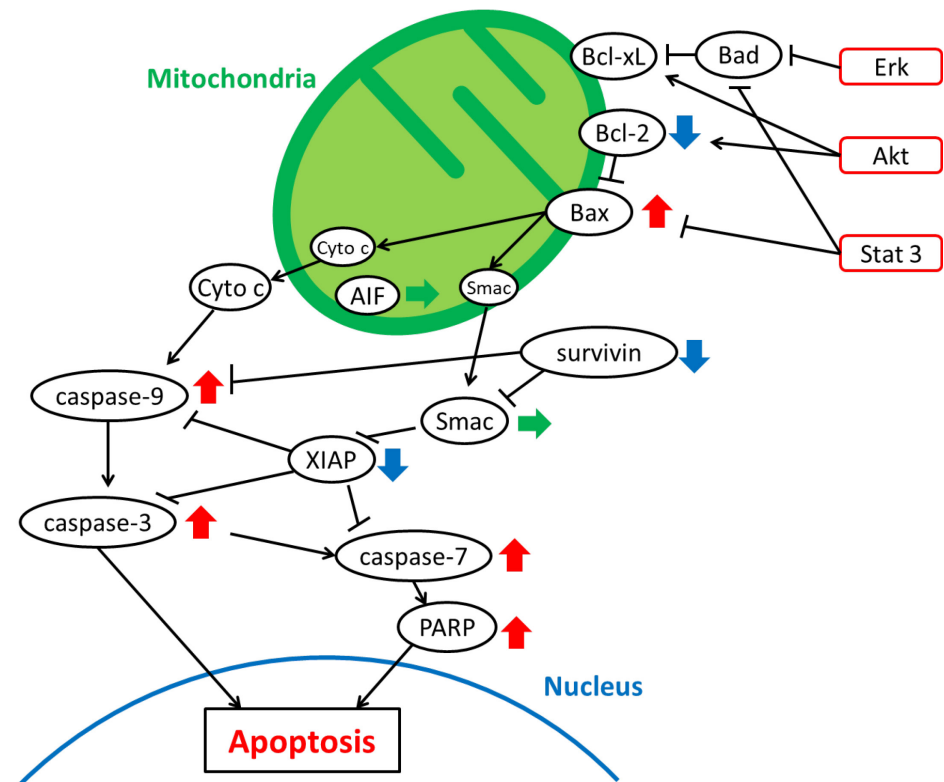


Fig. 23 Cell death mechanism by burchelin derivative (compound 4)

3.3 Chalcone 配糖体の細胞周期停止効果の検討

3.3.1 結果

1) Chalcone 配糖体の細胞傷害活性

ヒト神経芽腫細胞 (IMR-32、LA-N-1、NB-39、SK-N-SH) 及びヒト正常細胞 (HUVEC、NHDF) に対して Chalcone 配糖体の細胞傷害活性を CCK-8 法によって評価した (Fig. 24)。その結果、メトキシ基を有する化合物が細胞傷害活性を示した。

本研究では compound 6 が神経芽腫細胞 (LA-N-1、NB-39) に対して、 IC_{50} 値が $20 \mu\text{M}$ 以下と強い活性を示した (Table 11)。また、compound 6 は、 $10 \mu\text{M}$ の作用にて正常細胞と比較し選択的な傷害活性が認められ、神経芽腫に対する細胞傷害活性を示した (Fig. 24)。本論文では、神経芽腫細胞に選択的な活性を示した compound 6 について詳しい細胞死のメカニズム解析を行った。

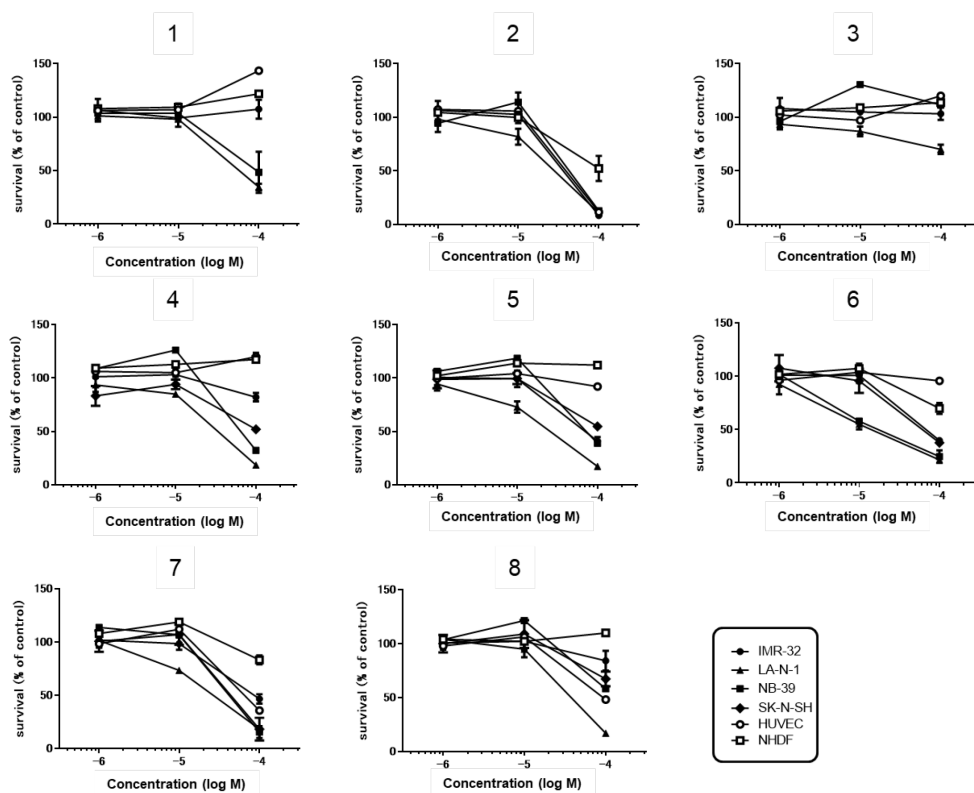


Fig. 24 Cytotoxicity of chalcone glycosidases against neuroblastoma cell lines and normal cells.

Cytotoxicity was determined by the CCK-8 assay. The cells were treated with chalcone glycosidases (1×10^{-6} - 1×10^{-4} M) for 48 h. Vertical axis indicates the % cell survival as compared to that in the vehicle control.

Table 11 IC₅₀ values (μM) of chalcone glycosidase derived from *Brassica rapa* L.

Compounds	Cytotoxicity IC ₅₀ values (μM)					
	Neuroblastoma cell lines				Normal cells	
	IMR-32	LA-N-1	NB-39	SK-N-SH	HUVEC	NHDF
1	>100	72.6	>100	>100	>100	>100
2	71.2	26.1	77.3	84.6	75.5	>100
3	>100	>100	>100	>100	>100	>100
4	>100	34.1	90.1	>100	>100	>100
5	85.5	24.1	94.5	>100	>100	>100
6	93.5	15.3	19.7	73.2	>100	>100
7	93.4	25.8	78.6	80.5	92.2	>100
8	>100	44.6	>100	>100	99.0	>100

2) Chalcone 配糖体による細胞周期への影響

Compound 6 が細胞周期に与える影響について、FCM を用いた PI 核酸染色によって検索を行った。Fig. 25 に核細胞周期における細胞比率 (%) を示し、統計解析のデータを Table 12 に示す。Compound 6 を 30 μM、48 h 作用させた結果、S 期の減少、G₀/G₁ 期の増加を示した。また、統計解析の結果からも、濃度依存的かつ経時的に S 期の減少、それに伴い G₀/G₁ 期での細胞群の増加を示した (Fig. 25)。48 h と長期に作用させることにより G₂/M 期の減少も合わせ G₀/G₁ 期の細胞群の増加を示した (Fig. 25)。

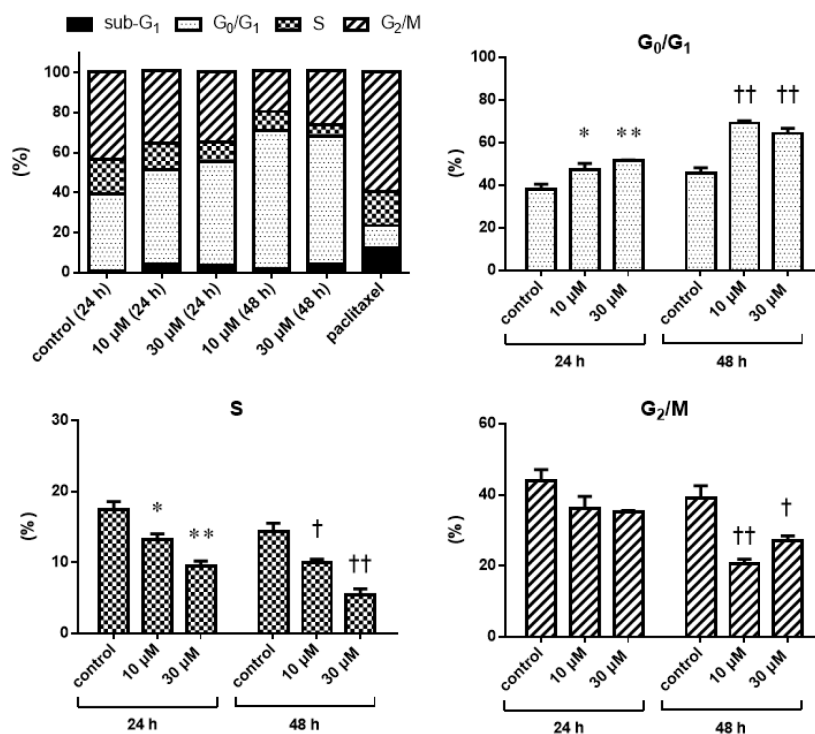


Fig. 25 Analysis of cell cycle status by flow cytometry.

NB-39 cells were treated with compound 6 (10, 30 μM) or DMSO (as a vehicle control) for 24 and 48 h. Percentage of cells at the stage of the cell cycle, as analyzed in A. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus vehicle control (24 h), † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ versus vehicle control (48 h). Paclitaxel was used as the G_2/M arrest control.

Table 12 Analysis of cell cycle status by flow cytometry. (Analysis data)

	control (24 h)		10 μM (24 h)		p value	30 μM (24 h)		p value
	mean(%)	SEM	mean(%)	SEM		mean(%)	SEM	
sub-G1	0.79	0.19	3.88	0.47	0.0007 **	3.78	0.19	0.0009 **
G0/G1	38.27	2.27	47.46	2.85	0.0194 *	51.62	0.32	0.0016 **
S	17.49	1.11	13.21	0.86	0.0118 *	10.04	0.44	<0.0001 **
G2/M	43.97	3.16	36.30	3.29	0.1037	35.13	0.42	0.0573
	control (48 h)		10 μM (48 h)		p value	30 μM (48 h)		p value
	mean(%)	SEM	mean(%)	SEM		mean(%)	SEM	
sub-G1	1.50	0.24	1.85	0.44	>0.9999	3.97	0.81	0.0041 ††
G0/G1	45.76	2.49	69.23	1.06	<0.0001 ††	64.33	2.49	<0.0001 ††
S	14.34	1.21	9.47	0.74	0.0115 †	5.45	0.87	<0.0001 †
G2/M	38.98	3.58	20.47	1.43	0.0004 ††	27.00	1.43	0.0111 †

Two-way ANOVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control (24 h)

† $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ vs control (48 h)

3) 細胞周期関連タンパク質の発現変動

細胞周期は Fig. 26 に示すように、各周期にてそれぞれの cyclin と CDK の複合体によって進行、停止が制御されている⁶²⁾。Compound 6 の作用により G₀/G₁ 期での細胞周期停止が顕著に認められた。そこで G₁ 期から S 期への進行に関わる cyclin 及び CDK の発現を評価した。また、S 期移行への転写因子を制御するタンパク質についての発現を評価した。

Compound 6 作用の各細胞周期関連タンパク質発現の経時的変化 (0~72 h) を Fig. 27 に示す。また、各タンパク質の経時的変化をグラフにしたものを Fig. 28 に、統計解析のデータを Table 14 に示す。その結果、作用後 8h において cyclin D の減少、p27 の増加を確認した。また、compound 6 作用により 48 h 後において、リン酸化 Rb、E2F の発現を有意に減少した。

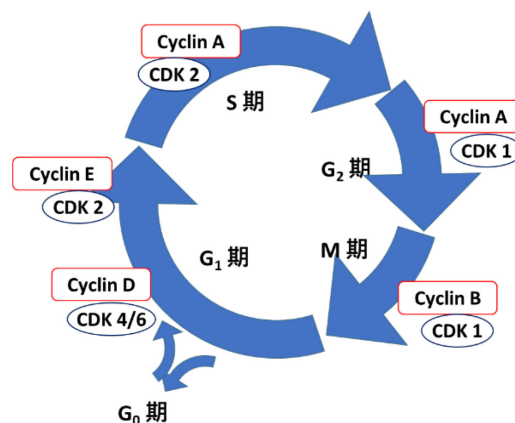


Fig. 26 Cell cycle mechanism.

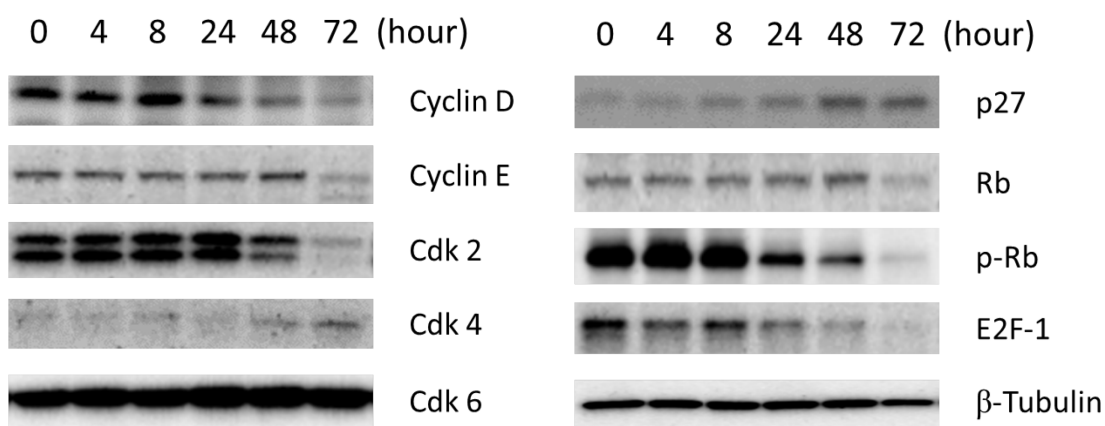


Fig. 27 Western blot analysis for cell cycle-related proteins.

NB-39 cells were treated with compound 6 (20 μM) for 0-72 h. The expression levels of the cell cycle-related proteins were assessed by western blotting; β-tubulin was used as the loading control.

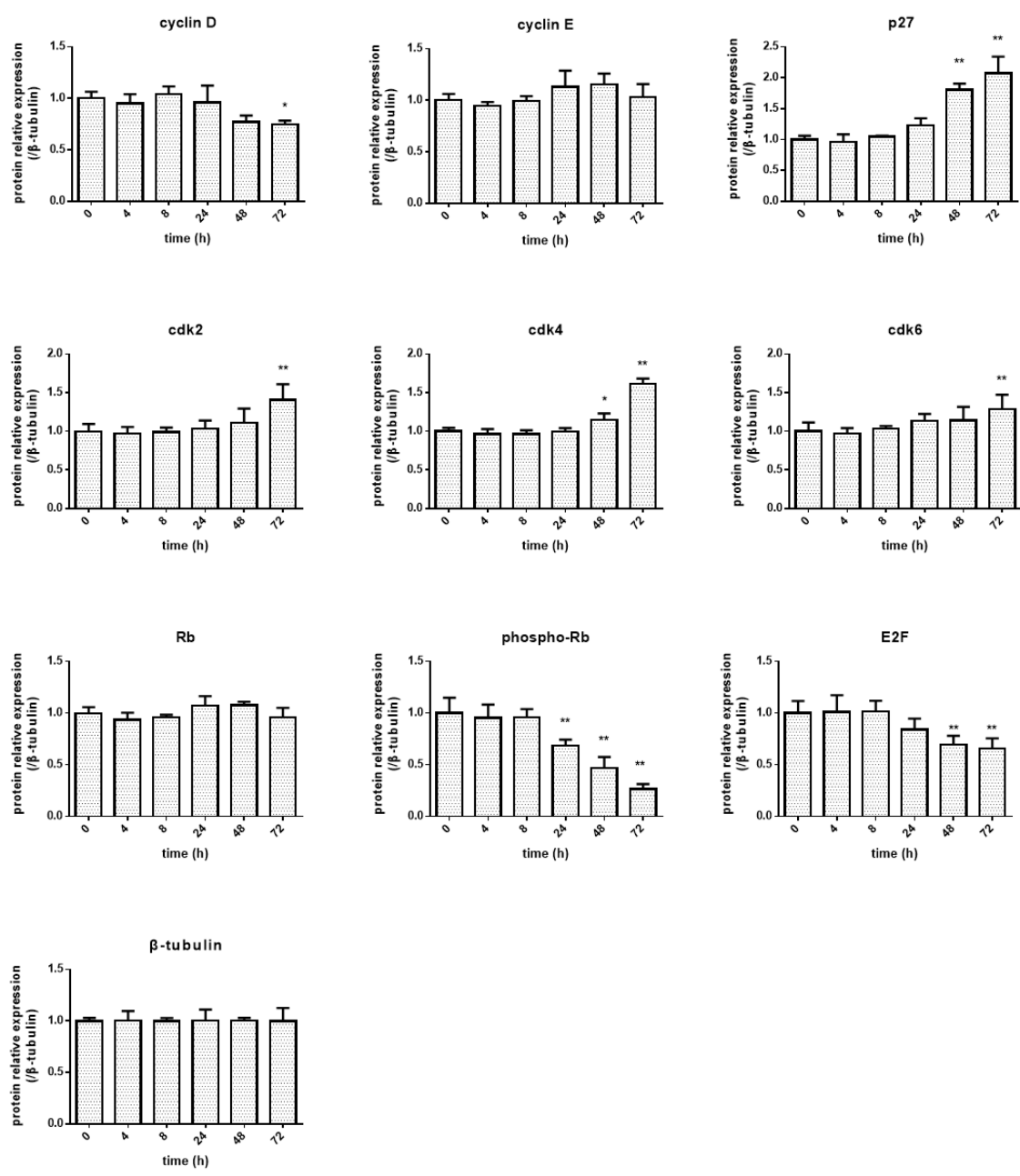


Fig. 28 Western blot analysis for cell cycle-related proteins. (Analysis data)

Vertical axis indicates protein relative expression as compared to that in the loading control. * $p < 0.05$,

** $p < 0.01$ versus 0 h.

4) アポトーシス誘導効果

更にアポトーシス誘導効果を、Hoechst 33342 染色による核の形態変化の観察及び FCM を用いた Annexin-V / PI 染色による初期アポトーシス細胞の検出を行った。細胞核の形態観察により compound 6 は 10、100 μM 作用にて、アポトーシスの形態学的特徴である核の凝集・断片化が観察された (Fig. 29)。

更に、初期アポトーシスを検出するために FCM による解析を行った。その結果、compound 6 の作用により 30 μM にて初期アポトーシスの増加を示し、後期アポトーシスにおいても増加が認められた (Fig. 30)。統計解析のデータを Table 13 に示す。

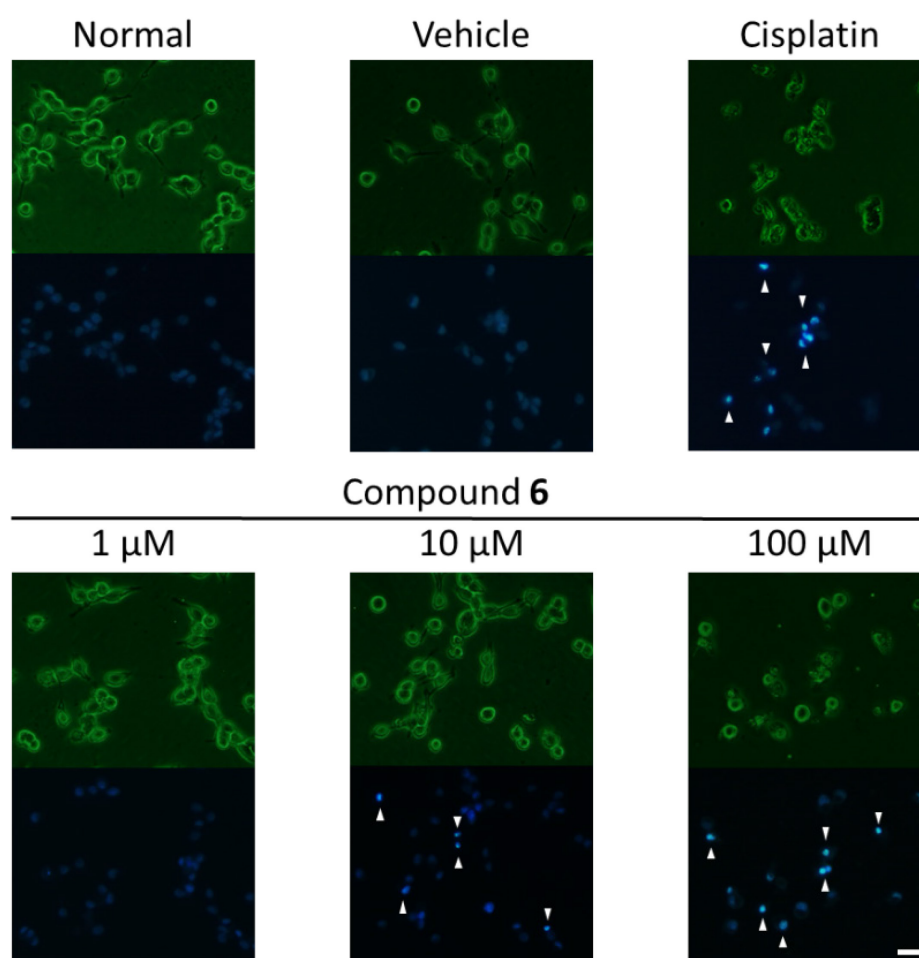


Fig. 29 Morphological observation by Hoechst 33342 staining.

NB-39 cells were treated with Compound 6 (1, 10, 100 μM), cisplatin (100 μM) or DMSO (as a vehicle control) for 48 h. Phase-contrast images (upper) and fluorescence images (lower) were obtained. White arrows at 10 and 100 μM indicate the morphological features of apoptosis, including cell shrinkage, nuclear condensation and nuclear fragmentation. Scale bar: 30 μm

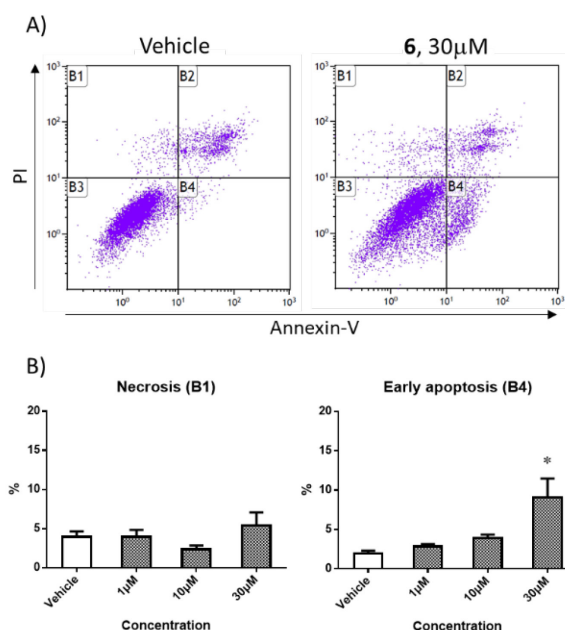


Fig. 30 Analysis of early apoptotic cells by flow cytometry.

NB-39 cells were treated with compound 6 (1, 10, 30 µM) or DMSO (as a vehicle control) for 48 h. (A) B1: necrotic cells; B2: late apoptotic and necrotic cells; B3: viable cells; B4: early apoptotic cells. Vertical axis indicates PI-stained cells (FL4 Log) and the horizontal axis indicates annexin V-Alexa Fluor® 488-stained cells (FL1 Log). (B) Percentages of the cell populations in each area of A. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus vehicle control

Table 13 Analysis of early apoptotic cells by flow cytometry. (Analysis data)

	Vehicle		0.1 µM		<i>p</i> value	1 µM		<i>p</i> value	10 µM		<i>p</i> value
	mean (%)	SEM	mean (%)	SEM		mean (%)	SEM		mean (%)	SEM	
Necrosis (B1)	3.94	0.72	3.95	0.87	> 0.9999	2.34	0.50	> 0.9999	5.41	1.67	> 0.9999
Late apoptosis (B2)	10.08	1.72	13.32	1.78	> 0.9999	18.21	4.28	0.3762	13.96	4.87	> 0.9999
Alive (B3)	84.01	1.27	79.99	1.16	> 0.9999	75.54	4.93	0.3632	71.54	4.17	0.1126
Early apoptosis (B4)	1.96	0.35	2.84	0.31	> 0.9999	3.91	0.45	0.9387	9.08	2.39	0.0208 *

One-way ANOVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs vehicle

5) アポトーシス関連タンパク質の発現変動

Compound 6 に対する各アポトーシス関連タンパク質発現の経時的変化 (0~72 h) を **Fig. 31** に示す。また、各タンパク質の経時的変化をグラフにしたものを **Fig. 32** に、統計解析のデータを **Table 14** に示す。アポトーシスの指標となる PARP であるが、切断型である cleaved PARP の発現が 48~72 h にかけて有意に増加していた。また、エフェクターカスパーゼである caspase-3、-7 を評価した。その結果 caspase-3、-7 ともに 72 h にて cleaved 型の有意な増加が認められた。

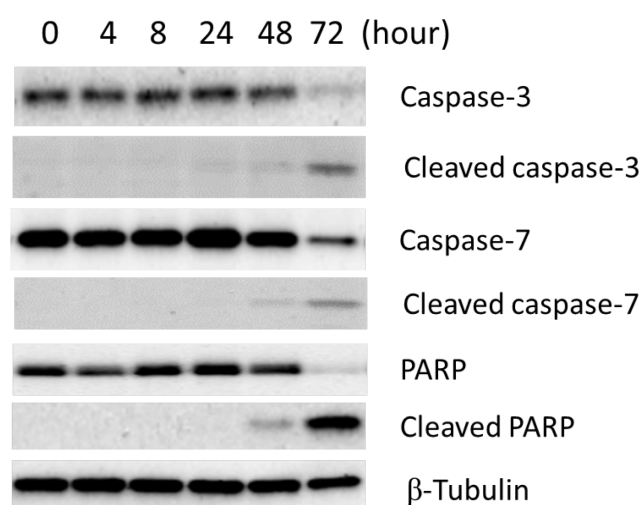


Fig. 31 Western blot analysis for apoptosis-related proteins.

NB-39 cells were treated with compound 6 (20 μ M) for 0-72 h. The expression levels of the apoptosis-related proteins were assessed by western blotting; β -tubulin was used as the loading control.

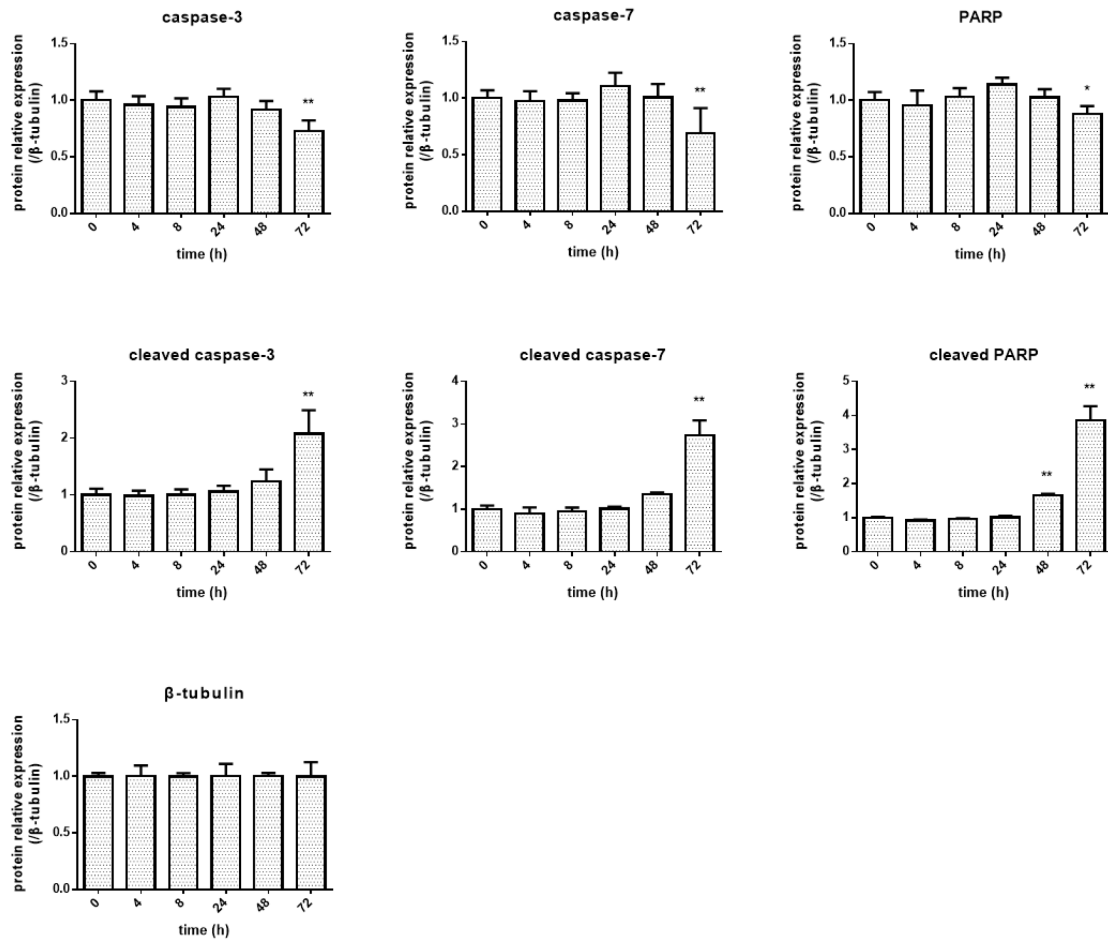


Fig. 32 Western blot analysis for apoptosis-related proteins. (Analysis data)

Vertical axis indicates protein relative expression as compared to that in the loading control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus 0 h.

Table 14 Western blot analysis (Analysis data)

	0h			4h			8h			24h			48h			72h			
	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value	mean	SEM	p value	
caspase-3	1	0.05	> 0.9999	0.96	0.04	0.8418	0.94	0.04	> 0.9999	1.03	0.04	> 0.9999	0.92	0.04	0.3368	0.73	0.05	0.0002	**
cleaved caspase-3	1	0.06	> 0.9999	0.99	0.05	> 0.9999	1.00	0.05	> 0.9999	1.06	0.06	> 0.9999	1.24	0.12	0.2686	2.08	0.24	< 0.0001	**
caspase-7	1	0.04	> 0.9999	0.98	0.05	> 0.9999	0.98	0.04	> 0.9999	1.11	0.07	0.8850	1.01	0.07	> 0.9999	0.69	0.13	0.0086	**
cleaved caspase-7	1	0.05	> 0.9999	0.89	0.09	> 0.9999	0.95	0.05	> 0.9999	1.01	0.03	> 0.9999	1.35	0.03	0.0975	2.73	0.21	< 0.0001	**
PARP	1	0.04	> 0.9999	0.95	0.08	> 0.9999	1.03	0.05	> 0.9999	1.14	0.03	0.0189 *	1.02	0.04	> 0.9999	0.88	0.04	0.0427	*
cleaved PARP	1	0.02	> 0.9999	0.91	0.02	> 0.9999	0.96	0.02	> 0.9999	1.01	0.03	> 0.9999	1.65	0.03	0.0046 **	3.87	0.24	< 0.0001	**
	1																		
cyclin D	1	0.04	> 0.9999	0.95	0.05	> 0.9999	1.04	0.04	> 0.9999	0.96	0.10	> 0.9999	0.93	0.15	0.0713	0.83	0.07	0.0461	*
cyclin E	1	0.04	> 0.9999	0.95	0.02	> 0.9999	0.99	0.03	> 0.9999	1.13	0.09	0.2570	1.16	0.06	0.1181	1.03	0.07	> 0.9999	
p27	1	0.04	> 0.9999	0.97	0.07	> 0.9999	1.05	0.01	> 0.9999	1.23	0.07	0.1069	1.81	0.06	< 0.0001 **	2.07	0.15	< 0.0001	**
Rb	1	0.03	> 0.9999	0.94	0.04	> 0.9999	0.96	0.01	> 0.9999	1.07	0.05	0.8864	1.08	0.02	0.8241	0.96	0.05	> 0.9999	
phospho-Rb	1	0.09	> 0.9999	0.95	0.07	> 0.9999	0.96	0.05	> 0.9999	0.69	0.03	0.0042 **	0.47	0.06	< 0.0001 **	0.27	0.03	< 0.0001	**
E2F	1	0.07	> 0.9999	1.01	0.09	> 0.9999	1.01	0.06	> 0.9999	0.84	0.06	0.1405	0.70	0.05	0.0033 **	0.66	0.06	0.0014	**
cdk2	1	0.05	> 0.9999	0.97	0.05	> 0.9999	0.99	0.03	> 0.9999	1.03	0.06	> 0.9999	1.11	0.10	0.9454	1.41	0.12	0.0024	**
cdk4	1	0.026	> 0.9999	0.96	0.04	> 0.9999	0.96	0.03	> 0.9999	0.99	0.03	> 0.9999	1.15	0.05	0.0462 *	1.61	0.04	< 0.0001	**
cdk6	1	0.07	> 0.9999	0.97	0.04	> 0.9999	1.04	0.02	> 0.9999	1.14	0.05	0.2829	1.14	0.10	0.2548	1.28	0.11	0.0061	**

One-way ANOVA *p < 0.05, **p < 0.01 vs control (0h)

3.3.2 小括

Compound 6 は、神経芽腫 (LA-N-1、NB-39) に対して細胞傷害活性を示した。また、正常細胞と比較しても、神経芽腫細胞に選択的な細胞傷害活性を示した。Hoechst 33342 染色法により、compound 6 の刺激によって低濃度においても核の凝集が認められ、アポトーシスを誘導していることが認められた。また、核酸染色 (PI 染色法) による細胞周期解析から、compound 6 の作用によって S 期の減少、G₀/G₁ 期での停止作用が認められた。タンパク質解析によって、8 h 以降に Cyclin D の減少、Rb-E2F の遊離抑制により、G₀/G₁ 期での停止作用が示唆された。更に、48 h 以降に caspase-3、caspase-7 の活性及び PARP の切断によりアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

3.3.3 考案

本研究で用いた chalcone 配糖体は、メトキシ基を有する化合物に比較的強い細胞傷害活性を示した。compound 5 の糖を除いた chalcone 部に肺がんに対する抗腫瘍活性⁴⁰⁾、また、本化合物の chalcone 部に類似した化合物に、さまざまな腫瘍細胞への活性報告がされていることから^{41,63)}、本化合物の活性は chalcone の構造に起因するものと考えられる。

神経芽腫細胞に選択的な活性を示した compound 6 は、優れた G₀/G₁ 期での細胞周期停止作用を有する化合物であった。Fig. 33 に示すように、細胞周期の進行には cyclin と CDK の複合体によって制御されている⁶²⁾。G₁ から S 期には cyclin D、cyclin E と CDK によって制御される。Compound 6 の作用により cyclin D の減少によって、cyclin D-CDK との複合体の形成を阻害し、G₁ 期での周期停止を誘導することが示唆された。また、p27 は cyclin E-CDK との複合体の結合によって不活化させ、進行を止める働きをする⁶⁴⁾。本研究において p27 の発現増加から cyclin E-CDK の活性を阻害することが示唆される。また cyclin D-CDK 及び cyclin E-CDK は、S 期移行への転写因子の制御に関わる Rb のリン酸化を促進する。Rb は S 期への転写因子 (E2F) と結合しており、Rb をリン酸化することによって E2F を遊離し S 期へ進行する^{62,65)}。本研究では compound 6 作用により、リン酸化 Rb、E2F の発現を有意に減少した。以上のことから、cyclin D-CDK、cyclin E-CDK の活性抑制により Rb リン酸化を抑制し、Rb からの転写因子 (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。

更に、細胞の形態変化及び FCM による解析によって、compound 6 は、神経芽腫細胞に対しアポトーシスを誘導することが明らかとなった。Caspase-3、-7 において cleaved 型の増加が 72 h にて認められ、またアポトーシスの指標となる PARP は、切断型である cleaved PARP が有意に増加したことから、compound 6 は caspase を介したアポトーシス細胞死を誘導することが示唆された。Western blot により経時的な解析から 8~48 h にかけて細胞周期停止を誘導し、かつ 72 h 以降にアポトーシス細胞死を誘導する化合物であることが明らかとなった。

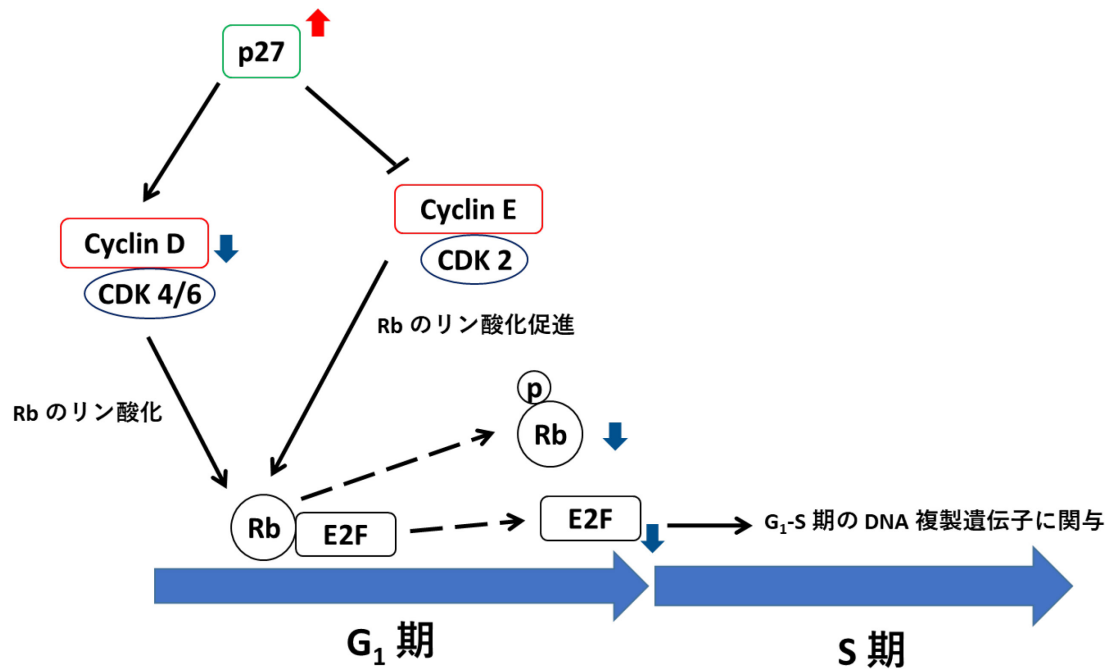


Fig. 33 Cell cycle arrest mechanism of compound 6

4. 総括

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出した。

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示された。そのメカニズムとして、核内での AIF の増加及び PARP の断片化による細胞死であることが分かった。

Burchellin 誘導体 (compound 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。更に、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。

Chalcone 配糖体 (compound 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。Compound 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。更に、caspase-3、-7 の活性及び 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分かった。

以上のことから、本研究より見出した上記 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。

謝 辞

本研究に際し、終始懇切なるご指導ご鞭撻を賜りました、指導教員である日本大学薬学部臨床医学研究室 鈴木孝教授に厚く御礼申し上げます。

本論文を作製、審査に際して、貴重な御指導と御助言を賜りました日本大学薬学部臨床医学研究室 小野真一教授、生化学研究室 小林俊亮教授に深く感謝致します。また、有益な御助言を賜りました日本大学薬学部臨床医学研究室 浅見覚准教授に深く感謝いたします。

研究に試料を提供して頂いた他、御協力を賜りました、日本大学薬学部有機化学研究室 宮入伸一教授、内山武人教授、日本大学理工学部生物資源化学研究室 仁科淳良教授、岐阜大学工学部 瀬瀬守教授に感謝致します。

研究に御助言、御協力頂いた、日本大学薬学部 齋藤弘明専任講師、野伏康仁助教、牧野三津子博士、日本大学薬学部臨床医学研究室に在籍した多くの卒業研究生に感謝致します。本学部進学にあたり、理工学部時代からお世話になっている日本大学理工学部 浮谷基彦准教授、深津誠教授、東京理科大学総合研究院 秋久俊博客員教授に感謝致します。

最後に、私の我儘を許し、研究生生活を支えてくれた家族に感謝します。

参考文献

- 1) Smith M.A., Seibel N.L., Altekruise S.F., Ries L.A., Melbert D.L., O'Leary M., Smith F.O., Reaman G.H., Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century. *J. Clin. Oncol.*, **28** 2625–34 (2010).
- 2) Maris J.M., Hogarty M.D., Bagatell R., Cohn S., Neuroblastoma. *Lancet*, **369** 2106–20 (2007).
- 3) Brodeur G.M., Pritchard J., Berthold F., Carlsen N.L., Castel V., Castelberry R.P., De Bernardi B., Evans A.E., Favrot M., Hedborg F., Kaneko M., Kemshead J., Lampert F., Lee R.E., Look A.T., Pearson A.D., Philio T., Roald B., Sawada T., Seeger R.C., Tsuchida Y., Voute P.A., Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J. Clin. Oncol.*, **11** 1466–77 (1993).
- 4) Brodeur G.M., Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer*, **3** 203–16 (2003).
- 5) Cohn S.L., Pearson A.D., London W.B., Monclair T., Ambros P.F., Brodeur G.M., Faldum A., Hero B., Iehara T., Machin D., Mosseri V., Simon T., Garaventa A., Castel V., Matthay K.K., The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J. Clin. Oncol.*, **27** 289–97 (2009).
- 6) Brodeur G.M., Seeger R.C., Gene amplification in human neuroblastomas: basic mechanisms and clinical implications. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **19** 101–11 (1986).
- 7) Brodeur G.M., Hayes F.A., Green A.A., Casper J.T., Wasson J., Wallach S., Seeger R.C., Consistent N-myc copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from sixty individual patients. *Cancer Res.*, **47** 4248–53 (1987).
- 8) Suzuki T., Bogenmann E., Shimada H., Stram D., Seeger R.C., Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, **85** 377–84 (1993).
- 9) Brodeur G.M., Maris J.M., Yamashiro D.J., Hogarty M.D., White P.S., Biology and genetics of human neuroblastomas. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, **19** 93–101 (1997).
- 10) Hiyama E., Hiyama K., Ohtsu K., Yamaoka H., Ichikawa T., Shay J.W., Yokoyama T., Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur. J. Cancer*, **33** 1932–6 (1997).
- 11) Poremba C., Hero B., Goertz H.G., Scheel C., Wai D., Schaefer K.L., Christiansen H., Berthold F., Juergens H., Boecker W., Dockhorn-Dworniczak B., Traditional and emerging molecular markers in neuroblastoma prognosis: the good, the bad and the ugly. *Klin. Padiatr.*, **213** 186–90 (2001).
- 12) Ohali A., Avigad S., Ash S., Goshen Y., Luria D., Feinmesser M., Zaizov R., Yaniv I., Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma. *Cancer*, **107** 1391–9 (2006).
- 13) Kaneko M., Tsuchida Y., Uchino J., Takeda T., Iwafuchi M., Ohnuma N., Mugishima H., Yokoyama J., Nishihira H., Nakada K., Sasaki S., Sawada T., Kawa K., Nagahara N., Suita S., Sawaguchi S., Treatment results of advanced neuroblastoma with the first Japanese study group protocol. Study

- Group of Japan for Treatment of Advanced Neuroblastoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, **21** 190–7 (1999).
- 14) Matthay K.K., Reynolds C.P., Seeqer R.C., Stram D.O., Harris R.E., Ramsay N.K., Swift P., Shimada H., Black C.T., Brodeur G.M., Gerbing R.B., Reynolds C.P., Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *N. Engl. J. Med.*, **341** 1165–73 (1999).
 - 15) Matthay K.K., Reynolds C.P., Seeqer R.C., Shimada H., Adkins E.S., Haas-Kogan D., Gerbing R.B., London W.B., Villablanca J.G., Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J. Clin. Oncol.*, **27** 1007–13 (2009).
 - 16) Mosse Y.P., Deyell R.J., Berthold F., Nagakawara A., Ambros P.F., Monclair T., Cohn S.L., Pearson A.D., London W.B., Matthay K.K., Neuroblastoma in older children, adolescents and young adults: a report from the international neuroblastoma risk group project. *Pediatr. blood Cancer*, **61** 627–35 (2014).
 - 17) Berthold F., Booa J., burdach S., Erttmann R., Henze G., Hermann J., Klingebiel T., kremens B., Schilling F.H., Schrappe M., Simon T., Hero B., Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.*, **6** 649–58 (2005).
 - 18) D'Angio G.J., Evans A.E., Koop C.E., Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis. *Lancet*, **22** 1046–9 (1971).
 - 19) Nickerson H.J., Matthay K.K., Seeger R.C., Brodeur G.M., Shimada H., Perez C., Atkinson J.B., Selch M., Gerbing R.B., Stram D.O., Luken J., Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a children's cancer group study. *J. Clin. Oncol.*, **18** 477–86 (2000).
 - 20) Ikeda H., Hirato J., Akami M., Suzuki N., Takahashi A., Kuroiwa M., Matsuyama S., Massive apoptosis detected by in situ DNA nick end labeling in neuroblastoma. *Am. J. Surg. Pathol.*, **20** 649–55 (1996).
 - 21) van Noesel M.M., Neuroblastoma stage 4S: a multifocal stem-cell disease of the developing neural crest. *Lancet Oncol.*, **13** 299–30 (2012).
 - 22) Hossel R., Leclerc S., Endicott J.A., Nobel M.E., Lawrie A., Tunnah P., Leost M., Damiens E., Marie D., Marko D., Niederberger E., Tang W., Eisenbrand G., Meijer L., Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.* **1** 60–7 (1999).
 - 23) Kameswaran T.R., Ramanibai R., Indirubin-3-monooxime induced cell cycle arrest and apoptosis in Hep-2 human laryngeal carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother.*, **63** 146–154 (2009).
 - 24) Kim S.A., Kim S.W., Chang S., Yoon J.H., Ahn S.G., 5'-nitro-indirubinoxime induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human KB oral carcinoma cells. *Cancer Lett.*, **274** 72–77 (2009).
 - 25) Nicolaou K.A., Liapis V., Evdokiou A., Condtantinou C., Magiatis A.L., Skaltsounis A.L., Koumas L.,

- Costeas P.A., Constantinou A.I., Induction of discrete apoptotic pathways by bromo- substituted indirubin derivatives in invasive breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **425** 76–82 (2012).
- 26) Yoon H.E., Kim S.A., Choi H.S., Ahn M.Y., Toon J.H., Ahn S.G., Inhibition of Plk1 and Pin1 by 5'-nitro-indirubinoxime suppresses human lung cancer cells *Cancer Lett.*, **316** 97–104 (2012).
- 27) Song J.H., Lee J.E., Cho K.M., Park S.H., Kim H.J., Kim Y.C., Kim T.S., 5-Diphenylacetamido-indirubin-3'-oxime as a novel mitochondria-targeting agent with anti-leukemic activities. *Mol. Carcinog.* **55** 611–21 (2016).
- 28) Leclerc S., Garnier M., Hoessel R., Marko D., Bibb J.A., Snyder G.L., Greengard P., Biernat J., Wu Y.Z., Mandelkow E.M., Eisenbrand G., Meijer L., Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J. Biol. Chem.*, **276** 251–60 (2001).
- 29) Meijer L., Skaltsounis A.L., Magiatis P., Magiatis P., Polychronopoulos P., Knockaert M., Leost M., Ryan X.P., Vonica C.A., Brivablou A., Dajani R., Crovace C., Tarricone C., Nusacchio A., Roe S.M., Pearl L., Greengard P., GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem. Biol.*, **10** 1255–1266 (2003).
- 30) Liao X.M., Leung K.N., Indirubin-3'-oxime induces mitochondrial dysfunction and triggers growth inhibition and cell cycle arrest in human neuroblastoma cells. *Oncol. Rep.*, **29** 371–9 (2013).
- 31) Saito H., Tabata K., Hanada S., Kanda Y., Suzuki T., Miyairi S., Synthesis of methoxy- and bromo-substituted indirubins and their activities on apoptosis induction in human neuroblastoma cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21** 5370–3 (2011).
- 32) Lima O.A., Gottlieb O.R., Magalhaes M.T., Burchellin, a neolignan from *Aniba burchellii*. *Phytochemistry*, **11** 2031–7 (1972).
- 33) Cabral M.M., Azambuja P., Gottlieb O.R., Kleffmann T., Garcia E.S., Schaub G.A., Burchellin: effect on *Triatoma infestans* and on *Trypanosoma cruzi* within this vector. *Parasitol. Res.*, **87** 730–5 (2001).
- 34) Ma W.W., Kozlowski J.F., McLaughlin J.L., Bioactive neolignans from *Endlicheria dysodantha*. *J. Nat. Prod.*, **54** 1153–8 (1991).
- 35) Uchiyama T., Tabata K., Nomura S., Kaneko Y., Suzuki T., Induction of apoptosis in human leukemia cell (Jurkat) by neolignans isolated from seeds of *Licaria puchury-major*. *Biol. Pharm. Bull.*, **32** 1749–53 (2009).
- 36) Hayama T., Tabata K., Uchiyama T., Fujimoto Y., Suzuki T., Ferrearin C induces apoptosis via hemoxygenase-1 (HO-1) induction in neuroblastoma. *J. Nat. Med.*, **65** 431–9 (2011).
- 37) Hara H., Nakamura Y., Ninomiya M., Mochizuki R., Kamiya T., Aizenman E., Koketsu M., Adachi T., Inhibitory effects of chalcone glycosides isolated from *Brassica rapa* L. 'hidabeni' and their synthetic derivatives on LPS-induced NO production in microglia. *Bioorg. Med. Chem.*, **19** 5559–68 (2011).
- 38) Hara H., Ikeda R., Ninomiya M., Kamiya T., Koketsu M., Adachi T., Newly synthesized 'hidabeni'

- chalcone derivatives potently suppress LPS-induced NO production via inhibition of STAT1, but not NF- κ B, JNK, and p38, pathways in microglia. *Biol. Pharm. Bull.*, **37** 1042–9 (2014).
- 39) Itoh T., Ninomiya M., Nozawa Y., Koketsu M., Chalcone glycosides isolated from aerial parts of *Brassica rapa* L. 'hidabeni' suppress antigen-stimulated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *Bioorg. Med. Chem.*, **18** 7052–7 (2010).
- 40) Warmka J.K., Solberg E.L., Zeliadt N.A., Srinivasan B., Charlson A.T., Xing C., Waattenberg E.V., Inhibition of mitogen activated protein kinases increases the sensitivity of A549 lung cancer cells to the cytotoxicity induced by a kava chalcone analog. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **424** 488–92 (2012).
- 41) Zoldakova M., Kormyei Z., Brown A., Biersack B., Madarász E., Schobert R., Effects of a combretastatin A4 analogous chalcone and its Pt-complex on cancer cells: A comparative study of uptake, cell cycle and damage to cellular compartments. *Biochem. Pharmacol.*, **80** 1487–96 (2010).
- 42) Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G., Gorczyca W., Hotz M.A., Lassota P., Traganos F., Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, **13** 795–808 (1992).
- 43) Bedner E., Li X., Gorczyca W., Melamed M.R., Darzynkiewicz Z., Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry*, **35** 181–95 (1999).
- 44) Takita J., Yang H.W., Chen Y.Y., Hanada R., Yamamoto K., Teitz T., Kidd V., Hayashi Y., Allelic imbalance on chromosome 2q and alteration of the caspase-8 gene in neuroblastoma. *Oncogene*, **20** 4424–32 (2001).
- 45) Teitz T., Lahti J.M., Kidd V.J., Aggressive childhood neuroblastoma do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *J. Mol. Med.*, **79** 428–36 (2001).
- 46) Hopkins-Donaldson S., Bodmer J.L., Bourlout K.B., Brognara C.B., Tschopp J., Gross N., Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res.*, **60** 4315–9 (2000).
- 47) Mita A.C., Mita M.M., Nawrocki S.T., Giles F.J., Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin. Cancer Res.*, **14** 5000–5 (2008).
- 48) Pavlyukov M.S., Antipova N.V., Balashova M.V., Vinogradova T.V., Kopantzev E.P., Shakhparonov M.I., Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation. *J. Biol. Chem.*, **286** 23296–307(2011).
- 49) Soldani C., Scovassi A.I., Poly (ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis*, **7** 321–8 (2002).
- 50) Virág L., Robaszekiewicz A., Rodriguez-Vargas J.M., Oliver F.J., Poly (ADP-ribose) signaling in cell death. *Mol. Aspects Med.*, **34** 1153–67 (2013).
- 51) Fehlberg S., Trautwein S., Göke A., Göke R., Bisphenol A diglycidyl ether induces apoptosis in tumour cells independently of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, in caspase-dependent and -

- independent manners. *Biochem. J.*, **362** 573–8 (2002).
- 52) Fehlbeg S., Gregel C.M., Göke A., Göke R., Bisphenol A diglycidyl ether-induced apoptosis involves Bax/Bid dependent mitochondrial release of apoptosis-inducing factor (AIF), cytochrome c and Smac/DIABLO. *Br. J. Pharmacol.*, **139** 495–500 (2003).
- 53) Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G., Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397** 441–446 (1999).
- 54) Cabon L., Galán-Malo P., Bouharrour A., Delavallée L., Brunelle-Navas M.N., Lorenzo H.K., Gross A., Susin S.A., BID regulates AIF-mediated caspase-independent necroptosis by promoting BAX activation. *Cell Death Differ.*, **19** 245–256 (2012).
- 55) Chen Y., Takita J., Choi Y.L., Kato M., Ohira M., Sanada M., Wang L., Soda M., Kikuchi A., Igarashi T., Nakagawara A., Hayashi Y., Mano H., Ogawa S., Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*, **455** 971–4 (2008).
- 56) Ogawa S., Takita J., Sanada M., Hayashi Y., Oncogenic mutation of *ALK* in neuroblastoma. *Cancer Sci.*, **102** 302–8 (2010).
- 57) Janoueix-Lerosey I., Lequin D., Brugières L., Ribeiro A., de Pontual L., Combaret V., Raynal V., Puisieux A., Schleiermacher G., Pierron G., Valteau-Couanet D., Frebourg T., Michon J., Lyonnet S., Amiel J., Delattre O., Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*, **455** 967–70 (2008).
- 58) Osajima-Hakomori Y., Miyake I., Ohira M., Nakagawara A., Nakagawa A., Sakai R., Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am. J. Pathol.*, **167** 213–22 (2005).
- 59) Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E., Cellular survival: a play in three Akts. *Genes. Dev.*, **13** 2905–27 (1999).
- 60) Lu, Z., Xu, S., ERK 1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life*, **58** 621–31 (2006).
- 61) Yu, H., Pardoll, D., Jove, R., STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer*, **9** 798–809 (2009).
- 62) Golias C.H., Charalabopoulos A., Charalabopoulos K., Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int. Clin. Pract.*, **58** 1134–41 (2004).
- 63) Srinivasan B., Johnson T.E., Lad R., Xing C., Structure-Activity Relationship Studies of Chalcone Leading to 3-Hydroxy-4,3',4',5'-tetramethoxychalcone and Its Analogues as Potent Nuclear Factor KB Inhibitors and Their Anticancer Activities. *J. Med. Chem.*, **52** 7228–35 (2009).
- 64) Xu X., Nakano T., Wick S., Dubay M., Brizuela L., Mechanism of Cdk2/Cyclin E inhibition by p27 and p27 phosphorylation. *Biochemistry*, **38** 8712–22 (1999).
- 65) Goodrich D.W., Wang N.P., Qian Y.W., Lee E.Y., Lee W.H., The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell*, **67** 293–302 (1991).

原著論文

Masahiro Kurita, Satoshi Hanada, Yoshimi Ichimaru, Hiroaki Saito, Keiichi Tabata, Satoru Asami, Shinichi Miyairi, Takashi Suzuki. Indirubin 3'-Epoxide Induces Caspase-Independent Cell Death in Human Neuroblastoma, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **39** 993–999 (2016).

Masahiro Kurita, Tomomi Takada, Noriko Wakabayashi, Satoru Asami, Shinichi Ono, Taketo Uchiyama, Takashi Suzuki. Antitumor effect of burchellin derivatives against neuroblastoma, *Anticancer research*, **38** 855–862 (2018).