

—平成18年度 岐阜薬科大学特別研究費（プロジェクト）—

## 新規合成レチノイドを使った新しい大腸癌予防・治療法の開発

研究代表者：酒々井真澄

分担研究者：永澤秀子

## 1. 緒言

ビタミン A とその誘導体はレチノイドと呼ばれており、近年抗癌物質として注目され多くの研究がなされてきた。天然型あるいは合成レチノイドは急性前骨髄球性白血病・頭頸部扁平上皮癌・乳癌等での有効性が証明されている<sup>(1)</sup>。非環式レチノイド(acyclic retinoid, ACR)は6員環が開いたユニークな化学構造を持つ。ACR は副作用を惹起することなく肝癌治療後の再発を有意に抑制することが臨床試験で証明されている<sup>(2,3)</sup>。ACR の詳細な作用機序については不明な点が多かったが、申請者らは ACR が細胞周期を調節する分子や核内受容体に作用することによりヒト癌細胞の増殖を抑制すること、アポトーシスを誘導することなどを突き止めた<sup>(4-6)</sup>。ACR の持つこれらの作用を考慮すると ACR は単独あるいは他の薬剤との併用により様々な癌腫の予防や治療に有効であると考えられた。大腸癌は発生頻度の高い癌であるが外科的切除後の再発予防に関して有効なレジメンは確立していない。ACR の優れた特性は長期投与でも副作用が極めて少ないという点であり、作用機序を考慮すると ACR は大腸発癌抑制にも有効であると考えられる。この仮説を検証するために申請者らは動物および細胞レベルでの実験を設定し予備実験を行った。ACR は発癌剤で誘発したラット大腸前癌病変の発生を抑制しアポトーシスの頻度を増加させた<sup>(7)</sup>。さらに、ACR はヒト大腸癌細胞株の増殖を抑制し細胞周期関連分子の発現に影響すること、ヒト肝癌細胞株において sulindac 誘導体との併用相乗的増殖抑制効果を示すことを明らかにした<sup>(8-10)</sup>。さらに注目すべきは、申請者らが新たに合成したベンゾトリアジン化合物のいくつかは低酸素状態で活性化される転写因子 HIF1 $\alpha$ に作用して血管新生抑制作用を持つことである<sup>(11-15)</sup>。この様な背景により、本研究では ACR の大腸発癌抑制効果と他の新規化合物との併用効果の検討を目的とする。さらに、これらの化合物の分子修飾を検討し構造活性相関を解析することにより生物活性におけるファルマコホアを抽出し大腸癌予防・治療に有用な新規活性物質の創製をめざす。

## 2. 材料と方法

2.1. 化合物と培養条件：ACR(Fig. 1A)は株式会社興和創薬より提供されたものを以下の実験に使用し、ベンゾトリアジン化合物 TX402(Fig. 1B)とその誘導体は永澤が合成したものを使用した。基本培地は DMEM(Sigma Chemical Co, USA)に 5% fetal bovine serum(FBS)を加えたものを使用した。

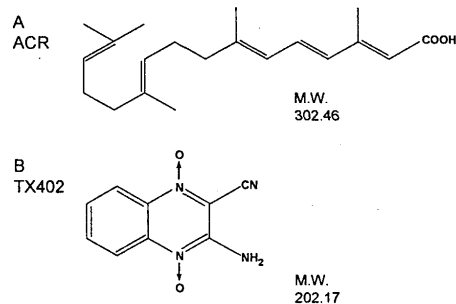


Fig.1 Structures of (2E, 4E, 6E, 10E)-3, 7, 11, 15-tetramethyl-2, 4, 6, 10, 14, hexadeca-pentaenoic acid (acyclic retinoid, ACR, NIK333) and 3-amino-2-quinoxalinecarbonitrile 1,4-dioxide (TX402)

2.2. ACR による家族性大腸腺腫症モデル動物(Min マウス)の腫瘍発生抑制作用の検討：動物実験は岐阜大学医学部動物実験施設にて実施した。同大学動物委員会の許可を得た後、国際的な動物愛護と実験のガイドラインに従って動物実験を行った。5 週齢 Min マウス(雄および雌)を使用し以下の実験群(各群 4-5 匹)を設定した。第 1 群：基礎食(CE2)のみにて実験開始より終了まで飼育、第 2 群：50 ppm ACR 混餌食にて実験終了まで飼育、第 3 群：150 ppm ACR 混餌食にて実験終了まで飼育、実験開始後 12 週目と 13 週目に動物を安楽死させ小腸・大腸に発生した腫瘍の数・サイズ・位置等を観察した。同時に野生型マウス(C57BL/6J)に関しても同様の実験プロトコールにて実験を行った。

2.3 ACR と TX402 誘導体による血管新生阻害作用の検討：鶏卵漿尿膜(CAM)法を用いて ACR と TX2098 の *in vivo* における血管新生阻害作用を検討した。

**2.4 TX402 のヒト大腸癌細胞株に対する増殖抑制効果と細胞周期に及ぼす影響の解析**：ヒト大腸癌細胞株 (HCT116, HT29) に各濃度の TX402 を暴露し 7 日間培養した。得られたコロニーをギムザ染色後、コロニー数を測定し増殖曲線を作成することにより増殖抑制効果を判定した。癌細胞株に各濃度の TX402 を暴露し 48 または 72 時間培養した。細胞をメタノールにて固定した後 propidium iodide (PI) で染色し FACSscan (BD Japan) にてフローサイトメトリー解析した。各細胞周期に存在する細胞数を CellQuest Pro コンピュータプログラムにて解析し、TX402 の細胞周期に与える影響を検討した。

**2.5 血管新生阻害作用を有する新規化合物の分子設計・合成および生物活性の検討**：TX402 の基本骨格である heteroaromatic N-oxide に種々の hydroxyalkylamino 基を導入した誘導体を設計し低酸素細胞毒性と HIF-1 $\alpha$  に対する抑制効果および血管新生抑制作用について検討した。

### 3. 結果

**3.1 ACR による Min マウス消化管における腫瘍発生抑制効果**：実験開始より終了までの期間において各群間の混餌食の摂取量に有意な差を認めなかった。ACR 投与群 (第 2, 3 群) ではコントロール群 (第 1 群) に比べて腫瘍数が有意に減少していた ( $P < 0.05$ )。腫瘍径も第 2, 3 群共に第 1 群よりも有意に縮小していた ( $P < 0.05$ )。腫瘍数・サイズ共に ACR の用量依存性の抑制効果がみられた。野生型に関しては各群に腫瘍発生は認めなかった。

**3.2 ACR による血管新生抑制作用**：レチノイド誘導体はいずれも血管新生抑制作用を示した。抑制率はそれぞれ all-trans retinoic acid 93% (40 ng)、13-cis retinoic acid 60% (100 ng)、ACR 67% (100 ng)、34% (40 ng) であった。

**3.3 TX402 のヒト大腸癌細胞株に対する増殖抑制効果と細胞周期に及ぼす影響**：TX402 は HT29 と HCT116 細胞株に対し濃度依存性の増殖抑制作用を示した。HT29 と HCT116 における IC<sub>50</sub> はそれぞれ 20, 60  $\mu$ M であった。各細胞株に 200  $\mu$ M TX402 を暴露し 72 時間培養したところ HCT116 株において DMSO 処理に比べ TX402 処理では G2/M 期の細胞数が有意に増加し ( $P < 0.03$ )、HT29 株では G1 期の細胞数が有意に減少した ( $P < 0.003$ )。この結果は TX402 がこれらの細胞株に対して G2/M arrest を誘導することを示している。

**3.4 血管新生抑制作用を有する新規化合物の分子設計・合成および生物活性**：合成した新規化合物の内 ethanolamino 基を有する TX2098 は低酸素条件下において HCT116 細胞

株の増殖を抑制し低酸素における IC<sub>50</sub> は 11  $\mu$ M であった。低酸素細胞増殖抑制効果に関して TX2098 はリード化合物 TX402 に比べて 2 倍以上強い効果を示し、HIF-1 $\alpha$  タンパク質発現を濃度依存的に抑制した。さらに CAM 法において 5  $\mu$ g/CAM 以上の濃度で血管新生抑制作用を示した。

### 4. 考察

私達は ACR の経口投与が自然発生の消化管腫瘍を抑制すること、TX402 がヒト大腸癌細胞株の増殖を抑制し G2/M arrest を引き起こすことを明らかにした。予備実験で ACR は化学発癌剤により誘発した大腸前癌病変の発生を有意に減少させた。これらの所見は ACR が大腸発癌抑制作用を有することを示している。さらに、私達は TX402 をリード化合物として新規の誘導体を設計・合成した。その内 TX2098 はヒト大腸癌細胞に対する増殖抑制効果と HIF1 $\alpha$  抑制作用および血管新生抑制作用を有することを確認した。また構造活性相関の結果、TX402 の基本骨格の内 N-dioxide 基が生物活性に深く関与していることが示唆された。これらの実験事実は ACR と TX402 およびその誘導体が新たな大腸癌治療や予防のレジメン構築のための有用な薬剤となる可能性を示唆している。現在、私達は ACR の大腸発癌抑制に関する分子作用機序、ACR と TX402 の併用効果および TX402 誘導体の標的分子と構造活性相関に関する詳細な解析を継続中である。

### 5. 文献

- 1) Altucci L et al, Nat Rev Cancer, **2001**, 1, 181
- 2) Muto Y et al, N Engl J Med, **1996**, 334, 1561
- 3) Muto Y et al, N Engl J Med, **1999**, 340, 1046
- 4) Suzui M et al, Cancer Res, **2002**, 62, 3997
- 5) Suzui M et al, Mol Cancer Ther, **2004**, 3, 309
- 6) Shimizu M et al, Clin Cancer Res, **2004**, 10, 1130
- 7) Suzui M et al, 97<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington DC, USA, **2006**
- 8) Suzui M et al, Int J Oncol, **2006**, 28, 1193
- 9) Shimizu M et al, Clin Cancer Res, **2004**, 10, 671.
- 10) Suzui M, In: Tanaka T (ed) Anticancer and chemopreventive effects of acyclic retinoid, Cancer: Disease Progression and chemoprevention, Research Signpost, Kerala, in press
- 11) Masunaga S et al, J Cancer Res Clin Oncol, **2007**, 133, 47
- 12) Nagasawa H et al, 20<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry and Molecular biology, Kyoto, Japan **2006**
- 13) Nagasawa H et al, Biol Pharm Bull, **2006**, 26, 2335
- 14) Miyoshi A et al, Int J Oncol **2006**, 29, 1533
- 15) Nagasawa H et al, Anticancer Res, **2003**, 23, 4427