

学位論文題名

新規 DNA トポイソメラーゼ I, II 阻害剤の
活性及び阻害機構の研究

学位論文内容の要旨

真核細胞のDNA トポイソメラーゼは DNA の高次構造を制御することで複製、転写の進行にかかわる酵素で、スーパーコイル型の DNA をリラックスさせる働きを持つ。トポイソメラーゼは DNA のリンキングナンバーを” 1” ずつ変化させる I 型 (トポイソメラーゼ I = トポ I) と” 2” ずつ変化させる II 型 (トポイソメラーゼ II = トポ II) に分類されるが、いずれも癌の化学療法の重要な標的酵素となっている。私は抗腫瘍薬剤として有用な物質を創製すべく天然物及び合成化合物の中からトポイソメラーゼ阻害物質をスクリーニングし、以下に示す 3 種の新規制癌物質を見だし、これらの新規化合物のトポイソメラーゼ阻害効果とその阻害機構及び抗腫瘍効果を明らかにした。

新規インドロカルバゾール系化合物 ED-110 のトポイソメラーゼ I 阻害効果

ED-110 は放線菌培養上清中より見いだされた新規インドロカルバゾール系物質 BE-13793C にグルコースを導入した半合成化合物である。ED-110 はトポ I を介した DNA 1 本鎖切断を濃度依存性に促進した。またエチジウムブロマイドの DNA 結合阻害実験、及び DNA 巻き戻し実験の結果から、ED-110 には DNA インターカレーション活性が認められた。ED-110 はトポ I の DNA relaxation 活性を 10 μ M で完全に阻害したが、前述の DNA インターカレートによる環状 DNA の構造変化が顕著になるのもこの濃度領域であり、正確な DNA relaxation 阻害濃度は決定されなかった。

ED-110 は P388 マウス白血病培養細胞内の cleavable complex の形成を濃度依存的に促進し、トポ I 阻害剤カンプトテシンと同等の効果を示した。ED-110 はトポ I 阻害作用から予想されたとおり、P388 細胞の核酸合成を阻害し、更にフローサイトメトリーによる細胞周期の解析で G2 期へと蓄積することが明かとなった。また、ED-110 は 10 日間連続腹腔内投与によって P388 を腹腔内接種したマウスの生存日数を 3 倍以上延長させる抗腫瘍効果を示した。

新規キノロン系化合物 BO-2367 のトポイソメラーゼ II 阻害効果

原核細胞の II 型トポイソメラーゼである DNA ジャイレース阻害剤の中に、真核細胞のトポ II を阻害して抗腫瘍効果を示す物質があるのではないかと考え、合成キノロン化合物からスクリーニングを行なった。その結果、シプロフロキサシンの C-7, C-8 位置換体、BO-2367 にトポ II 阻害効果を見いだした。更に BO-2367 の C-7 位 (-) 異性体である (-)BO-2367 に強い阻害効果が認められた。

キノロン系抗菌剤として知られるノルフロキサシン、シプロフロキサシンは細菌の DNA ジャイレースの DNA supercoiling 活性は阻害したが、L1210 マウス白血病細胞より精製したトポ II の DNA relaxation 活性は阻害しなかった。一方、(-)BO-2367 は DNA ジャイレースとト

ポ II の両者を強く阻害した。(-)BO-2367 はトポ II を介した DNA 2 本鎖切断を誘導したことから、その阻害機構は DNA とトポ II の共有結合性複合体 (cleavable complex) の安定化によると考えられた。(-)BO-2367 を作用させた L1210 細胞内には、cleavable complex が形成され、細胞内の DNA は二本鎖で切断された。また、(-)BO-2367 は 10 日間連続腹腔内投与によって L1210 を腹腔内接種したマウスの生存日数を最高 2.36 倍まで延長させたが、有効濃度域の広さは既存のトポ II 阻害剤 VP-16 が優れていた。

(+)BO-2367 の II 型トポ阻害効果、細胞増殖阻害効果、マウス実験腫瘍における抗腫瘍効果は (-)BO-2367 より 5~100 倍弱く、C-7 位の置換基の立体構造がトポ II 阻害効果に重要な役割を果たしていることが示唆された。

新規デブシペプチド BE-22179 のトポイソメラーゼ II 阻害効果

放線菌培養液中より見いだされた新規物質 BE-22179 はデブシペプチド構造を有し、その全体構造はキノキサリン系抗生物質に類似している。しかし環状ペプチド鎖の中にチオエステル結合を有する点や、クロモフォアとして 3-ヒドロキシキノリンを有する点など性質を異にする部分もある。構造上の類似性からキノキサリン系抗生物質の一つ、エキノマイシンと対比しながら BE-22179 のトポ II 阻害機構を検討した。

BE-22179 は DNA にインターカレートして DNA 巻き戻し効果を示す濃度よりはるかに低い濃度で、トポ II による DNA relaxation を選択的に阻害した。また BE-22179 の阻害効果は酵素濃度に依存的であった。一方エキノマイシンによるトポ II の DNA relaxation 阻害活性は添加したトポ II の量に左右されず、DNA 巻き戻し効果を示す濃度と一致していたことから、エキノマイシンの DNA relaxation 阻害効果は、見かけ上の阻害であり、トポ II 阻害効果は BE-22179 にのみ認められる作用であった。また、その活性には 3-ヒドロキシキノリンの水酸基が大きな働きをしていた。BE-22179 のトポ II を介した 2 本鎖切断の誘導および細胞内 cleavable complex の形成はごく僅かで BE-22179 のトポ II 阻害機構は cleavable complex の形成とは異なることが示唆された。

BE-22179 は L1210 細胞の増殖阻害し、更に L1210 を腹腔内接種したマウスの生存日数を最高 2.94 倍まで延長させる抗腫瘍効果を示したがトポ II の阻害がこの抗腫瘍効果にどの程度反映されているかは不明であった。

結語

異なる活性測定方法を組み合わせることによって、トポ I, II それぞれに特異的な新規の阻害物質を見だし、更にその作用機構を解明することによって以下の知見を得た。

- (1) 新規インドロカルバゾール系化合物 ED-110 が DNA インターカレーターであり、トポ I 依存性に DNA 1 本鎖切断を誘導することを明らかにし、トポ I 阻害剤に新しい基本構造を提供した。
- (2) 新規キノロン系化合物 (-)BO-2367 がトポ II を阻害して抗腫瘍効果を示すことを発見し、特に C-7 位の立体構造がその活性に大きく関与していることを光学異性体の検討から明らかにした。
- (3) 新規デブシペプチド BE-22179 が cleavable complex を形成せずにトポ II を特異的に阻害することを見出した。

この研究は抗腫瘍性トポイソメラーゼ阻害剤に新規な基本構造を提供するとともに、トポ I、トポ II が担っている生理的役割とその作用機構解明のための有用な手段を与えたと考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	大塚	栄子
副査	教授	松田	彰
副査	助教授	井上	英夫
副査	助教授	周東	智

学位論文題名

新規 DNA トポイソメラーゼ I, II 阻害剤の 活性及び阻害機構の研究

申請者はDNAトポイソメラーゼ I, II の阻害剤を天然物および合成化合物中に見出すべく研究を行って来たが今回新規阻害剤について特異性, 作用点, 阻害機構を明らかにした。

DNAトポイソメラーゼはDNAの高次構造を制御することで複製, 転写の進行に深くかかわる酵素でありスーパーコイル型のDNAをリラックスさせる働きを持つ。トポイソメラーゼはDNAのリンキングナンバーを”1”ずつ変化させるタイプ I (トポイソメラーゼ I)と”2”ずつ変化させるタイプ II (トポイソメラーゼ II) に分類されるが, いずれも癌の化学療法 of 重要な標的酵素となっている。

申請者はまず新規インドロカルバゾール系物質ED-110 のトポイソメラーゼ I 阻害効果について検討した。

トポイソメラーゼ II を阻害する抗腫瘍物質には数多くの化合物が報告されているのに対し, トポイソメラーゼ I

の特異的阻害剤の報告は少なく、そのほとんどがカンプトテシンを基本骨格とした誘導体である。カンプトテシンはDNAとトポイソメラーゼ I との共有結合性複合体（クリーバブル コンプレックス）を安定化することによってトポイソメラーゼ I を阻害することが知られている。そこで全く新しい基本構造を持ったトポイソメラーゼ I 阻害剤を探すべく培養細胞内のクリーバブル コンプレックスを増加させる物質をスクリーニングしたところ、

Streptoverticillium mobaraense 類似の放射菌(BA13793)培養上清中に新規インドロカルバゾール系物質BE-13793Cを見だし、Ehrlich腹水癌に対して抗腫瘍効果を示すことを確認した。更にこの物質にグルコースを導入した誘導体ED-110 がより強力な クリーバブル コンプレックス安定化作用および抗腫瘍効果を示したため ED-110 のトポイソメラーゼに対する効果を詳細に検討し、” DNAインターカレータートポイソメラーゼ阻害剤”であることを明らかにした。

次に、新規キノロン系化合物 (-) BO-2367 のトポイソメラーゼ II 阻害効果及び抗腫瘍効果を調べた。キノロン系化合物は原核細胞のタイプ II トポイソメラーゼであるDNAジャイレースを阻害する抗菌剤として広く開発、応用されてきた。演者はこれらキノロン系化合物の中に真核細胞のトポイソメラーゼ II を阻害するものがあるのではないかと考え、新たに合成されたキノロン系化合物のトポイソメラーゼ II 阻害活性を調べたところ、シプロフロキサシンのC7,C8位置換体、BO-2367が強力な阻害効果を示すこ

とを発見した。更にBO-2367を光学分割しC7位光学異性体(-)BO-2367(Fig.4b)および(+)BO-2367の活性を比較検討した。L1210細胞に(-)BO-2367を作用させると、細胞内の蛋白結合性DNAの量が濃度依存的に増加し、細胞レベルでのクリーバブルコンプレックス形成が確認された。またこの時、細胞内のDNAが2本鎖切断されて短いフラグメントとなっているのがパルスフィールド・ゲル電気泳動にて検出された。

さらに、新規オクタ・サイクリック・デプシペプチドBE-22179のトポイソメラーゼII阻害効果について解析を行った。多くのトポイソメラーゼ阻害剤がクリーバブルコンプレックスの安定化という阻害機構を有する一方、クリーバブルコンプレックスを形成せずにトポイソメラーゼの触媒作用(DNAリラックス活性)を直接阻害する物質が近年報告されているのでトポイソメラーゼIIのDNAリラックス活性を指標に阻害剤のスクリーニングを行ったところ、強力なDNAリラックス阻害を示し、かつクリーバブルコンプレックス形成能の極めて弱い新規物質BE-22179が放線菌培養液中より見いだされた。BE-22179は分子量1060のオクタ・サイクリック・デプシペプチドでその全体構造はキノキサリン系抗生物質に類似していることがわかった。BE-22179は単独、あるいはトポイソメラーゼI存在下でDNAを切断せず、トポイソメラーゼIIの存在下でも2本鎖切断をごく僅かしか誘導せず、むしろVP-16によって促進されたクリーバブルコンプレックスの形成を抑制した。これらの結果から、BE-22179はクリー

バブルコンプレックスの安定化とは異なる新しい阻害機構を持ち、クリーバブルコンプレックスの形成にはむしろ抑制的に働く阻害剤であることを見出した。

以上の実験からこれらの作用点及びその阻害機構を異にするトポイソメラーゼ阻害剤は、それ自体が抗腫瘍物質として有用なだけでなく、癌の化学療法において主要なターゲットとなっているトポイソメラーゼ I, II が細胞内で担っている生理的役割やその機構を解明するための有用な手段であることを明らかにした。

この研究は博士（薬学）の学位を受けるに充分値するものと認められた。