薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
114(5) 304-307 (1994)

新規アクリジン誘導体のトポイソメラーゼ II 依存性 DNA 鎖切断活性と
マウス白血病 P388 抗がん活性

木邑道夫

京都大学医学部附属病院薬剤部

Topoisomerase II Mediated DNA Strand Cleavage and Antitumor Activities
against Murine Leukemia P388 of Novel Acridines

Michio KIMURA

Department of Pharmacy, Kyoto University Hospital, Faculty of
Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, Japan

(Received October 25, 1993)

In order to clarify the mechanism of topoisomerase II mediated DNA cleavage activity caused by intercalators (9-anilinoacridines), antitumor activities against murine P388 and calf thymus DNA topoisomerase II mediated DNA cleavage activities of compounds m-AMSA, A4P73, A3P56, and A3P166 have been studied. A4P73 was found to have potent antitumor and DNA cleavage activities.

Keywords—acridine; antitumor activity; topoisomerase II; DNA intercalation

トポイソメラーゼ I, II は, DNA トポロジー変換に必要な酵素であることから, その阻害剤は細菌に対しては抗菌剤として働き, 高等生物に対しては抗がん剤としての効力を示すものが多く見出されている.¹⁾ 現在までに, トポイソメラーゼ I 型の阻害剤としてはカンプトテシン等のアルカロイド類, II 型の阻害剤としてはアムサクリン (m-AMSA), エリプチシン, アドリアマイシン等の DNA インターカレーターが知られている.²⁾ その中でも m-AMSA は実際に臨床で使用されているものであり, 新しい作用機序の抗がん剤として注目されている.³⁾ 我々はこれまでにトポイソメラーゼ II 型阻害活性をもつ新しい抗がん活性物質の発見とその活性発現機構解明を目指して, m-AMSA 関連の新規アクリジン誘導体を種々合成し, L1210 マウス白血病に対する抗がん活性を調べてきた.⁴⁻⁷⁾ また, それらの化合物が ethidium-DNA 蛍光発現を消光させる効果についても調べ, m-AMSA より強い蛍光消光効果を示す物質を見出した.^{6,7)} さらに, その蛍光消光効果は抗がん活性と非常に良い相関を示すことも確認した.⁸⁾ m-AMSA は二重鎖切断 DNA とトポイソメラーゼ II 複合体の塩基対に結合 (インターカレーション) して DNA-阻害剤-トポイソメラーゼ II 複合体を形成し, 二重鎖切断 DNA の安定化に寄与することにより細胞毒性を発揮すると考えられている (Fig. 1).⁸⁻¹⁰⁾ また, がん細胞が正常細胞よりトポイソメラーゼ活性が高く, 切断複合体は, がん細胞において形成されやすいことも知られている.^{11,12)} 近年, 抗がん剤の耐性が問題となり, P-糖たんぱく質による多剤耐性の機構が示されている.^{13,14)} 欧米において, 本報で示した m-AMSA に関連したアクリジン誘導体は従来の抗がん剤が無効になった急性骨髄性及び, 急性リンパ性白血病の患者の治療のために使用されている. さらにその抗がん活性発現機構が従来のものとは異なっていることから m-AMSA 等のアクリジン誘導体の臨床使用が注目されている.³⁾

今回, Chart 1 に示したように m-AMSA とアクリジン環の 6-, 7- 位にメチレンジオキシ環をもった新規なアクリジン誘導体 A3P56, A3P166, A4P73 の 3 つのアクリジン誘導体を合成し, このアクリジン環に付与されたメチレンジオキシ環の分子構造上の役割を調べるため, そのマウス P388 抗がん活性とトポイソメラーゼ II 依存性 2 重鎖 DNA 切断活性を測定した. その結果, A4P73 が m-AMSA と同程度のトポイソメラーゼ II 阻害活性と抗がん活性を示すことを見出したので報告する.

実験の部

試薬 Proteinase K は Sigma 製のものを用い, その他の試薬は市販の特級品を用いた. Chart 1 に示された 4'-[9-(substituted-acridinylamino)]-methanesulfon-m-aniside (m-AMSA, A3P56, A3P166, A4P73) は文献 5, 6, 15 に記載された方法により合成した. それぞれの融点はずぎのようなものであり, 括弧内の値は文献値を示す. m-AMSA: 196—198 (197—199)°C,¹⁵⁾ また A3P56, A3P166, A4P73 は前報⁶⁾と同じ方法に従って合成した.

マウス P388 抗がん活性試験とトポイソメラーゼ II 阻害活性試験 マウス白血病細胞 P388 を用いた抗がん活性試験は前報⁶⁾の方法に従って行った. トポイソメラーゼ II 活性は文献^{16,17)}の方法に従って 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP,

0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM EDTA, 30 µg/ml bovine serum albumin, 0.4 µg pBR322 DNA, 及びウシ胸腺 DNA トポイソメラーゼ II とサンプルを混合し全量 20 µl とする. 60 分間攪拌した後, 2 µl の 5% SDS と 2.5 mg/ml の proteinase K を含む溶液を加えて反応を終結した. さらに

Fig. 1. Topoisomerase II Mediated DNA Cleavage by m-AMSA, A4P73, and A3P166

Supercoiled pBR322 DNA was treated with 100 units of topoisomerase II in the presence of drugs followed by SDS/proteinase K and then analyzed on an agarose gel: five lanes represents no drug, drugs of m-AMSA, A3P56, and A3P166, and A4P73 respectively. Drug concentrations in each lanes of four drugs were described in figure. Assay conditions are described under Materials and Methods. Banda (a) and (b) show linear DNA and supercoiled DNA respectively, which are described in details in the text.

Chart 1

60 分間 37°C で攪拌した後, 1.2% agarose gel, 89 mM Tris-borate (pH 8.3), 0.1% SDS を含む 2 mM EDTA 緩衝液を用いて SDS ゲル電気泳動を行った. 得られたゲルを ethidium bromide で染色した後, UV 照射下に写真を取り Shimazu microdensitometer で走査した.

結 果 と 考 察

Chart 1 に示した 4 つのアクリジン誘導体 m-AMSA, A3P56, A3P166, A4P73 の P388 マウス白血病細胞に対する抗がん活性とトポイソメラーゼ II 依存性 DNA 切断活性について試験を行った結果が Table I, 及び Fig. 1 に示されている. 薬物非投与群に対する m-AMSA 投与群の平均生存日数 (M.S.D.) を調べてみると著明な延命効果が認められた. 一方, 被験化合物 (A4P73, A3P166, A3P56) の延命効果は, ILS (%) の値で比較すると A4P73 は m-AMSA より弱い活性を認めた.

A3P56 と A3P166 は全く活性がないことが分かった. Table I において薬物投与後 30 日経過した時点での生き残ったマウスの数はゼロであった. さらに, 前報^{b)}により DNA-ethidium 蛍光消光効果は A4P73, m-AMSA, A3P166 の順であり, DNA 二重鎖へのインターカレーションの強さの順とは若干の差異を示している. また, トポイソメラーゼ II 依存性 DNA 切断活性を比較してみ

TABLE I. Antitumor Activity of m-AMSA, A3P56, A3P166, A4P73 against Murine P388^{a)} Leukemia

Products	Dose (mg/kg)	Mean survival d±S.D.	ILS (%)	Top II-DNA cleavage (TDC) ^{d)}
Control		9.6±0.5	0	
m-AMSA	6.25	15.2±0.8	58	≡
	12.5	18.2±3.6	90	
	25.0	17.6±1.1	80	
	50.0	20.8±2.9	117	
	100.0	22.2±9.4	131	
A3P56	6.25	9.8±0.8	2	≡
	12.5	9.8±0.4	2	
	25.0	10.0±0	4	
	50.0	9.8±0.4	2	
	100.0	10.0±0.8	6	
A3P166	6.25	9.6±0.5	0	+
	12.5	9.8±0.4	2	
	25.0	9.4±0.5	-2	
	50.0	9.4±0.5	-2	
	100.0	9.2±0.4	-4	
A4P73	6.25	10.8±0.8	13	≡
	12.5	12.0±1.4	25	
	25.0	12.4±0.5	29	
	50.0	14.2±1.3	48	
	100.0	16.0±2.0	67	
MMC ^{b)}	2	17.6±1.1	80	
	4	14.8±1.3	54	
VP-16 ^{c)}	—	—	—	≡

a) P388 cells (1×10^6 /mouse) were inoculated i.p. into male CDF₁ mice on day 0. Drugs were administered i.p. on day 1. b) Mitomycin C. c) Etoposide. d) TDC activity was compared by the amount of a linear DNA generated in the presence of m-AMSA, VP-16 and other acridine derivatives. In the TDC column, the symbols used indicate: (≡) means that linear DNA generated was in excess of 30% of total DNA; (≡) linear DNA generated was 20–30% of total DNA; (+) linear DNA was 10–20%; (±) linear DNA was less than 10%; (—) same as no drug control.

ると m-AMSA が一番強く、次に A4P73, 残る A3P56 と A3P166 はほぼ同程度であることが確認された (Table I, Fig. 1). このことから、ここに示された m-AMSA 関連のアクリジン誘導体の P388 抗がん活性とトポイソメラーゼ II 依存性の 2 重鎖 DNA 切断活性との関連性が示唆された. DNA 切断機構に関する知見として、アクリジン誘導体が 2 重鎖 DNA にインターカレーションする際には、6-, 7-位メチレンジオキシン環を有するアクリジン環の平面性とその大きさが重要な要因であり、インターカレーションした後は -NH-phenyl 部分の立体的、電子的要因が DNA 切断体の安定性に大きく影響していることを示唆するものである.

Fig. 1 に m-AMSA, A4P73, A3P56, A3P166, VP-16 のトポイソメラーゼ II 依存性 2 重鎖 DNA 切断活性をアガロスゲル電気泳動で調べた結果を示した. 測定方法及びその説明については実験の部と Fig. 1 に示されている. Fig. 1 においてスーパーコイル 2 重鎖 DNA 切断活性はゲル上に現れたバンドの内 linear DNA の生成率により判定している. Linear DNA を示すバンド (a) については drug free の状態でも見られるが、インターカレーター共存下では linear DNA の生成率が増強されることを示している. さらに A4P73 の 100 μ M 添加したとき出現するバンド (b) はインターカレーターの量を増加していくと、より進んだ超ラセン構造 DNA が生成されていく様子を示している. この現象はインターカレーターに特異的に見られる DNA の構造変換であり、VP-16 の場合について示されているようにインターカレーションしない薬物の場合にはバンド (b) は検出されないものである. Fig. 1 の A4P73 の各バンドから DNA 鎖切断活性には濃度依存性が確認された. 一方、A4P73 以外の化合物については顕著な濃度依存性は認められず、P388 抗がん活性の弱いものは DNA 鎖切断活性も弱いものであることが分かった.

謝辞 本研究に際して、トポイソメラーゼ II 活性とマウス P388 抗がん活性を測定していただいた協和醗酵工業株式会社東京研究所の中野博文博士と山下義則博士に感謝いたします.

引用文献

- 1) K. Drlica, R. J. Franco, *Biochemistry*, **27**, 2253 (1988).
- 2) M. J. Waring, *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 159 (1981).
- 3) E. M. Nelson, K. M. Tewey, L. F. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1361 (1984).
- 4) M. Kimura, I. Okabayashi, A. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 697 (1989).
- 5) M. Kimura, A. Kato, I. Okabayashi, *J. Heterocyclic Chem.*, **29**, 73 (1992).
- 6) 木邑道夫, 薬誌, **112**, 914 (1992).
- 7) 木邑道夫, 井上博章, 内坪誉歳, 小島秀子, 岡林一蔵, 薬誌, **113**, 454 (1993).
- 8) Y. Yamashita, T. Ashizawa, M. Morimoto, J. Hosomi, *Cancer Res.*, **52**, 281 (1992).
- 9) T. Tamaoki, H. Nakano, *Biotechnology*, **8**, 732 (1990).
- 10) Y. Pommier, J. K. Minford, R. E. Schwartz, L. A. Zwellig, K. W. Kohn, *Biochemistry*, **24**, 6410 (1985).
- 11) H. Nakano, *Jpn. J. Cancer Chemother.*, **18**, 1550 (1991).
- 12) T. Andoh, *Jpn. J. Cancer Chemother.*, **17**, 330 (1990).
- 13) J. Moscow, K. Cowan, *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**, 14 (1988).
- 14) I. Pastan, M. Gottesman, *N. Engl. J. Med.*, **316**, 1388 (1987).
- 15) B. F. Cain, G. J. Atwell, W. A. Denny, *J. Med. Chem.*, **18**, 1110 (1975).
- 16) Y. Yamashita, S. Kawada, H. Nakano, *Biochem. Pharm.*, **39**, 737 (1990).
- 17) Y. Yamashita, S. Kawada, N. Fujii, H. Nakano, *Biochemistry*, **30**, 5838 (1991).