

学 位 論 文

論 文 題 目

〈邦 文〉

抗腫瘍活性を有する植物由来イソフラボンに関する研究

〈欧 文〉

Studies on the phytochemical isoflavones with antitumor activity

申請研究科名	薬学研究科
申請者氏名	疋田 清美

目 次

序論.....	1
第一章 ポリビアデイゴ樹皮から各種イソフラボンの単離とヒトグリオキサラーゼ I に対する阻害活性	4
第一節 緒言	4
第二節 実験方法	6
1. 一般的操作	6
2. 植物原料	6
3. 抽出と単離	6
4. 大腸菌発現系を用いた組換え型ヒト GLO I の発現	8
5. 組換え型ヒト GLO I タンパク質の精製	8
6. タンパク質の定量	9
7. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と Western blotting	9
8. ヒト GLO I 酵素活性の測定	9
第三節 結果	10
1. イソフラボン化合物の単離と構造決定	10
2. 組換え型ヒト GLO I の大腸菌による発現と精製	14
3. ヒト GLO I 酵素活性に対する単離化合物の評価	16
第四節 考察	19
小括	19
第二章 ポリビアデイゴ樹皮から単離されたイソフラボンのヒト白血病細胞株 HL-60 に対する細胞増殖阻害活性	21
第一節 緒言	21
第二節 実験方法	21
1. 供試化合物	21
2. HL-60 細胞の培養	22

3. 細胞生存率の測定	22
4. MG の定量.....	22
5. カスパーゼ活性の測定	23
6. タンパク質の定量	23
7. 統計解析	23
第三節 結果	24
1. 各種イソフラボンの HL-60 細胞に対する生存率に及ぼす影響.....	24
2. 細胞内及び培養上清中の MG	27
3. カスパーゼ活性の測定	28
第四節 考察	30
小括.....	30
第三章 ポリビアデイゴ樹皮から単離されたイソフラボン erypoeigin K の強力な細胞死誘導活性.....	32
第一節 緒言	32
第二節 実験方法	33
1. erypoeigin K 、 hydroxyerythrinin C および erythrinin C の精製	33
2. HL-60 細胞の培養.....	33
3. ヒト末梢血リンパ球の培養.....	33
4. 細胞生存率の測定	33
5. カスパーゼ活性の測定	33
6. 核の凝縮の検出	34
7. ゲノム DNA 断片化の検出	34
8. MG の定量.....	34
9. 統計処理	34
第三節 結果	35
1. 3 種のイソフラボンの HL-60 細胞に対する生存率に及ぼす影響.....	35

2. erypoeegin K の正常リンパ球に対する作用	38
3. erypoeegin K による HL-60 細胞のアポトーシス誘導	39
4. MG の生成と蓄積	42
第四節 考察	43
小括	43
第四章 (<i>S</i>)-erypoeegin K の HL-60 細胞に対するエナント選択的なアポトーシス誘導活性	44
第一節 緒言	44
第二節 実験方法	44
1. (<i>RS</i>)-erypoeegin K の合成	44
1.1 一般的方法	45
1.2 4-(7-acetoxy-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl) phenyl acetate (3) の合成	45
1.3 4-(7-acetoxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl) phenyl acetate (4) の合成	46
1.4 4-(7-acetoxy-5-hydroxy-8-(3-methylbut-2-en-1-yl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl) phenyl acetate (5) の合成	46
1.5 lupiwightone (6) の合成	47
1.6 (<i>RS</i>)-erypoeegin K (1) の合成	47
2. キラルカラム HPLC による (<i>R</i>)-、(<i>S</i>)-erypoeegin K の光学分割	48
3. 比旋光度の測定	48
4. HL-60 細胞の培養	48
5. カスパーゼ活性の測定	48
6. 核の凝縮の検出	48
7. ゲノム DNA 断片化の検出	48
8. MG の定量	48
9. ヒト GLO I 酵素活性測定	49
10. 統計処理	49

第三節 結果	50
1. (<i>RS</i>)-erypoegin K の合成	50
2. 合成した(<i>RS</i>)-erypoegin K の生理活性	51
3. ラセミ混合物から(<i>S</i>)-、(<i>R</i>)-erypoegin K の光学分割	52
4. (<i>S</i>)-および(<i>R</i>)-erypoegin K の細胞死誘導活性とアポトーシス誘導活性.....	53
5. (<i>S</i>)-および(<i>R</i>)-erypoegin K で処理した HL-60 細胞における MG の産生.....	57
6. (<i>S</i>)-および(<i>R</i>)-erypoegin K の精製 GLO I の酵素活性に及ぼす影響.....	58
第四節 考察	59
小括.....	59
第五章 (<i>S</i>)-erypoegin K の標的分子の探索と新規トポイソメラーゼ II 阻害剤としての働き	60
第一節 緒言	60
第二節 実験方法	61
1. ヒトがん細胞パネル	61
2. Topoisomerase II α assay	61
3. 分子ドッキングシミュレーション	62
4. 細胞培養	62
5. 細胞生存率の測定	62
6. カスパーゼ活性の測定	62
7. 細胞周期	62
8. がん細胞移植マウスの作製.....	63
9. 統計処理	63
第三節 結果	64
1. JFCR39 ヒトがん細胞パネルを用いた COMPARE 分析	64
2. Topo II α 酵素活性に対する(<i>S</i>)-erypoegin K の阻害活性	67
3. (<i>S</i>)-erypoegin K と Topo II α の分子ドッキング	68
4. (<i>S</i>)-および(<i>R</i>)-erypoegin K のヒト胃がん細胞に対する細胞死誘導活性.....	70

5. (S)-および(R)-erythropoietin K のヒト胃がん細胞に対するカスパーゼ 3 および 9 誘導活性	70
6. (S)-erythropoietin K の細胞周期に及ぼす影響	71
7. ヒト胃がん担がんモデルマウスを用いた(S)-erythropoietin K の <i>in vivo</i> 抗腫瘍活性の評価	73
第四節 考察	75
小括	76
総括	77
謝辞	79
引用文献	80

本学位論文は、以下の学術雑誌に掲載された論文を基礎としたものである。

- 1) **K. Hikita, H. Tanaka, T. Murata, K. Kato, M. Hirata, T. Sakai and N. Kaneda**
Phenolic constituents from stem bark of *Erythrina poeppigiana*.
J. Nat. Med., **68**, 636-642 (2014)
- 2) **K. Hikita, S. Yamada, R. Shibata, M. Katoh, T. Murata, K. Kato, H. Tanaka and N. Kaneda**
Inhibitory effect of isoflavones from *Erythrina poeppigiana* on the growth of HL-60 human leukemia cells through inhibition of glyoxalase I.
Nat. Prod. Commun., **10**, 1581-1584 (2015)
- 3) **K. Hikita, N. Hattori, A. Takeda, Y. Yamakage, R. Shibata, S. Yamada, K. Kato, T. Murata, H. Tanaka and N. Kaneda**
Potent anti-proliferative activity of erypoeigin K, an isoflavone isolated from *Erythrina poeppigiana*, against human leukemia HL-60 cells.
J. Nat. Med., **72**, 260-266 (2018)
- 4) **K. Hikita, S. Saigusa, Y. Takeuchi, H. Matsuyama, R. Nagai, K. Kato, T. Murata, H. Tanaka, Y. S. Wagh, N. Asao and N. Kaneda**
Induction of *enantio*-selective apoptosis in human leukemia HL-60 cells by (*S*)-erypoeigin K, an isoflavone isolated from *Erythrina poeppigiana*.
Bioorg. Med. Chem., **28**, 115490 (2020)
- 5) **K. Hikita, Y. Yamakage, H. Okunaga, Y. Motoyama, H. Matsuyama, K. Matsuoka, T. Murata, T. Nakayoshi, A. Oda, K. Kato, H. Tanaka, N. Asao, S. Dan and N. Kaneda**
(*S*)-Erypoeigin K, an isoflavone isolated from *Erythrina poeppigiana*, is a novel inhibitor of topoisomerase II α : Induction of G2 phase arrest in human gastric cancer cells.
Bioorg. Med. Chem., **30**, 115904 (2021)

序論

植物には二次代謝産物として多様な低分子化合物が含まれており、それらの植物は古来より経験的に伝承医薬として活用されている¹⁻⁴⁾。植物から抽出される天然化合物（フィトケミカル）には、アルカロイド、カロテノイド、含窒素化合物、有機硫黄化合物、ポリフェノール類などがある。これらの多くは、抗菌、抗ウイルス、抗酸化、抗炎症、抗腫瘍等の多様な生理活性を示すことが確認されており、種々の疾患の予防や治療に有効な生理活性を有することが知られている^{5,6)}。中でも抗腫瘍活性を有するフィトケミカルについて、多様な化合物が様々ながん細胞に対して有効であることが報告されている。例えば、フェノール性化合物のレスベラトロールは、大腸がんや骨髄性およびリンパ性のがんなど多くのがんにも効果的であると報告されている^{7,8)}。また、フェノール性化合物、特にポリフェノールとして分類されるクルクミンは前立腺がん細胞でアポトーシスやオートファジーを誘導することが知られている⁹⁾。さらに、アポトーシス活性を有する天然化合物やその誘導体は、白血病細胞の化学療法に対する抵抗性を低減するための多剤併用薬物として用いられることがある^{6,10)}。

アメリカ食品医薬品局（FDA）によると 1940 年代から 2014 年末までにがん治療の分野で医薬品として認可された 175 個の低分子化合物のうち、49%にあたる 85 個が天然物またはそれらの誘導体であり¹¹⁾、現在も医薬品のリード化合物の多くが天然物から探索されていることを示している。植物由来の化学物質がリード化合物となり、抗がん化学療法剤として開発されたものとして、イチイ科西洋イチイ（*Taxus baccata*）由来のパクリタキセル（タキソール）^{12, 13)}、ヌマミズキ科カレンボク（*Camptotheca acuminata*）由来のカンプトテシン¹⁴⁾、シクンシ科アフリカブッシュウィロウ（*Combretum cafferum*）由来のコンブレタスタチン¹⁵⁾、メギ科アメリカハッカクレン（*Podophyllum peltatum*）由来のエピポドフィロトキシン^{16, 17)}、キョウチクトウ科ニチニチソウ（*Catharanthus roseus*: 旧名 *Vinca roseus*）由来のビンカアルカロイド¹⁸⁾などがあり、現在、がんの薬物療法において臨床重要な役割を果たしている¹⁹⁻²¹⁾。

ニチニチソウから単離されたビンカアルカロイドのビンブラスチンやビンクリスチンはいずれも細胞周期の M 期における微小管の形成を阻害することで細胞死を誘導する²²⁾。また、西洋イチイから単離されたジテルペノイドのパクリタキセルは、微小管の脱重合を阻害することで細胞分裂が阻害され細胞周期が M 期で停止する¹⁴⁾。さらに、カンプトテシンやその誘導体のイリノテカンとはトポイソメラーゼ I 阻害薬で、DNA 切断後の再結合を阻害することで細胞周期の S 期から G2 初期で細胞周期が停止し、アポトーシスを引き起こす²³⁾。エピポドフィロトキシンから半合成されたエトポシドはトポイソメラーゼ II 阻害薬である²⁴⁾。トポイソメラーゼ II は姉妹染色分体の脱連環（G2 期）に関与しているため、エトポシドは DNA 切断後の再結合を阻害することにより G2 期で細胞周期を停止させてアポトーシ

スを引き起こす²⁵⁾。このように植物由来の化合物やそれをリード化合物として多くの抗がん剤が見出されている^{26, 27)}。

フィトケミカルの中で、ポリフェノール類は植物中で最も広範に存在する物質の一つである (Fig. 1)。ポリフェノールのうち、イソフラボン類は、抗腫瘍、抗菌、抗ウイルス、エストロゲン様などの生理活性を有するものが多く²⁸⁻³⁶⁾、マメ科 (Leguminosae) 植物が天然からの主要な供給源である³⁷⁾。これまでにマメ科植物のドクフジ (*Millettia taiwaniana* Hayata) から単離されたイソフラボノイドの furowanin-A、warangalone、isoerysenegalsein-E は、ヒト白血病細胞株の HL-60 細胞に対してアポトーシス誘導作用を示すことが報告されている³⁸⁾。同じくマメ科植物のポリビアデイゴ (*Erythrina poeppigiana*) は、南アメリカ、アフリカ、アジアに分布する大木で、日本では沖縄県で観賞植物としても植えられている。これまでの研究でポリビアデイゴはアリルベンゾフラン、シンナミルフェノール、イソフラバノン、イソフラボン、イソフラベンそして、プテロカルパンを含むフェノール性の二次代謝物に富んでいることが報告されている³⁹⁻⁴²⁾。Tanaka らやその他のグループによる研究から、これらのフェノール性化合物のいくつかはヒト免疫不全ウイルス-1 の複製阻害などの抗ウイルス活性⁴³⁾、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) や *Candida albicans* に対する抗菌活性^{44, 45)}、また estrogen 受容体に対する結合活性を有することなどが明らかにされている^{46, 47)}。

筆者らは抗腫瘍活性を有する新規のフィトケミカルを探索する目的で、まず細胞内のグリオキサラーゼ経路に着目した。がん細胞は、増殖速度が大きいことから、酸素と栄養が不足し、細胞内は嫌気的環境になりがちである。そのためがん細胞はそのエネルギー (ATP) 産生を嫌気的な経路である解糖系に大きく依存していることが知られている⁴⁸⁾。さらに、がん細胞は嫌気的条件下だけでなく、好気的条件下でもエネルギー産生を解糖系に依存しており、この効果は Warburg 効果とよばれている⁴⁸⁾。がん細胞は活発な細胞増殖に必要な核酸合成を行うため、核酸の構成成分であるリボースの合成のためにペントースリン酸回路の活性が高いことも解糖系を促進させるもう一つの要因である。しかし一方、解糖系はその副産物として C3 化合物であるメチルグリオキサール (MG) を産生する。MG は、分子内にアルデヒド基とケトン基を持つために反応性が高く、タンパク質や脂質、核酸などと反応して共有結合性の付加物を形成し、細胞毒性を発現する。細胞内にはこの毒性の高い MG を解毒するため、グリオキサラーゼ系とよばれる解毒経路が存在している^{49, 50)}。がん細胞のように解糖系が亢進する条件下では MG 産生も亢進することから、いくつかのがん細胞ではこれを無毒化するためにグリオキサラーゼ経路が活性化し、その律速酵素であるグリオキサラーゼ I (GLO I) の活性が亢進していることが多い。このことから、GLO I を阻害すれば腫瘍細胞内にアポトーシス誘導活性を有する MG が蓄積し、腫瘍形成が抑制されることから、GLO I 阻害剤の開発はがんの薬物療法に有用であると考えられる⁵¹⁾。

そこで本研究では、まず初めにマメ科植物のポリビアデイゴから種々のイソフラボン化合物を単離精製し、ヒト GLO I 酵素活性に対する阻害活性ならびにヒト白血病細胞株 HL-

60 に対する細胞増殖阻害活性について検討した。その結果、プレニル基を有するイソフラボンは、GLO I に対する阻害活性および HL-60 細胞に対する細胞増殖阻害活性が強いことを見出した。特に、プレニル基を二つ有する **isolupalbigenin** は調べたイソフラボンの中で最も強い GLO I 阻害活性を示し、HL-60 細胞に対する細胞増殖阻害活性も強かった。さらに、この研究を進める過程で、単離したイソフラボンの 1 種 **erypoeigin K** (エリポエギン K) は GLO I の阻害活性は弱いものの、GLO I とは異なる作用点をもち、かつ HL-60 細胞に対して極めて強力な抗腫瘍活性を有することを見出した。本論文の第一章、第二章では、GLO I 阻害活性を有するイソフラボンについて記載し、第三章から第五章では **erypoeigin K** に関する研究について記載する。

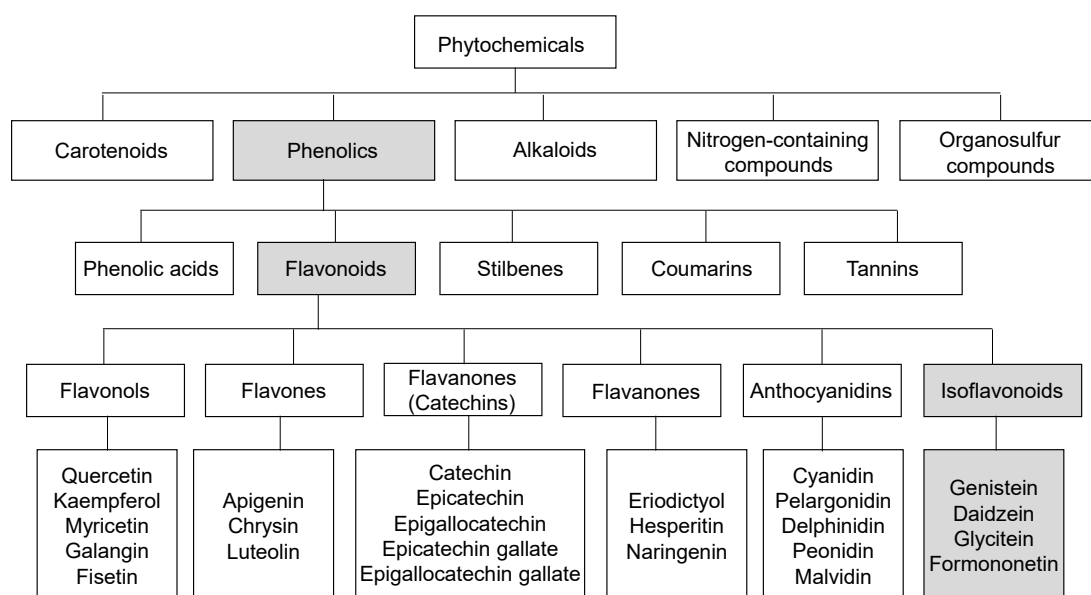


Fig. 1. Classification of phytochemicals (cited from ref.1)

第一章

ボリビアデイゴ樹皮から各種イソフラボンの単離とヒトグリオキサラーゼ I に対する阻害活性

第一節 緒言

細胞のエネルギー産生系の一つである解糖系は C6 化合物であるグルコースを出発材料として、C3 化合物のピルビン酸に分解する経路である。この解糖系では、1 モルのグルコースがグリセルアルデヒド 3-リン酸とジヒドロキシアセトンリン酸に開裂する。ジヒドロキシアセトンリン酸はグリセルアルデヒド 3-リン酸と平衡状態にあるが、ジヒドロキシアセトンリン酸の一部は解糖系の副産物として同じく C3 化合物であるメチルグリオキサール (MG) に変換される。MG は分子内にアルデヒド基とケトン基をもつジカルボニル化合物で反応性が非常に高く、強い細胞毒性を有することから、生体には MG を分解するため、グリオキサラーゼ経路と呼ばれる解毒経路が存在する (Fig. 1-1) ^{49,50)}。グリオキサラーゼ I (EC 4.4.1.5: GLO I) は MG と還元型グルタチオンから非酵素的に生成されたヘミメルカプタールを *S*-D-ラクトイルグルタチオンに変換し、次いで *S*-D-ラクトイルグルタチオンはグリオキサラーゼ II (GLO II) により D-乳酸に変換される ⁴⁹⁾。D-乳酸は乳酸ラセマーゼによって L-乳酸に変換され、解糖系に戻る。この GLO I と GLO II からなるグリオキサラーゼ系は、ほとんどすべての組織の細胞内に存在している。MG は、タンパク質や脂質、核酸などと反応することによって多くの細胞機能に影響を与えるだけでなく、強い細胞毒性によって、アポトーシスを引き起こすことが知られている ⁵⁰⁾。

がん細胞は嫌氣的条件下だけでなく、好氣的条件下でもエネルギー産生を解糖系に依存していることが知られており、Warburg 効果とよばれる ⁴⁸⁾。がん細胞は細胞分裂が盛んでそれに伴い活発な核酸合成を行う。核酸の構成成分であるリボースの合成のためにペントースリン酸回路が亢進している。その結果、がん細胞においてはより解糖系が亢進し、MG 産生も盛んになるため、多くのがん細胞ではこれを無毒化するために GLO I の活性が亢進すると考えられる。事実、これまでに乳がん ⁵²⁾、大腸がん ⁵³⁾、肺がん ⁵⁴⁾を含む多くのヒトの悪性腫瘍細胞で GLO I の発現上昇や酵素活性の上昇が報告されている。また、GLO I はがん細胞の抗がん剤に対する抵抗性を誘導したり ^{55,56)}、胃がん組織において、GLO I の高発現は腫瘍の進行や病気のステージの進行とかかわりのあることなどが報告されている ⁵⁷⁾。これらのことから、GLO I 阻害剤は、腫瘍細胞において MG の蓄積を介して腫瘍形成を抑制するために有用なものであると期待される。これまでに myricetin、quercetin や luteolin などの天然フラボノイドは組換え型ヒト GLO I を有効に阻害すること、それらのフラボノイドによる酵素阻害活性の構造的基盤はフラボノイドの C-4 位カルボニル基と C-5 位ヒドロキシ基からなる構造が MG と GLO I との酵素反応中間体の遷移構造と類似していることが報告されている ⁵⁸⁾。

そこで第一章では、抗腫瘍活性を有する植物由来の新規イソフラボンを見出すことを目

的として、ポリビアデイゴ (*Erythrina poeppigiana*) 樹皮から各種イソフラボンを単離し、ヒト GLO I に対する阻害活性を明らかにすることを試みた。その結果、9 種の既知化合物を単離するとともに 1 種の新規イソフラボンを単離し、構造決定した。また、精製ヒト GLO I を得るためにヒト cDNA ライブラリーから完全長 GLO I cDNA を単離し、大腸菌発現系による酵素タンパク質の発現ならびに Ni²⁺-アフィニティークロマトグラフィーによる酵素の精製を行った。本精製酵素標品を用いて、単離した各種イソフラボンの GLO I 阻害活性を評価した。

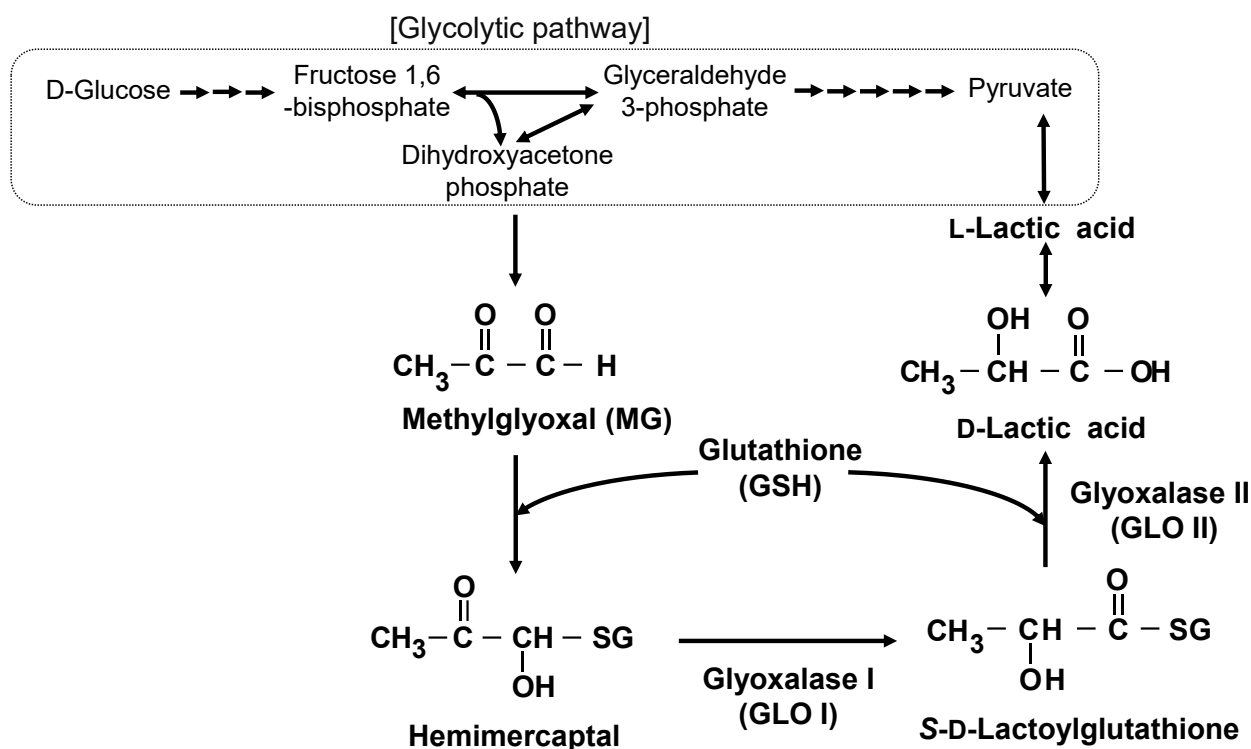


Fig. 1-1 Glycolytic pathway and glyoxalase system

第二節 実験方法

1. 一般的操作

旋光度は P-2000 デジタルポラリメーター (JASCO、Tokyo、Japan) で測定した。UV および IR スペクトルはそれぞれ V-560 (JASCO) ならびに FT/IR-4200 (JASCO) を用いて測定した。NMR スペクトルは内部標準としてテトラメチルシラン (TMS) を用い、JNM ALPHA-600 (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz; JEOL、Tokyo、Japan) で測定した。EIMS と HR-EIMS は JMS-700 マススペクトロメーター (JEOL) によって測定した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには Merk silica gel (230–400 mesh; Darmstadt、Germany) を用いた。分取型逆相 HPLC は島津 SPD-20AV UV 検出器を装備した島津 LC-8A 装置を用い、カラムは Develosil ODS-10 (20 mm $\times$ 250 mm、10 μm ; Nomura Chemical Co、Aichi、Japan) を用いた。TLC プレート (Merck silica gel 60 F₂₅₄) のスポットは UV ランプ照射またはヨウ素噴霧により検出した。

2. 植物原料

ボリビアダイゴ (*Erythrina poeppigiana*) 樹皮は 2002 年 7 月に沖縄県において採集されたものを用い、証拠標本 (No. 020722) は田中齊名城大学名誉教授によって識別されたものを使用した。

3. 抽出と単離

ボリビアダイゴ樹皮からの各化合物の抽出と単離については田中齊名城大学名誉教授らによって行われた。

細切した樹皮 (8.88 kg) をアセトン (2 $\times$ 18 L) に 72 時間浸漬し、溶媒を留去して得られた残渣 (暗褐色油状物) を順に *n*-ヘキサン、ジクロロメタンならびに酢酸エチルを用いて溶媒抽出し、3 種の可溶性画分に分けた。次いでジクロロメタン可溶性画分 (84.5 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、クロロホルム–アセトン (40 : 1 $\rightarrow$ 10 : 1 $\rightarrow$ 1 : 1)、アセトンならびにクロロホルム–メタノール (10 : 1 $\rightarrow$ 1 : 1) 各 500 mL で溶出し、36 画分 (A1–A36) を得た。画分 A26 (1.38 g) は、*n*-ヘキサン–アセトン (2 : 1) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返すことによって化合物 **10** (181 mg) を単離した。画分 A28 (27.7 g) はクロロホルム–アセトン (10 : 1.5 $\rightarrow$ 3 : 1) 各 200 mL を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、42 画分 (B1–B42) を得た。そのうち、画分 B14–B21 (2.73 g) についてさらにベンゼン–酢酸エチル (5 : 1) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより 26 画分 (C1–C26) を得た。画分 C5 と C6 (78 mg) をクロロホルム–アセトン (20 : 1) を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって化合物 **5** (9.2 mg) と化合物 **8** (8.8 mg) を分離した。続いて、画分 C7–C9 (110 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより *n*-ヘキサン–アセトン (3 : 1) で溶出し、化合物 **9** (6.5 mg) を得た。画分 C23 と C24 は合わせて得た粗固体 (250 mg) の酢酸エチル

から再結晶により化合物 **4** (14.3 mg) を単離した。得られたろ液 (21.8 mg) を分取型逆相 HPLC (移動相: 30%CH₃CN–70%H₂O、6 mL/min) で化合物 **2** (6.6 mg、*t_R* 153 min) と化合物 **4** (15.9 mg、*t_R* 163 min) を分離した。画分 B22–B32 (3.15 g) はベンゼン–酢酸エチル (5:1→1:1) 続いて *n*-ヘキサン–アセトン (2:1) によるシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、化合物 **6** (16 mg) と化合物 **7** (30 mg) を得た。画分 A29 (8.0 g) はクロロホルム–アセトン (10:1.5→3:1) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより粗油状物 (955 mg) を得た後、*n*-ヘキサン–アセトン (1.5:1→1:1) とベンゼン–酢酸エチル (2:1) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより油状物 (21.1 mg) を得、さらに分取型逆相 HPLC (30% CH₃CN–70%H₂O、6 mL/min) により化合物 **1** (5.3 mg、*t_R* 75 min) を単離した。画分 A33 (1.67 g) を *n*-ヘキサン–アセトン (1.5:1→1:1) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供して得た粗油状物 (189 mg) について、さらにベンゼン–酢酸エチル (2:1) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供して褐色油状物 (25.2 mg) を得た。褐色油状物を分取型逆相 HPLC (30% CH₃CN–70%H₂O、6 mL/min) で精製し、化合物 **3** (6.1 mg、*t_R* 39 min) を単離した。

Erythgianin A (**1**)

無色油状物; $[\alpha]_D^{23}$ –8.4 (*c* 0.10, MeOH); UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 261 (4.90), 206 (4.94); IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{–1}: 3393, 1670, 1620, 1572, 1516, 1260, 1212; ¹H and ¹³C-NMR (Me₂CO-*d*₆): Table 1-1 and 1-2, respectively; EIMS *m/z*: 386 [M]⁺ (11), 285 (14), 279 (32), 256 (41), 243 (16), 228 (17), 213 (22), 199 (12), 185 (34), 167 (100), 161 (53); HR-EIMS *m/z*: 386.1013 [M]⁺ (calcd for C₂₀H₁₈O₈: 386.1002). Differential NOE: Irradiation at δ 4.95 (H-3'')—6% and 2% enhancement at δ 5.89 (H-4'') and 1.42 (H-5''), respectively; irradiation of H-4''—3% enhancement of H-3''; irradiation at H-5''—5% and 3% enhancement at δ 3.29 (H-6''a) and H-3'', respectively; irradiation of H-6''a—30% and 3% enhancement of H-6''b and H-5'', respectively; irradiation at δ 3.73 (H-6''b) —27% enhancement of H-6''a.

Erypoeigin K (**2**)

無色油状物; $[\alpha]_D^{23} \pm 0$ (*c* 0.10, Me₂CO); UV $\lambda_{\max}$ (EtOH) nm (log ϵ): 266 (4.37), 203 (4.41); IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{–1}: 3435, 1654, 1625, 1558, 1541, 1508, 1398, 1255; ¹H and ¹³C-NMR (Me₂CO-*d*₆): Table 1-1 and 1-2, respectively; EIMS *m/z*: 354 [M]⁺ (69), 321 (51), 295 (100), 268 (16), 59 (20), 44 (26); HR-EIMS *m/z*: 354.1100 [M]⁺ (calcd for C₂₀H₁₈O₆: 354.1103).

Hydroxyerythrinin C (**3**)

無色油状物; $[\alpha]_D^{23} \pm 0$ (*c* 0.10, MeOH); UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 262 (4.90), 214 *sh* (4.95), 203 (4.98); IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{–1}: 3405, 1663, 1626, 1579, 1456, 1370, 1270, 1214,

1071; ^1H and ^{13}C -NMR ($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$): Table 1-1 and 1-2, respectively; EIMS m/z : 370 $[\text{M}]^+$ (3), 352 (18), 337 (42), 334 (18), 294 (100), 176 (29), 148 (11), 44 (6), 43 (12); HR-EIMS m/z : 370.1069 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_7$: 370.1052).

Erysubin B (7)

無色油状物; $[\alpha]_D^{23} \pm 0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} nm ($\log \epsilon$): 283 (4.57), 226 (4.33), 203 (4.46); IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3380, 1650, 1620; ^1H and ^{13}C -NMR ($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$): Table 1-1 and 1-2, respectively; EIMS m/z : 352 $[\text{M}]^+$ (5), 321 (100), 203 (5); HR-EIMS m/z : 352.0940 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_6$: 352.0947).

4. 大腸菌発現系を用いた組換え型ヒト GLO I の発現

ヒト GLO I の全長 cDNA は、ヒト肺 cDNA library (BioChain, Hayward, CA, USA) から PCR 法 (sense primer 5'-TAGCATATGATGGCAGAACCGCAGCCCCCGTC-3', anti-sense primer 5'-CACGTCGACCTCACAGCACTACATTAAGGTTGCC-3') によって調製し、ヒト GLO I を 6×His-tag 結合タンパク質として発現させるためにプラスミドベクター pET-14b (Novagen, Darmstadt, Germany) に *Nde* I および *Sal* I 部位でサブクローニングし、プラスミド pET-hGLO I を作成した。pET-hGLO I は大腸菌 BL21 (DE3) 株にエレクトロポレーション法により導入した。プラスミド pET-hGLO I を導入した大腸菌をアンピシリン 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む LB 培地 (LA 培地) に植菌し、37°C で一晩インキュベートした。この培養液を、新たに調製した LA 培地に 1% になるように加え、37°C で約 3 時間インキュベート ($\text{OD}_{600} = \sim 1.0$) した後、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドを終濃度 1 mM となるように加え、さらに 4 時間インキュベートした ($\text{OD}_{600} = \sim 1.5$)。培養液を遠心 (7,800 $\times g$, 5 分間, 4°C) し、菌体を集め、140 mM NaCl を含む 30 mM Tris HCl buffer (pH 7.5) で洗浄、遠心後、-80°C で保存した。

5. 組換え型ヒト GLO I タンパク質の精製

凍結保存した大腸菌ペレットに 1 mM dithiothreitol を含む 30 mM Tris HCl 緩衝液 (pH 7.5) を加え、氷冷しながら 30 秒間、6 回超音波破碎 (SMT, Tokyo, Japan) した。ホモジネートを 543,200 g で 15 分間、4°C で遠心 (TL-100, Beckman, Palo Alto, CA, USA) し、上清を PD-10 カラム (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) にアプライし、緩衝液を Ni^{2+} アフィニティークロマトグラフィー用の結合用緩衝液 (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4) に置換した。試料を結合用緩衝液で平衡化した Ni^{2+} アフィニティークラム (HisTrap™ HP, 1 mL, GE Healthcare) にアプライし、非吸着画分を結合用緩衝液で洗浄した後、溶出用緩衝液 (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4) で吸着画分の酵素タンパク質を溶出した。精製した酵素は保存液 (50 mM imidazole, pH 7.2, 20% glycerol, 20 mM glutathione, 5 mM MgSO_4) に

置き換え、実験に供するまで -30°C で保存した。

6. タンパク質の定量

タンパク質濃度は Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio Rad, Hercules, CA, USA) を用いて決定した。 $0.3\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調製したタンパク質標準液 (IgG, Bio Rad) をタンパク質濃度 3、6、12、21、 $27\text{ }\mu\text{g}/100\text{ }\mu\text{L}$ になるように希釈した。試料液は、標準液の希釈系列に入るように希釈して全量 $100\text{ }\mu\text{L}$ にした。標準液および試料液に Dye Reagent Concentrate を 4.5 倍希釈した染色液を $900\text{ }\mu\text{L}$ ずつ加え、室温で 10 分間静置後、分光光度計 (UV-1600, Shimadzu, Kyoto, Japan) で 595 nm の吸光度を測定した。標準液の吸光度から標準曲線を作成し、試料液中のタンパク質量を求めた。

7. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と Western blotting

精製した組換え型ヒト GLO I タンパク質 $2\text{ }\mu\text{g}$ (クマシーブリリアントブルー染色用) または $0.4\text{ }\mu\text{g}$ (Western blotting 用) を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 用サンプルバッファー (終濃度 125 mM Tris-HCl pH 6.8、20% グリセロール、5% mercaptoethanol、2% SDS、0.025% ブロモフェノールブルー) に溶解し、沸騰湯浴中で 4 分間加熱してサンプル溶液とした。アフィニティークロマトグラフィー前の大腸菌粗抽出液 (タンパク質量 $10\text{ }\mu\text{g}$ または $2\text{ }\mu\text{g}$) を同様に処理して精製標品とともに SDS-PAGE を行った。泳動後、Western blotting 用ゲルについて、タンパク質をポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (孔径 $0.45\text{ }\mu\text{m}$, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) に転写し、一次抗体として抗 His-tag 抗体 (ヤギ IgG、1,000 倍希釈、Thermo scientific, Waltham, MA, USA)、二次抗体としてアルカリホスファターゼ結合抗ヤギ IgG 抗体 (2,000 倍希釈、Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を用い、発色には nitro blue tetrazolium/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP, Sigma-Aldrich) を用いた。

8. ヒト GLO I 酵素活性の測定

組換え型ヒト GLO I 酵素活性は、Oray ら⁵⁹⁾の方法を一部改変して行った。すなわち、酵素反応前に、 7.9 mM MG、 1 mM 還元型グルタチオンを混和し、ヘミメルカプタールの生成が平衡化するまで、 25°C 、90 分間プレインキュベートした。酵素反応は平衡化した基質、供試化合物、または溶媒の DMSO を含む反応溶液 (3 mL) に酵素タンパク質 ($1\text{ }\mu\text{g}$) を加えて開始し、 25°C で 2 分間、 240 nm での吸光度の増加 ($1\text{ O.D.} = 3.37\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) を測定した (UV-1600, Shimadzu)。なお、GLO I の既知の阻害剤で GSH の bromobenzyl 誘導体 *S*-*p*-bromobenzylglutathione (BBG) は、Vince らの方法⁶⁰⁾により合成したものを田中齊名城大学名誉教授から供与していただいた。供試化合物ならびに BBG はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して使用した。

第三節 結果

1. イソフラボン化合物の単離と構造決定

ボリビアデイゴ樹皮のジクロロメタン可溶性画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分離し、さらに分取型逆相 HPLC により既知の 9 つの化合物 **2–10** を単離するとともに新規イソフラボン **1** (erythgianin A と命名) を得た (Fig. 1-2)。9 つの既知化合物のうち、化合物 **2** は *Ficus benjamina* (Moraceae) から単離され、報告⁶¹⁾されている 5,4'-dihydroxy-2''-hydroxyisopropylidihydrofurano[4,5:7,8]-isoflavone と同定された。他の化合物は標品との比較または報告されているスペクトルデータと比較することによりそれぞれ hydroxyerythrinin C (**3**)⁶²⁾、erythrinin C (**4**)⁶³⁾、erythrinin B (wighteone) (**5**)⁶⁴⁾、M-Wi-2 (**6**)⁶⁵⁾、erysubin B (**7**)⁶⁵⁾、lupiwighteone (**8**)⁶⁶⁾、laburnetin (**9**)⁶⁷⁾、isolupalbigenin (**10**)⁶⁸⁾ と同定された。化合物 **2** はマメ科植物から初めての報告であり、また固有の名称が与えられていなかったことから、erypoeigin グループの一つとして erypoeigin K と命名した。

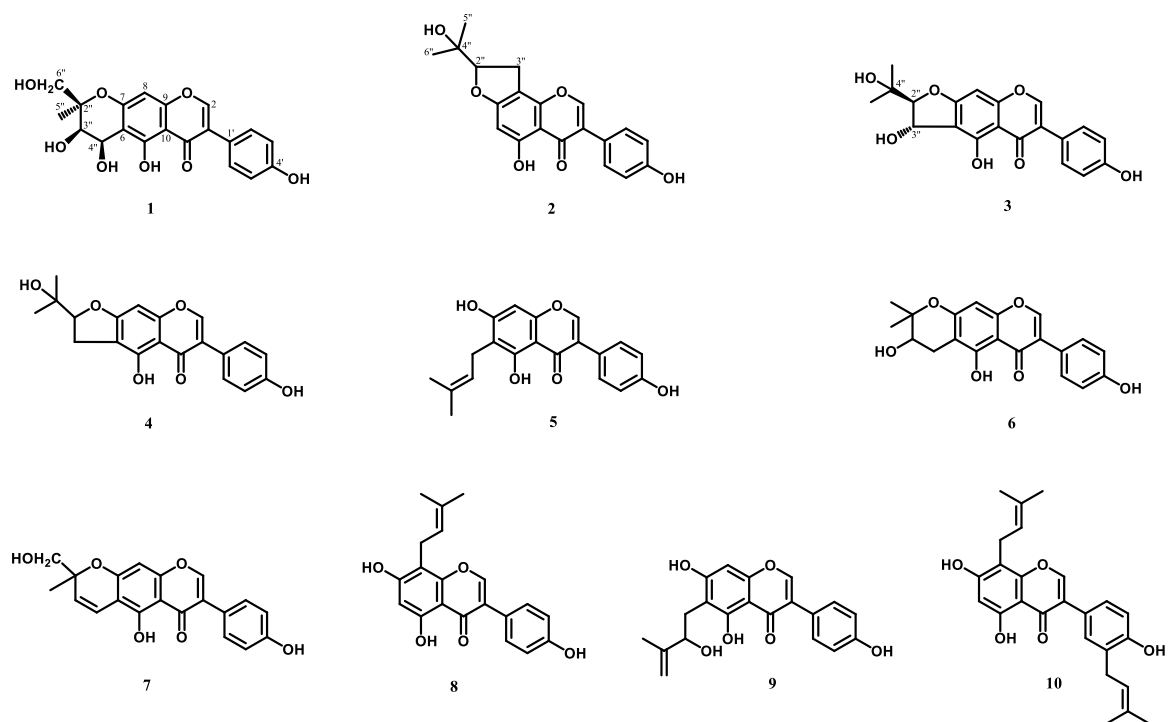


Fig. 1-2 Chemical structures of compounds 1–10 from *Erythrina poeppigiana*.

Erythgianin A (**1**)は無色油状物として得られ、旋光度 $[\alpha]_D^{23} -8.4$ (c 0.10, MeOH) で HR-EIMS (m/z 386.1013 [M]⁺) の結果より分子式は C₂₀H₁₈O₈ と決定した。IR スペクトルは共役カルボニル基 (1670 cm⁻¹) とヒドロキシ基 (3393 cm⁻¹) の吸収を示した。UV スペクトルと C-2 の NMR スペクトルデータ (δ_H 8.22 と δ_C 154.5) (Table 1-1 と 1-2) により **1** はイソフラボン誘導体であることが示唆された。¹H-NMR スペクトルから 1 個の芳香族水素 (δ_H 6.45)、4-hydroxybenzene 部位のオルト位の芳香族水素 (δ_H 6.9 と δ_H 7.47) と水素結合のヒドロキシ基 (δ_H 13.57) および dihydropyran (ジヒドロピラン) 環に、二つの脂肪族水素 (δ_H 4.95 と δ_H 5.89)、メチル基 (δ_H 1.42)、ヒドロキシメチル基 (δ_H 3.29 と δ_H 3.73) のシグナルが観測された。Fig. 1-3 に示すように C-3 位に 4-hydroxybenzene 基の存在が

Table 1-1. ¹H-NMR spectral data for compounds 1–3 and 7 in Me₂CO-*d*₆ (600 MHz).

Position	1	2	3	7
2	8.22 s	8.19 s	8.19 s	8.18 s
6		6.22 s		
8	6.45 s		6.41 s	6.35 s
2'	7.47 d (8.8)	7.45 d (8.8)	7.47 d (8.8)	7.46 d (8.8)
3'	6.91 d (8.8)	6.91 d (8.8)	6.91 d (8.8)	6.91 d (8.8)
5'	6.91 d (8.8)	6.91 d (8.8)	6.91 d (8.8)	6.91 d (8.8)
6'	7.47 d (8.8)	7.45 d (8.8)	7.47 d (8.8)	7.46 d (8.8)
2''		4.87 dd (9.5, 8.1)	4.45 d (2.9)	
3''	4.95 d (5.9)	3.27 dd (15.4, 9.5) 3.32 dd (15.4, 8.1)	5.56 br s	5.75 d (10.3)
4''	5.89 d (5.9)			6.77 d (10.3)
5''	1.42 s	1.30 s	1.30 s	1.43 s
6''a	3.29 d (9.5)	1.26 s	1.25 s	3.62 dd (11.7, 6.6)
6''b	3.73 d (9.5)			3.67 dd (11.7, 5.9)
5-OH	13.57 s	13.24 s	13.47 s	13.42 s
OH	8.56 br s	8.57 br s	8.55 br s	8.61 br s
OH	4.41 br s	3.84 s	4.73 br s	4.20 ^a dd (6.6, 5.9)
OH	2.85 br s		3.85 br s	

^a 6''-OH, Disappeared after addition of deuterium oxide.

HMBC [H-2' (H-6') と C-3 の相関] と NOESY [H-2 と H-2' (H-6') の NOE 相互作用] スペクトルの両方から示唆された。化合物 1 の ^1H -NMR スペクトルは化合物 7 のオレフィン水素 (δ_{H} 5.75 と δ_{H} 6.77) の代わりに脂肪族水素 (δ_{H} 4.95 と δ_{H} 5.89) が存在していることを除いて化合物 7 とよく類似していた。C-2''位のメチル基は HMBC (H-5''/C-2'', H-5''/C-3'', H-5''/C-6''の相関) によって帰属された。C-6 と C-7 位に結合した dihydropyran 環は H-8/C-6, H-8/C-7, H-4''/C-7 と OH-5/C-6 の間で相関関係を示している HMBC スペクトルから帰属した。C-2'', C-3'', C-4''位における相対立体化学は、 δ_{H} 4.95 (H-3'') の照射で δ_{H} 5.89 (H-4'') と δ_{H} 1.42 (H-5'') がそれぞれ 6%、2% の増大を示した差 NOE 実験から、さらに H-4'' と H-5'' のそれぞれのシグナルが照射されたとき、H-3'' でのシグナルに対して 3% の増大が観察されたことから明らかである (Fig. 1-4)。立体化学に対するさらなる証拠は、NOESY

Table 1-2. ^{13}C -NMR data for compounds 1–3 and 7 in $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$ (150 MHz).

Position	1	2	3	7
2	154.5	153.9	154.3	154.4
3	124.1	124.0	123.9	124.1
4	182.2	181.7	182.1	181.8
5	160.6	164.3	160.0	157.6
6	109.7	94.4	113.3	106.0
7	167.5	167.7	167.9	160.6
8	89.4	104.8	89.4	95.3
9	160.3	153.6	160.0	158.2
10	107.3	106.2	106.8	106.6
1'	122.8	123.0	122.9	122.9
2'	131.2	131.2	131.2	131.1
3'	116.0	115.9	116.0	116.0
4'	158.6	158.5	158.5	158.5
5'	116.0	115.9	116.0	116.0
6'	131.2	131.2	131.2	131.1
2''	79.5	92.7	100.6	82.0
3''	95.4	27.1	70.1	126.4
4''	79.9	71.4	71.1	117.4
5''	19.0	25.5	26.0	23.6
6''	75.8	26.0	25.5	68.7

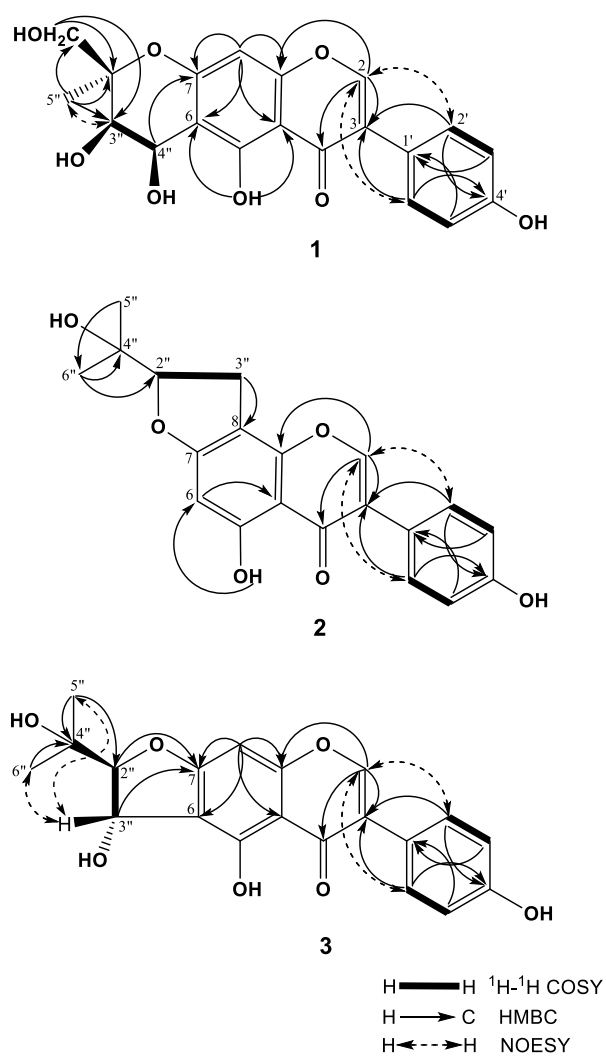


Fig. 1-3 Key HMBC, NOEY, and ^1H - ^1H COSY correlations for compounds 1–3.

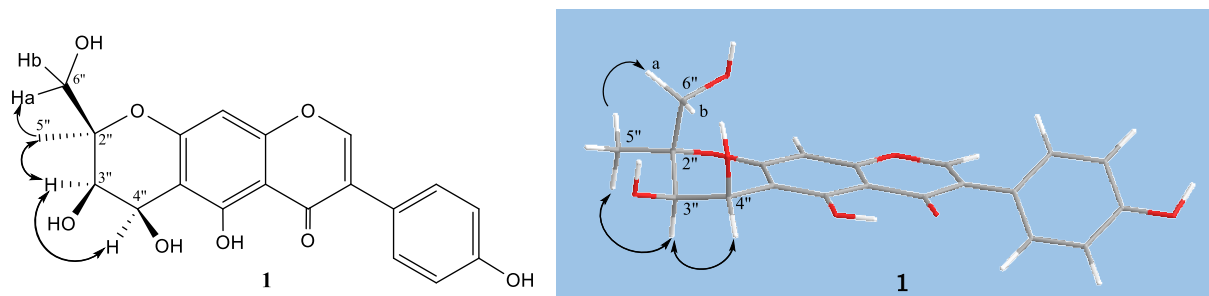


Fig. 1-4 Difference NOEs in compound 1.

スペクトルを使い、H-3"と H-5"の間での NOE の相関から得られた。これらの結果により、C-2"位にメチル基と C-3"と C-4"位に二つの carbinolic 水素が同じ配向性を持つことが決定された。最終的に erythgianin A の構造は、(-)-*rel*-(2*R*,3*R*,4*R*)-5,4'-dihydroxy-(3",4"-dihydroxy-3",4"-dihydro)-2"-hydroxymethyl-2"-methylpyrano-[5",6":6,7]-isoflavone (**1**)である。しかし、絶対配置については、試料量が十分でなく決定できなかった。化合物 **1** は、高度に酸化された 3",4"-dihydroxy-2"-hydroxymethyl-2"-methyl-2",3"-dihydropyrano 置換基を有する dihydropyranoisoflavone (ジヒドロピラノイソフラボン) であった。

erypoeigin K (**2**)は無色油状物として得られ、旋光度 $[\alpha]_{\text{D}}^{23} \pm 0$ (c 0.10、アセトン) であり、HR-EIMS から分子式を $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$ (m/z 354.1100 [M]⁺)であると決定した。HMBC スペクトルから H-3"と C-8 で相関性が示され、C-7 と C-8 位に結合した dihydrofuran (ジヒドロフラン) 環が示唆された (Fig. 1-3)。1-hydroxy-1-methylethyldihydrofuran 部を有するイソフラボン⁶⁴⁾の $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ 値により、erypoeigin K はラセミ化合物である。

化合物 **3** も旋光度 $[\alpha]_{\text{D}}^{23} \pm 0$ (c 0.10, MeOH)であり、ラセミ体として単離され、HR-EIMS から分子式を $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_7$ (m/z 370.1069 [M]⁺)と決定した。化合物 **3** における 3-hydroxy-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2,3-dihydrofuran 基の存在は、¹H-¹H COSY (H-2"/H-3"の相関)と HMBC (H-5"/C-2", H-5"/C-4"ならびに H-6"/C-4"の相関) から示された。C-6 と C-7 に結合した dihydrofuran 基の結合は H-2"/C-7 と H-3"/C-7 の相関を示す HMBC スペクトルに基づいて決定した。化合物 **3** の立体化学は、H-3"/H-5"と H-3"/H-6"の相関を示す NOESY スペクトルより *trans* 配置 (H-2" and H-3") であると帰属した。以上から、化合物 **3** は hydroxyerythrinin C⁶²⁾と同定した。

化合物 **1-3** の ¹H-および ¹³C-NMR スペクトルのシグナルの正確な帰属は、¹H-¹H COSY, HMQC、HMBC ならびに NOESY スペクトルの解析から行った。

2. 組換え型ヒト GLO I の大腸菌による発現と精製

単離した化合物 **1-10** のヒト GLO I に対する酵素阻害活性評価系に用いる組換え型ヒト GLO I を得るために大腸菌による発現系を構築した。ヒト肺 cDNA ライブラリーから PCR 法により全長ヒト GLO I cDNA を作成し、タンパク質発現プラスミドベクターに挿入後、大腸菌に導入した。大腸菌体内でタンパク質を発現させた後、大腸菌の溶解液を直接 Ni²⁺-アフィニティークロマトグラフィーに供することでワンステップで目的の精製酵素を単離することができた (Fig. 1-5)。Fig. 1-6 に SDS-PAGE および Western blotting の結果を示す。ヒト GLO I は 184 個のアミノ酸残基からなるタンパク質で、2 量体を形成している。SDS-PAGE によって、単量体の予想される分子量 23 kD の位置に単一のバンドが検出され、均一に精製された組換え型ヒト GLO I タンパク質を得ることができた。精製ヒト GLO I の収量として、大腸菌の培養液 250 mL から約 10 mg の精製タンパク質が得られた。

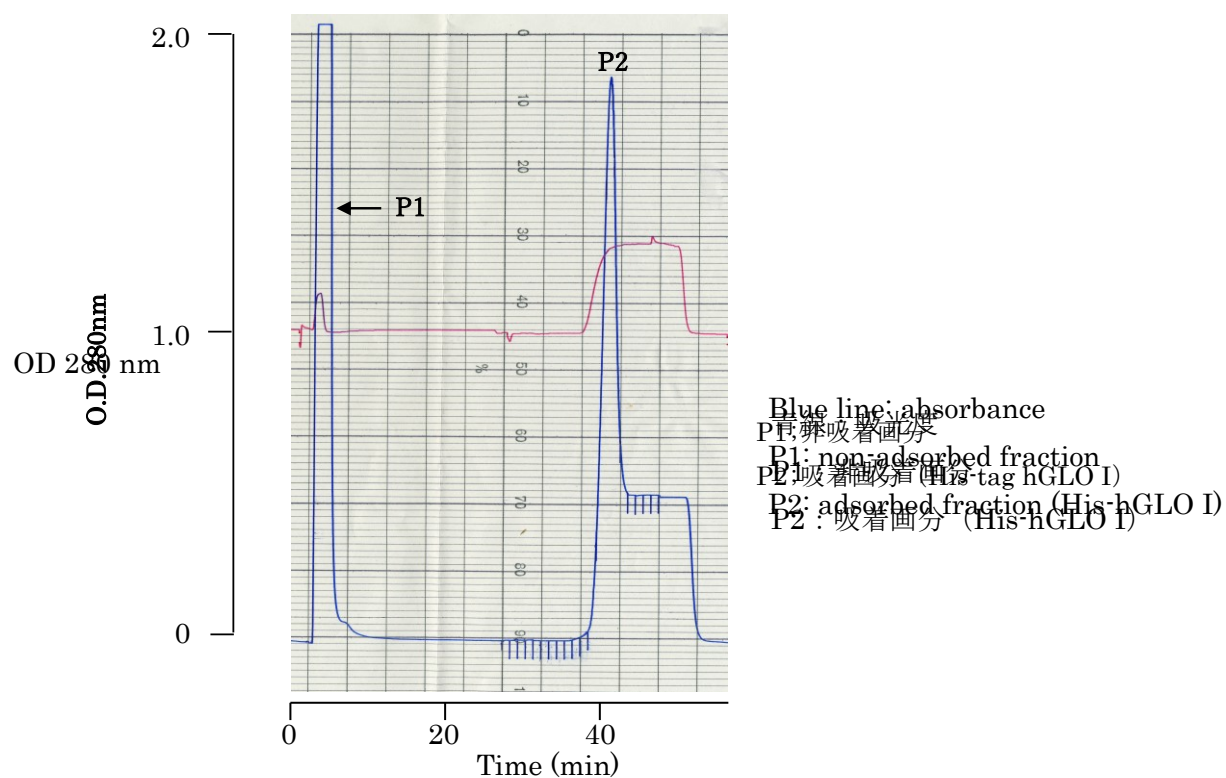


Fig. 1-5 Chromatogram of *E. coli* homogenate expressing human GLO I on Ni^{2+} affinity column.

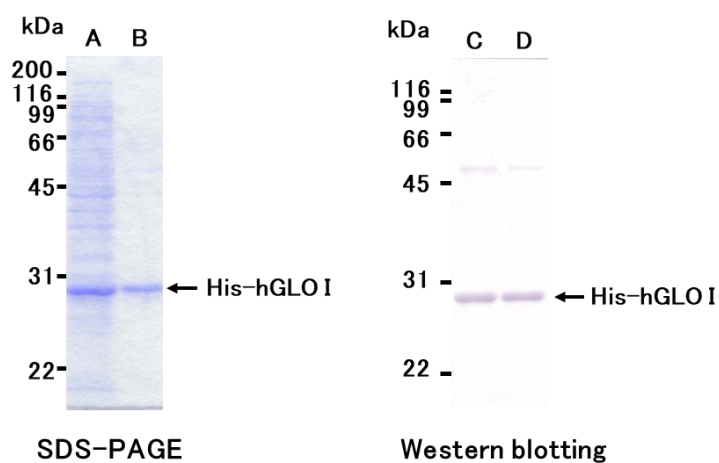


Fig. 1-6 SDS-PAGE and Western blotting of purified recombinant human GLO I.

Lane A, C: crude extract Lane B, D: purified hGLO I

3. ヒト GLO I 酵素活性に対する単離化合物の評価

単離した化合物 **1–10** のヒト GLO I に対する酵素阻害活性の濃度依存性を評価した。ポジティブコントロールとして既知の GLO I 阻害剤の BBG を用いた⁶⁰⁾。BBG はグルタチオン誘導体でその化学構造を Fig. 1-7 に示す。各種イソフラボンによる GLO I の活性に及ぼす影響を Fig. 1-8 に示し、それらの IC₅₀ 値を Table 1-3 にまとめた。今回検討した化合物の中で化合物 **10** が IC₅₀ = 4.1 μM と最も強い阻害活性を示し、以下、化合物 **5** (5.0 μM)、**8** (9.3 μM)、**9** (20.2 μM)、**7** (37.5 μM)、**6** (39.7 μM)、**4** (92.5 μM)、**1** (95.2 μM)、**2** (109.4 μM) であった。化合物 **3** は、100 μM においてもほとんど阻害活性を示さなかった。化合物 **10**、**5**、**8**、**9**、**7**、**6** は BBG (IC₅₀ = 65 μM) より阻害活性が強く、中でもイソフラボン骨格の A 環にプレニル基を有する化合物 **5** と **8** はヒト GLO I に対する阻害活性が強く、A 環と B 環に二つのプレニル基を有する化合物 **10** はより強いヒト GLO I 阻害活性を示すことが明らかとなった。以上より、化合物 **10** は抗がん剤の開発のための有望なリード化合物となる可能性が示唆された。

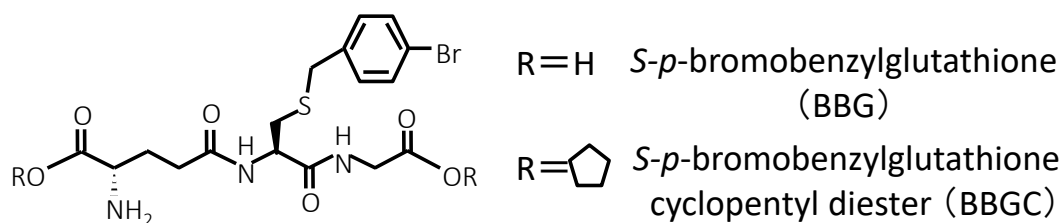


Fig. 1-7 Structures of GLO I inhibitor BBG and BBGC.

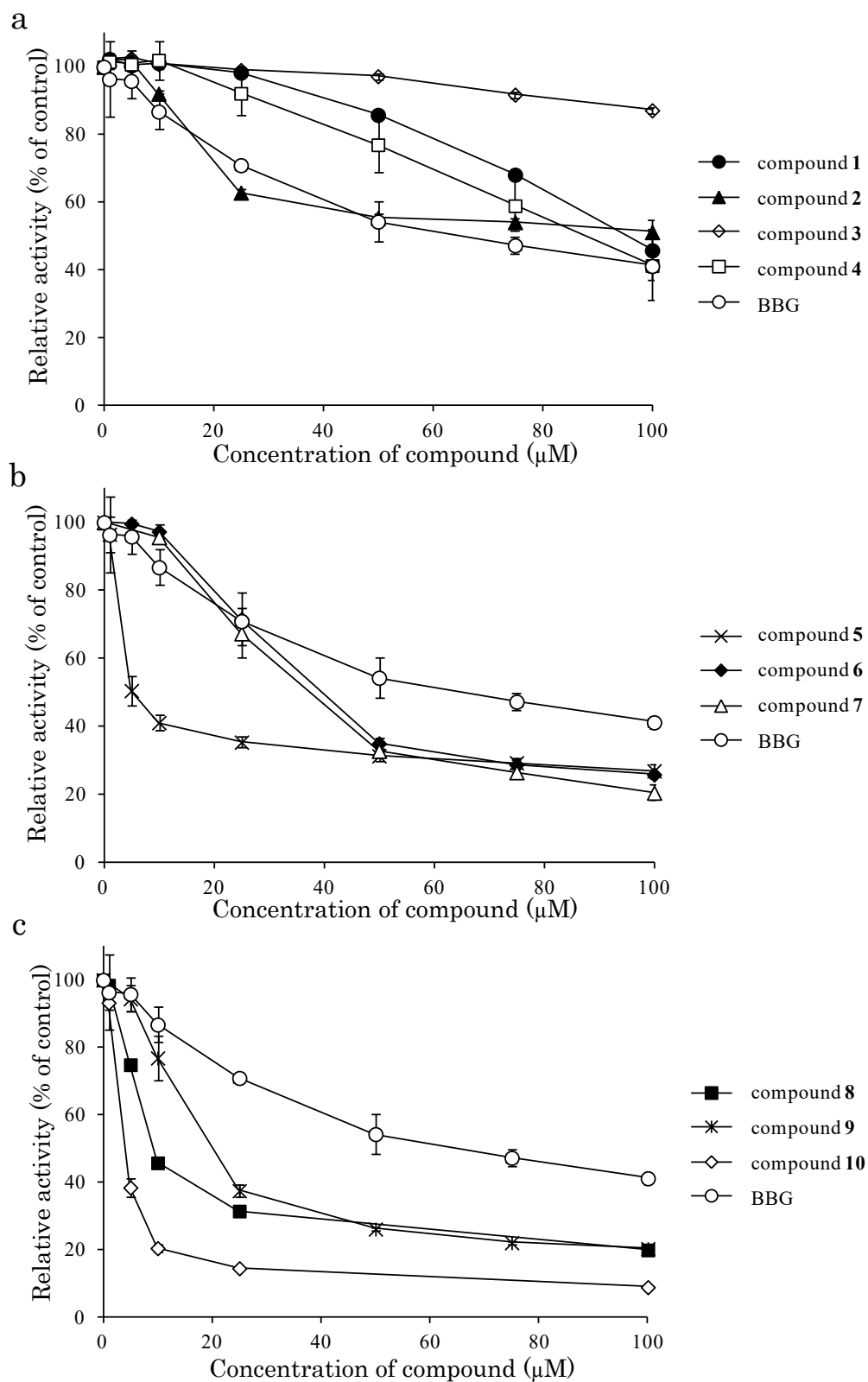


Fig. 1-8 Inhibitory effect of compounds 1–10 and BBG on hGLO I.

a, compounds 1–4; b, compounds 5–7; c, compounds 8–10. Dose dependency of the compounds on hGLO I inhibition at 0–100 μM was measured. Data represent the mean ($\pm\text{SE}$) of at least three independent experiments. Control is vehicle (DMSO) alone, and BBG was used as a positive control.

Table 1-3. IC₅₀ values of compounds 1–10 against hGLO I activity.

Compound	IC ₅₀ (μM)
1	95.2
2	109.4
3	N.D.
4	92.5
5	5.0
6	39.7
7	37.5
8	9.3
9	20.2
10	4.1
BBG	65.0

IC₅₀ values are defined as the concentration of compounds **1–10** required to reduce hGLO I activity by 50% compared to vehicle alone. Values were obtained from Fig. 1-8. BBG was used as a positive control. N.D.: not determined

第四節 考察

ボリビアデイゴ樹皮のアセトン抽出画分から 10 種のイソフラボンを得、そのうちの 1 種は新規イソフラボンであり、**erythgianin A (1)** と命名した。既知の化合物のうち、化合物 **2** は、これまでにクワ科植物 (Moraceae) で一例の報告⁶¹⁾があるのみでマメ科植物では新規であり、かつ固有の名称が与えられていなかったことから、これを **erypoeigin K** と命名した。

これまでに、GLO I の既知阻害剤としてグルタチオン誘導体の BBG が知られているが、これ以外に天然由来のものとして **baicalein**、**myricetin**、**quercetin**、**luteolin** などのフラボノイド^{58, 70)}や **curcumin**⁷¹⁾などのポリフェノール類も GLO I 阻害活性を有することが報告されている。今回単離した 10 種のイソフラボンについて、大腸菌発現系を利用して発現・精製した組換え型ヒト GLO I 酵素活性に対する影響を検討したところ、ほとんどの化合物が酵素阻害活性を示し、6 種の化合物が BBG よりも強い阻害活性を有することが示された。その中でも、プレニル基を有する化合物は強い GLO I 酵素活性を示し、特にプレニル基を二つ有する化合物 **10** は最も強い阻害活性を示した。

飯尾らは、クズから抽出したイソフラボノイドであるダイゼインならびに類似の 8 種の化合物について GLO I に対する阻害活性について報告している⁷²⁾。それによると 100 μM の濃度において GLO I の酵素活性を 80% 阻害するものが 1 種あり、残りのうちの 5 種は 50% よりも弱い阻害活性しか示さなかった。ダイゼインの場合は、C-5 位にヒドロキシ基がなく、第一節で述べた MG と GLO I との酵素反応中間体の構造と類似した C-4 位カルボニル基と C-5 位ヒドロキシ基の骨格が存在しない。本研究で筆者が単離したイソフラボンは、すべてが **genistein** を基本骨格としており、この構造を有する。しかし、100 μM の濃度においても GLO I に対する阻害活性をほとんど示さないもの (化合物 **3**) もあり、この C-4 位カルボニル基と C-5 位ヒドロキシ基の構造は GLO I 阻害に必須ではない可能性がある。本研究では、多くのイソフラボンがヒト GLO I 酵素活性を阻害し、プレニル基はヒト GLO I 酵素活性を阻害するのに重要な役割を示すことが示唆された。疎水的なプレニル基のかさ高さが、GLO I 酵素の活性部位への基質の結合を阻害している可能性が考えられる。

これらのイソフラボン類が実際にがん細胞に対してどのような影響を及ぼすか検討することが必要である。A 環と B 環に二つのプレニル基を有する化合物 **10** は抗がん剤の開発のための有望なリード化合物となる可能性がある。

小括

抗腫瘍活性を有する新規の植物由来イソフラボンを見い出すことを目的とし、マメ科植物ボリビアデイゴ (*Erythrina poeppigiana*) 樹皮から 10 種のイソフラボンを単離した。そのうち、9 種は既知化合物 (化合物 **2–10**) であったが、1 種は新規化合物であり、**erythgianin A (1)** と命名した。化合物 **1** の化学構造は各種の分光学的分析によって決定した。化合物 **1** は高度に酸化された 3'',4''-dihydroxy-2''-hydroxymethyl-2''-methyl-2'',3''-dihhydropyrano

置換基を有していた。

遺伝子工学的手法を用いてヒト GLO I を大腸菌発現系にて発現させ、均一に精製することに成功した。単離したすべての化合物について精製ヒト GLO I に対する阻害活性を調べた結果、分子内に 2 個のプレニル基を有する isolupalbigenin (化合物 **10**) が最も強い阻害活性を示すことが明らかとなった。

第二章

ボリビアデイゴ樹皮から単離されたイソフラボンのヒト白血病細胞株 HL-60 に対する細胞増殖阻害活性

第一節 緒言

1970 年以降の比較的古くから、がんの治療ターゲットとして GLO I 酵素が注目されている^{73,74)}。GLO I 阻害剤は、がん細胞で亢進している解糖系の副産物 MG を蓄積させ、その毒性によりがん細胞の細胞死を誘導すると考えられる。フラボノイドの myricetin、quercetin、luteolin などは、ヒト GLO I に対する酵素阻害活性を有し、ヒト白血病細胞株 HL-60 において細胞増殖阻害活性を示すことが報告されている⁵⁸⁾。同様に Santel らは、curcumin が GLO I 活性を阻害し、その阻害の強さは、同時に試験されたフラボノイドである quercetin、myricetin、kaempferol、luteolin、rutin よりも強く、神経膠腫の星細胞腫細胞株 1321N1、前立腺がん細胞株 PC-3、乳がん細胞株 JIMT-1 ならびに MDA-MB-231 の細胞増殖を阻害することを報告している⁷¹⁾。これらのことから、GLO I 阻害活性を有するイソフラボンにおいても細胞増殖阻害活性を示すことが期待される。

HL-60 細胞はがん抑制遺伝子 p53 を欠損している⁷⁵⁾。p53 は DNA 損傷の見張り番ともいわれるように、染色体 DNA の安定化に寄与している⁷⁶⁾。したがって、p53 を欠損している HL-60 細胞は細胞内外の刺激によってアポトーシスを起こしやすく、多くの植物由来抗がん活性化合物のスクリーニングに活用されている⁴⁾。

第一章では、ボリビアデイゴ (*Erythrina poeppigiana*) から 10 種のイソフラボンを単離し、そのうち 1 種は新規の構造をもつことを明らかにした。さらに遺伝子工学的手法ならびに大腸菌発現系を用いて高収率に組換え型ヒト GLO I を発現、精製することに成功した。精製した組換え型ヒト GLO I を用いて、10 種のイソフラボンの酵素阻害活性を検討し、特にプレニル化されたイソフラボン類は高い阻害活性を示すことを明らかにした。そこで本章ではプレニル基を有するイソフラボンに着目し、プレニル基をもつ 3 種とその他の 4 種のイソフラボンについて、HL-60 細胞の細胞増殖活性に及ぼす影響を検討した。

第二節 実験方法

1. 供試化合物

本章で用いた erythrianin A (1)、erythrinin B (wighteone) (5)、M-Wi-2 (6)、erysubin B (7)、lupiwighteone (8)、laburnetin (9) および isolupalbigenin (10) の化学構造は Fig. 1-2 に示した。膜透過性 GLO I 阻害剤である *S*-*p*-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester (BBGC)⁵³⁾ は、Thornalley ら⁷⁷⁾の方法により合成したものを田中齊名城大学名誉教授から供与していただいた。供試化合物ならびに BBGC はいずれも DMSO に溶解して使用した。BBGC の化学構造は Fig. 1-7 に示した。

2. HL-60 細胞の培養

ヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 は RIKEN Cell Bank (RIKEN BioResource Center, Ibaraki, Japan) より購入した。HL-60 細胞は 10% FBS、penicillin (100 units/mL)、streptomycin (100 µg/mL) を添加した RPMI-1640 培地 (SIGMA, St. Louis, MO, USA) 中で 5% CO₂ を含む気相下、37°C で培養した (CO₂ インキュベーター IT600, Yamato, Japan)。

3. 細胞生存率の測定

細胞生存率は CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA) を用い、製品の添付プロトコールに従って求めた。本法は、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) がミトコンドリア内膜の還元酵素によって還元され、可溶性のホルマゼン色素を生成することにもとづいている。

HL-60 細胞を、96-well プレート (BD Biosciences, Rockville, MD, USA) に 1.2×10^4 cells/well で播種した。37°C で 24 時間プレインキュベートした後、1–50 µM の供試化合物を添加し、さらに 37°C で 48 時間インキュベートした。次いで MTS 試液を加え、37°C で 1–3 時間反応後、492 nm における吸光度を測定した (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)。なお、培養中の DMSO 濃度は、0.4% 以下となるように調製した。

4. MG の定量

HL-60 細胞内と培養液中の MG 濃度は、Chaplen らの方法⁷⁸⁾を一部改変して行った。すなわち、MG を *o*-phenylenediamine (*o*-PD) を用いて誘導体化し、生成した 2-methylquinoxaline (2-MQ) を 315 nm の吸光度に基づいて HPLC/UV により定量した (Fig. 2-1)。HL-60 細胞を 6 cm ディッシュに播種し (1.5×10^6 cells)、37°C で 24 時間プレインキュベートした後、供試化合物を終濃度 30 µM またはポジティブコントロールとして BBGC を終濃度 10 µM 添加し、さらに 37°C で 24 時間インキュベートした。供試化合物での処理後、細胞とメディウムを回収し、遠心してメディウムを別の容器に回収した。細胞は PBS で 2 回洗浄後、PBS 300 µL に懸濁し、超音波破碎 (Ultrasonic homogenizer VP-050, TAITEC, Saitama, Japan) によりホモジナイズした。ホモジネートまたは細胞培養後のメディウムに過塩素酸を加え (終濃度 0.45 M)、遠心 ($13,400 \times g$, 15 分) して除タンパクした上清を Sep-Pak Light tC18 cartridge (Waters, Milford, MA, USA) にアプライし、非吸着画分を集め、吸着した疎水性不純物を除去した。非吸着画分に *o*-PD (終濃度 25 µM) と内部標準として 5-methylquinoxaline (5-MQ) を、培養液に対して終濃度 2.5 nM、細胞ホモジネートに対して終濃度 0.25 nM を加えた。室温で 3.5 時間反応した後、反応液を再度 Sep-Pak Light tC18 cartridge にアプライし、10 mM KH₂PO₄ (pH 2.5) で洗浄

第三節 結果

1. 各種イソフラボンの HL-60 細胞に対する生存率に及ぼす影響

今回 7 種のイソフラボン erythgianin A (1)、erythrinin B (wighteone) (5)、M-Wi-2 (6), erysubin B (7)、lupiwighteone (8)、laburnetin (9) および isolupalbigenin (10) の HL-60 細胞の細胞生存率に及ぼす影響を MTS アッセイにより調べた。GLO I の既知阻害剤 BBG は水溶性のため、膜透過性の誘導体 BBGC をポジティブコントロールとして用いた。

各化合物の HL-60 細胞に対する影響を Fig.2-2 に示した。それらの曲線から IC₅₀ を算出し Table 2-1 に示す。精製ヒト GLO I に対して最も強い酵素阻害活性を示した isolupalbigenin (10) の IC₅₀ は 13.4 μ M であり、調べた化合物の中で最も強い細胞増殖阻害活性を示した。しかし、BBGC の IC₅₀ 値は 3.4 μ M であり、isolupalbigenin (10) の細胞増殖阻害活性は BBGC の約 1/4 の強さであった。次に化合物 7、5、1 の IC₅₀ はそれぞれ 37.9 μ M、43.4 μ M、46.4 μ M と 30–50 μ M の範囲であった。化合物 6、8、9 は HL-60 細胞に対する阻害活性は弱く、IC₅₀ は >50 μ M であった。

以上、調べた 7 種のイソフラボンの中で BBGC より強力な細胞増殖阻害活性を示す化合物は見い出せなかった。

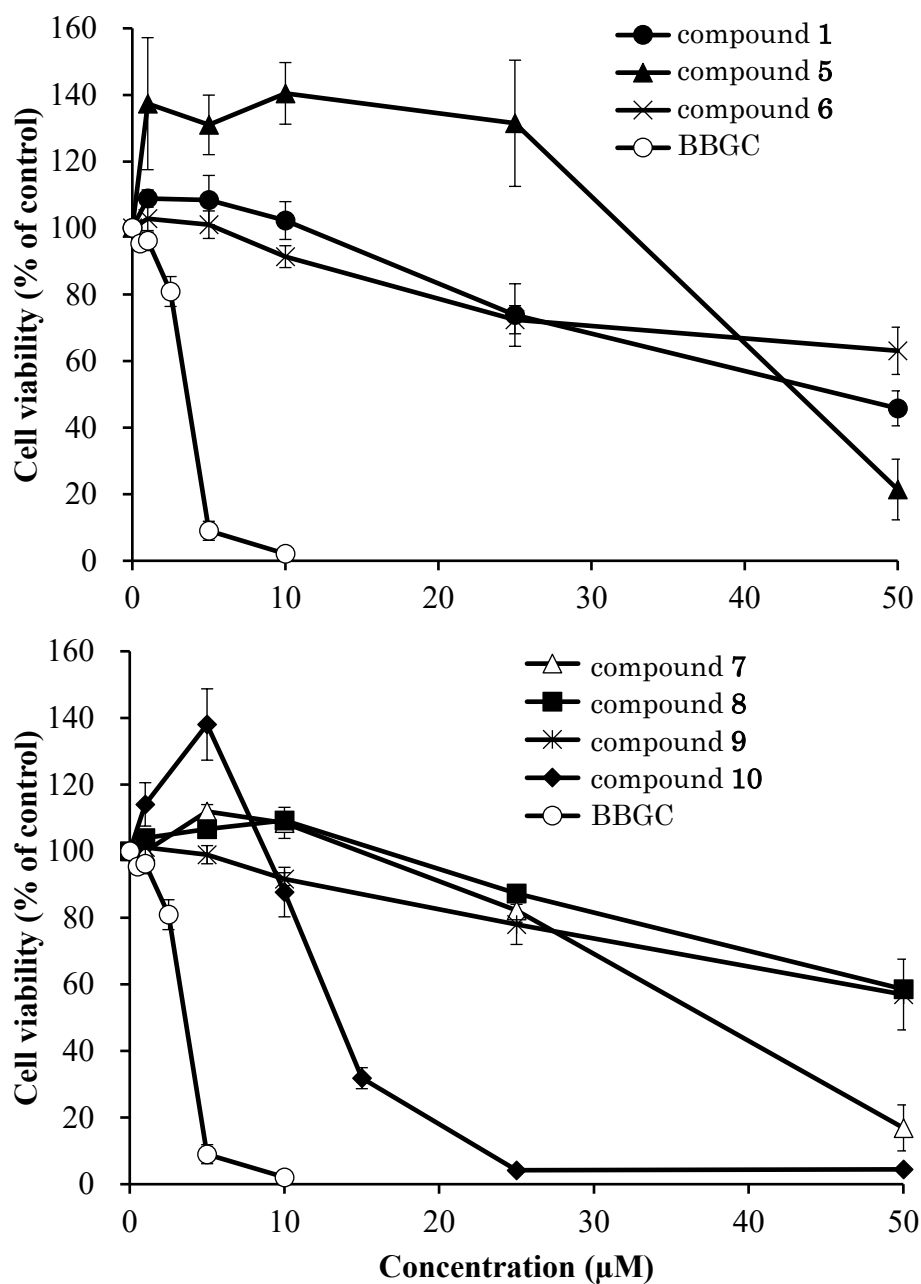


Fig. 2-2 Effects of the isoflavone compounds on the viability of HL-60 cells.

HL-60 cells were treated with various concentrations (0-50 μM) of compounds 1, 5-10 for 48 h. Cell viability was measured using MTS-based assay. a, compounds 1, 5, 6; b, compounds 7-10. Chemical structure of the compounds was shown in Fig. 1-2. Data represent the mean ± SE of at least three independent experiments. DMSO was used as a control, and BBGC as a positive control.

Table 2-1. IC₅₀ values of isoflavone compounds 1, 5-10 regarding the proliferation of HL-60 cells.

Compounds	IC ₅₀ (μM)
1	46.4
5	43.4
6	>50
7	37.9
8	>50
9	>50
10	13.4
BBGC	3.6

The IC₅₀ value of a compound is defined as the concentration of the compound required to reduce viability by 50% compared with the vehicle alone. Values were estimated from Fig. 2-2. Chemical structure of the compounds are shown in Fig. 1-2. BBGC was used as a positive control.

2. 細胞内及び培養上清中の MG

第1章で述べたように、イソフラボン骨格のA環とB環にある二つのプレニル基を有する isolupalbigenin (10) は、精製組換えヒト GLO I に対して強い阻害活性 (IC_{50} 値、 $4.1 \mu\text{M}$) を示したことから、isolupalbigenin (10) の細胞増殖阻害活性は GLO I 活性の阻害と関係していることが示唆された。そこで細胞内の GLO I の阻害を検証するため、isolupalbigenin (10) と BBGC で処理した HL-60 細胞の細胞溶解液と培養液中の MG 濃度を測定した。 $30 \mu\text{M}$ の isolupalbigenin (10) または $10 \mu\text{M}$ の BBGC で HL-60 細胞を処理したときの細胞培養液中の MG は $30 \mu\text{M}$ isolupalbigenin (10) では $0.23 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ BBGC においても $0.23 \pm 0.01 \mu\text{M}$ であった (Fig. 2-3)。一方、細胞溶解液中の MG はごくわずかしき検出されなかった。これらの結果は、isolupalbigenin (10) は *in vitro* における精製 GLO I 酵素を用いた実験だけでなく、HL-60 細胞内においても GLO I を阻害し、生成された MG は速やかに細胞から培養液中に放出されることが強く示唆された。

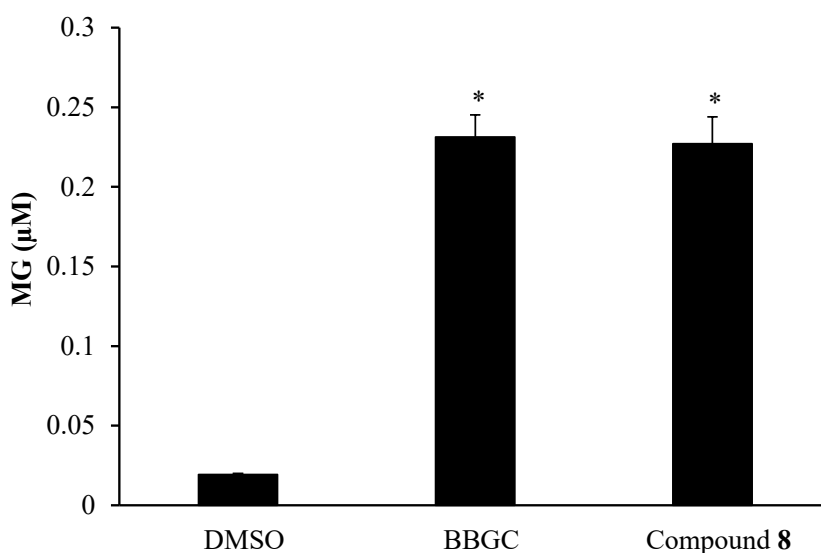


Fig. 2-3 MG accumulation in the culture medium of HL-60 cells treated with DMSO, BBGC or isolupalbigenin.

HL-60 cells were treated with DMSO (control), BBGC ($15 \mu\text{M}$), or isolupalbigenin ($30 \mu\text{M}$) for 24 h at 37°C . The concentration of MG in the culture medium was measured by HPLC/UV after derivatized with *o*-phenyldiamine. Data represent the mean ($\pm$ SE) of three independent experiments, and were analyzed for significance by One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. Significance, * $p < 0.01$ vs. control.

3 カスパーゼ活性の測定

次にこれらの化合物によって誘導される細胞死がアポトーシスによるものかどうかを検討した。アポトーシスの実行を担うのは、保存されたアスパラギン酸残基特異的システインプロテアーゼであるカスパーゼのファミリーであり、それらはいずれも前駆体として生合成された後、タンパク質の限定分解によって活性化される。一般に、アポトーシスには大きく二つの経路があり、その一つは外因性（もしくはデスレセプター）経路で、アポトーシスはカスパーゼ-8の活性化を伴うデスレセプターによって媒介される。もう一つは内因性（もしくはミトコンドリア）経路で、DNA 損傷、小胞体ストレス、活性酸素種（ROS）生成、複製ストレス、微小管の変化や有糸分裂の欠陥などの多様なシグナルがミトコンドリア内から細胞質へのシトクロム c の放出を導き、アポトソームの形成およびカスパーゼ 9 の活性化を促進する。どちらの経路も、カスパーゼ-8 と-9 の活性化の後、アポトーシスの実行を担っているカスパーゼ 3 が活性化されアポトーシスが進行する⁷⁹⁾ことから、アポトーシスのマーカーとしてカスパーゼ 3 の活性を測定した。その結果、Fig. 2-4 に示すように isolupalbigenin または BBGC で処理した HL-60 細胞ではいずれも時間依存的に有意なカスパーゼ 3 活性の増加が見られ、処理後 6 時間において最大に達した。このことは isolupalbigenin が HL-60 細胞でアポトーシスを誘導したことを示唆している。

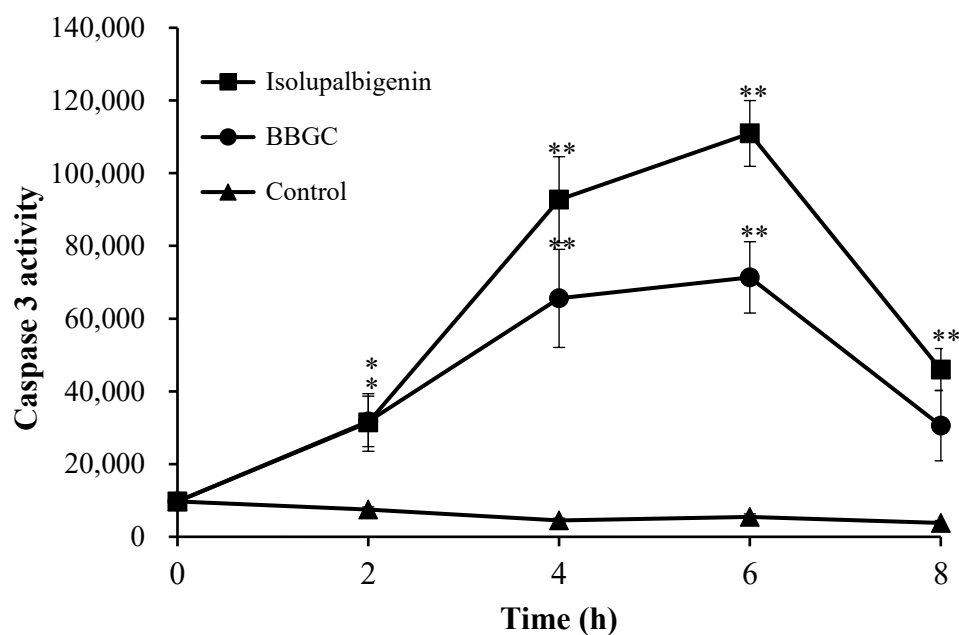


Fig. 2-4 Induction of caspase 3 activity in HL-60 cells treated with DMSO, BBGC or isolupalbigenin.

HL-60 cells were treated with DMSO, BBGC (15 μ M) or isolupalbigenin (50 μ M) for the indicated times. Caspase 3 activity was measured using the caspase-3 fluorometric assay kit. Caspase 3 activity is expressed as an arbitrary unit of fluorescence intensity in proportion to the reaction product. Data represent the mean ($\pm$ SE) of four independent experiments, and were analyzed for significance by One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. Significance, * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. control.

第四節 考察

プレニル化された化合物は、興味深い生物学的、薬理学的特性を持つことが知られている³³⁾。たとえば、大豆 (*Glycine max*) から単離されたプテロカルパンの glyceollin 類は、プレニル基を有する化合物が強力な抗酸化作用、抗炎症作用ならびに抗エストロゲン活性を有することが示されている⁸⁰⁾。naringenin のエストロゲン様活性や luteolin のメラニン合成阻害活性は、プレニル基の導入によってその効果が増強することが報告されている^{81,82)}。これは、プレニル基により疎水性が高まり、膜での取り込みやターゲットタンパク質との相互作用がより行われやすくなったためと推測される³³⁾。今回の実験で使用した化合物の中で、プレニル基を二つ有する isolupalbigenin (化合物 10) が HL-60 細胞に対する最も強い細胞増殖阻害活性を示した。このことから、作用の違いにはプレニル基などのかさ高い疎水性基の存在が寄与していると考えられる。しかし、プレニル基が一つの化合物 5 のヒト GLO I に対する阻害活性 ($IC_{50}=5.0 \mu M$) は化合物 10 ($IC_{50}=4.1 \mu M$) と同等であったが、細胞増殖阻害活性については化合物 10 ほどの強さを示さなかった。プレニル基を一つ有するもう一つの化合物 8 の GLO I に対する阻害活性 ($IC_{50}=9.3 \mu M$) は化合物 10 や 5 に次ぐ強さであったが、細胞増殖阻害活性は弱かった ($IC_{50}>50 \mu M$)。これらのことから、プレニル基が複数あることが重要であることが示唆された。

Takasawa らは、myricetin、quercetin、luteolin などの天然フラボノイドはいずれも C-4 位にカルボニル基と C-5 位にヒドロキシ基を共通にもっており、それらは MG と GLO I の酵素反応中間体の遷移構造に類似していることから、ヒト GLO I に対する効果的な阻害剤であり、HL-60 細胞に対して細胞増殖阻害活性を示すことを報告している⁵⁸⁾。彼らの報告によると、天然由来フラボノイドの中で myricetin は、ヒト GLO I に対して最も強い酵素阻害活性ならびに HL-60 細胞に対する強い細胞増殖阻害活性を示し、B 環のヒドロキシ基がヒト GLO I に対する阻害効果に貢献していると述べている。今回の研究で使用した 7 種のイソフラボン類は、いずれもフラボノイドと同様に C-4 位のカルボニル基と C-5 位のヒドロキシ基を有している。さらにいずれの化合物も B 環の一つのヒドロキシ基は C-4' 位に位置しているにもかかわらず GLO I 阻害活性や HL-60 に対するアポトーシス誘導活性に違いが見られた。

本研究では、HL-60 細胞において isolupalbigenin が GLO I 活性を阻害し、GLO I 阻害剤の BBGC と同様に MG の産生と MG の培地中への放出が確認された。また、カスパーゼ 3 活性の経時的な上昇も観察されたことから、アポトーシス誘導が起きている可能性が示唆された。さらに isolupalbigenin による細胞死誘導活性には、2 つのプレニル基の存在が重要であることが示唆された。以上より、isolupalbigenin は抗がん剤の開発に向けたリード化合物の一つとして期待される。

小括

isolupalbigenin は、HL-60 細胞に対して MG の蓄積を引き起こし、さらにカスパーゼ 3

活性を有意に増大したことからアポトーシス誘導活性のあることが明らかになった。しかし、isolupalbigenin の HL-60 細胞に対する IC₅₀ 値は 13.4 μ M であり、既知の GLO I 阻害剤である BBGC (IC₅₀ 値 3.6 μ M) より強力なものではなかった。2 つのプレニル基は HL-60 細胞中の GLO I 阻害に必要で細胞のアポトーシスを誘導したことから、今後 isolupalbigenin の構造をもとに、より有効なリード化合物を見出せる可能性がある。

第三章 ポリビアデイゴ樹皮から単離されたイソフラボン **erypoeigin K** の強力な細胞死誘導活性

第一節 緒言

フラボンとイソフラボン類は、様々な植物や食物中に存在している。これらの多くは、抗菌、抗ウイルス、抗酸化、細胞増殖阻害、アポトーシス誘導、抗腫瘍、抗炎症ならびに、エストロゲン様活性など極めて広範囲に渡る生理活性を有している⁸³⁻⁸⁷。このうち、イソフラボンの抗腫瘍活性に限っても、白血病⁴⁾、リンパ腫⁸⁸⁾、前立腺がん⁸⁹⁾、乳がん⁹⁰⁾あるいは肝がん⁹¹⁾といった様々なタイプの悪性腫瘍の *in vitro* および *in vivo* モデルを使用して抗腫瘍効果を評価することが試みられている。これらのイソフラボンのがん細胞に対する作用機序として、細胞死に関連する遺伝子発現の調節や抗酸化物質の調節、DNA 修復の促進、血管形成や転移の阻害、放射線療法や化学療法剤との併用による相乗作用、エストロゲンやアンドロゲンのシグナル伝達経路を介した細胞周期停止とアポトーシスの誘導などが知られている⁸⁹⁾。

筆者は、これまでにイソフラボンの細胞増殖阻害活性と細胞死誘導活性に焦点を当て、抗がん剤としての新規化合物の開発を目的とした研究を進めてきた。その最初の戦略は、第一章および第二章に述べたとおり、植物から単離した既知または新規のポリフェノール化合物について、それらの GLO I 阻害活性を明らかにすることであった。GLO I は解糖系の副産物である MG の分解と解毒に関わるグリオキサラーゼ系の律速酵素である^{49, 50)}。MG はタンパク質、脂質、核酸などと相互作用し、細胞に対して強い毒性化合物である。GLO I の阻害によって基質である MG の蓄積を引き起こして、様々なタイプの腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導する^{73, 77)}。

第二章では、マメ科植物のポリビアデイゴ (*Erythrina poeppigiana*) 樹皮から単離したプレニル基を有するイソフラボンを中心に検討したが、本章ではイソフラボン骨格の A 環に縮合した特徴的なフラン環をもつ 3 種のイソフラボン、すなわち **erypoeigin K**、**erythrinin C** および **hydroxyerythrinin C** についてヒト白血病細胞株 HL-60 に対する細胞死誘導活性について検討した。さらに、正常細胞であるヒト末梢血リンパ球に対する **erypoeigin K** の作用についても検討した。

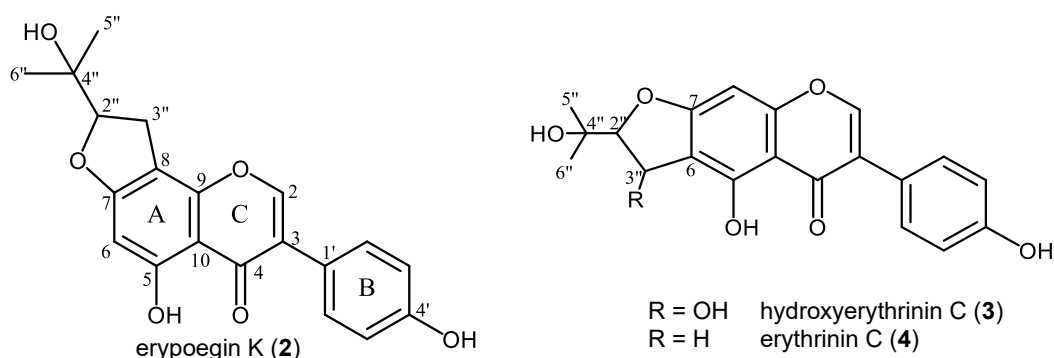


Fig. 3-1 Chemical structures of erypoegin K, hydroxyerythrinin C and erythrinin C.

The numbering system and the A, B, and C rings characteristic of isoflavones are shown in the erypoegin K structure. Erythrinin C is a regioisomer of erypoegin K with respect to the location of the furan ring in the ring A.

第二節 実験方法

1. erypoegin K、hydroxyerythrinin C および erythrinin C の精製

erypoegin K (2)、hydroxyerythrinin C (3) および erythrinin C (4) の化学構造は Fig.3-1 に示した。これらの化合物は、第一章に述べた方法に従って精製した。ポリビアデイゴ樹皮からアセトン抽出、シリカゲルクロマトグラフィー、分取型逆相 HPLC を用いて精製し、得られた化合物の純度は逆相 HPLC を用いて純度 99%以上であることを確認した。

2. HL-60 細胞の培養

第二章 2-2 と同様に行った。

3. ヒト末梢血リンパ球の培養

ヒト末梢血リンパ球は、Percoll-Hypaque 密度勾配法⁹²⁾による Percoll isolation kit (Lymphoprep, Axis-Shield, Oslo, Norway) を用い、製品の使用マニュアルに従って行った。単離したリンパ球は、10% FBS、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin を添加した RPMI-1640 培養液中で 5% CO₂ を含む気相下、37℃で 24 時間前培養した。

4. 細胞生存率の測定

第二章 2-3 と同様に行った。

カスパーゼ 3 阻害剤を加えた実験では、erypoegin K を加える 2 時間前にカスパーゼ 3 阻害剤 Z-DEVD-FMK (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) を終濃度 100 µM になるように培養液に加えた。

5. カスパーゼ活性の測定

第二章 2-5 と同様に行った。

6. 核の凝縮の検出

HL-60 細胞を 24-well プレートに 8.0×10^5 cells/well で播種した後、終濃度 $10 \mu\text{M}$ になるように erypoegin K を添加し、 37°C で 6 時間インキュベートした。細胞を 1.5 mL チューブに移し取り、Hoechst 33342 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を加え (終濃度 $14.3 \mu\text{g/mL}$)、 37°C で 30 分間インキュベートした。次いで、等量の 10% パラホルムアルデヒド/PBS を加え、室温で 30 分間静置することで細胞を固定した後、遠心 ($153 \times g$, 6 分間) して細胞を集め、PBS で 2 回洗浄した。スライドグラスに VECTASHIELD™ 液 (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) でマウントした後、蛍光顕微鏡で観察した (励起波長 352 nm 、蛍光波長 461 nm ; Zeiss Axiophoto2, Carl Zeiss, Jena, Germany)。

7. ゲノム DNA 断片化の検出

ゲノム DNA の断片化は Apoptosis Ladder Detection Kit Wako (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いて製品の使用マニュアルに従って行った。すなわち、HL-60 細胞を 3.5 cm ディッシュに 5×10^5 cells/dish で播種した後、終濃度 $10 \mu\text{M}$ になるように erypoegin K を添加し、 37°C で 10 時間インキュベートした。細胞を 1.5 mL チューブに移し取り、遠心 ($153 \times g$, 6 分間) して細胞を集め、PBS で 1 回洗浄した。いずれもキットに含まれる Enzyme Reaction Solution、Enzyme Activate Solution および RNase をあらかじめ混和し、集めた細胞に加えて混和後、 50°C で 30 分間インキュベートした。次いで、DNA Extraction Solution を加えてゲノム DNA を抽出し、転倒混和後、室温にてイソプロパノール沈殿 (等量のイソプロパノール、15 分間、室温) を行い、遠心 ($10,000 \times g$, 5 分間、室温) して沈殿を集めた。70% エタノールで 2 回リンスした後、TE [10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA] に溶解したものを 1.5% アガロースゲル電気泳動後、SYBR™ Green I で染色し、UV トランスイルミネーターで DNA の断片化を検出した。

8. MG の定量

第二章 2-4 と同様に行った。

9. 統計処理

2 群の比較には、Student の t 検定を行い、3 群以上の比較には One-way ANOVA を行った後、Dunnett の多重検定を行い、有意差を調べた (GraphPad Prism 7 version 7.03 for Windows)。 $p < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した。

第三節 結果

1. 3種のイソフラボンの HL-60 細胞に対する生存率に及ぼす影響

HL-60 細胞の生存率に及ぼす erypoegin K (2)、hydroxyerythrinin C (3) および erythrinin C (4) の影響について検討した。HL-60 細胞を様々な濃度の erypoegin K、hydroxyerythrinin C または erythrinin C で、48 時間処理後の細胞生存率を MTS アッセイによって測定した。Fig. 3-2 に示すように、erypoegin K は HL-60 細胞の生存率を著しく減少させることが明らかとなった。IC₅₀ 値は $0.175 \pm 0.004 \mu\text{M}$ で既知の細胞膜透過型 GLO I 阻害剤である BBGC の IC₅₀ 値 ($3.59 \pm 0.10 \mu\text{M}$) と比べ、20 倍以上強力であることが示された (Table 3-1)。一方、フラン環の位置異性体である erythrinin C の IC₅₀ 値は $47.0 \pm 7.8 \mu\text{M}$ で、HL-60 の細胞生存率に及ぼす影響はあまりみられず、hydroxyerythrinin C では $50 \mu\text{M}$ までの処理で細胞生存率に対してほとんど影響がみられなかった。

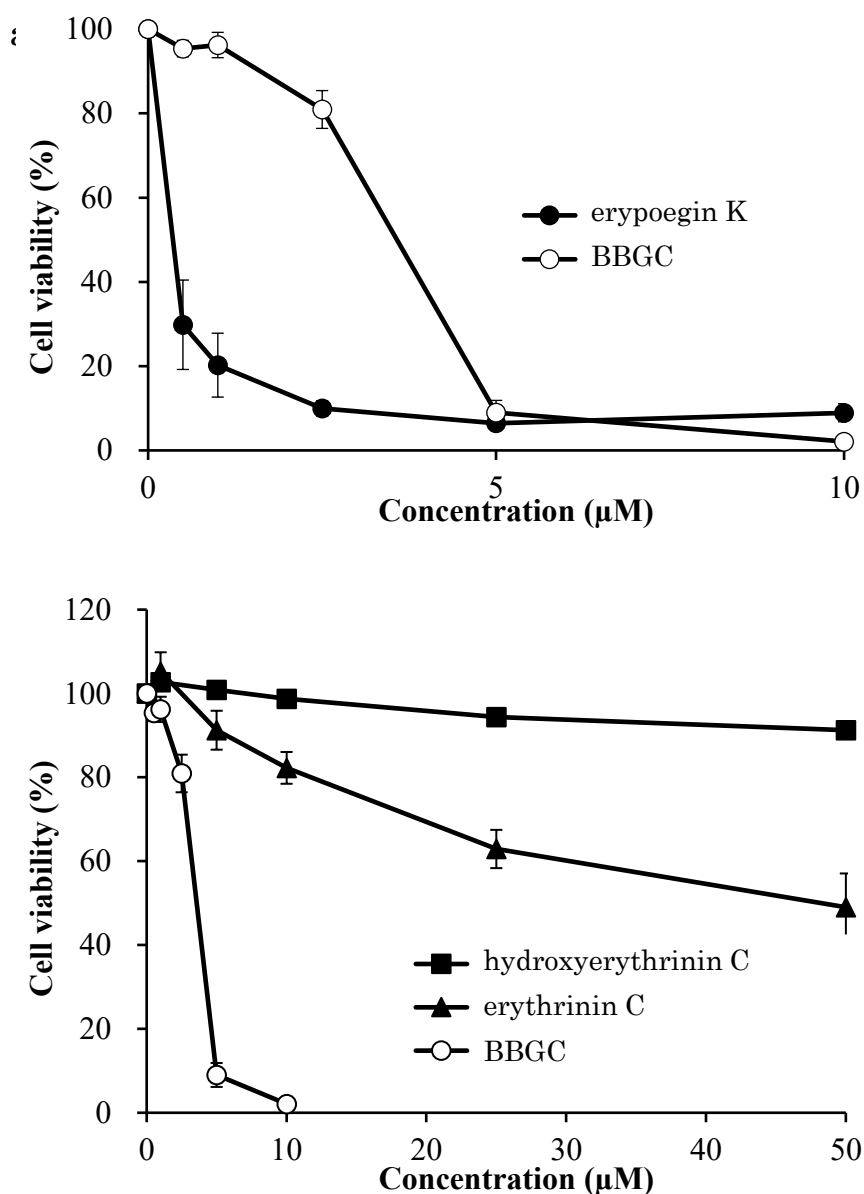


Fig. 3-2 Effects of erypoegin K, hydroxyerythrinin C and erythrinin C on the viability of HL-60 cells.

a, erypoegin K and BBGC. b, erythrinin C and hydroxyerythrinin C. HL-60 cells were treated with various concentrations of the compounds for 48 h. The values are presented as the mean $\pm$ SE of at least three independent experiments. Triplicate measurements were obtained in each experiment. DMSO was used as a control and BBGC was used as a positive control.

Table 3-1. IC₅₀ values of erypogin K, hydroxyerythrinin C, erythrinin C and BBGC on the cell viability of HL-60 cells.

Compound	IC ₅₀ (μM)
erypogin K	0.175 ± 0.004
hydroxyerythrinin C	>50
erythrinin C	47.0 ± 7.8
BBGC	3.59 ± 0.10

The values are presented as the mean ± SE of at least three independent experiments. Triplicate measurements were obtained in each experiment. DMSO was used as a control and BBGC was used as a positive control.

2. erypoegin K の正常リンパ球に対する作用

erypoegin K がヒト白血病細胞株 HL-60 に対して極めて強い細胞死誘導活性を示したことから、次に正常細胞に対する作用について検討した。ここでは正常細胞としてヒト末梢血リンパ球を用いた。その結果、ヒト末梢血リンパ球に対する erypoegin K の細胞死誘導作用は弱く、erypoegin K の細胞死誘導活性は HL-60 細胞などのがん細胞に特異的であることが示唆された (Fig. 3-3)。

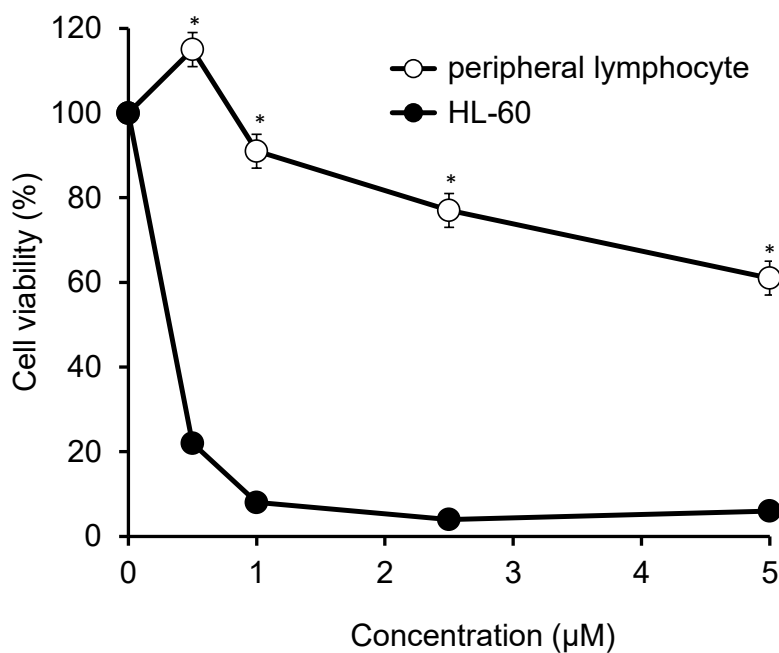


Fig. 3-3 Effect of erypoegin K on the viability of human peripheral lymphocytes and HL-60 cells.

Human peripheral lymphocytes and HL-60 cells were treated with various concentrations (0-5 μM) of erypoegin K for 48 h. The values are presented as the mean ± SE of three independent experiments. Triplicate measurements were obtained in each experiment. The significance of differences was evaluated using Student's *t* test. **p* < 0.01 vs. HL-60 cells.

3. erypoeegin KによるHL-60細胞のアポトーシス誘導

erypoeegin Kが誘導する細胞死がアポトーシスによるものかどうかを明らかにするため、アポトーシスのマーカーであるカスパーゼ3の酵素活性を測定した。カスパーゼ3活性はerypoeegin KまたはBBGC各15 μ Mで処理したHL-60細胞で時間依存的に著しく増加した (Fig. 3-4)。次に、カスパーゼ3の活性化がHL-60の細胞死に直接関連しているかどうかを明らかにするため、カスパーゼ3阻害剤の存在下、erypoeegin KによるHL-60の細胞生存率に及ぼす影響について検討した。その結果、カスパーゼ3阻害剤の添加により、erypoeegin Kで6時間または24時間処理後の細胞生存率が回復する傾向にあった (Fig. 3-5)。このことから、erypoeegin Kによる細胞死のシグナル伝達経路においてカスパーゼ3が関与していることが明らかになった。

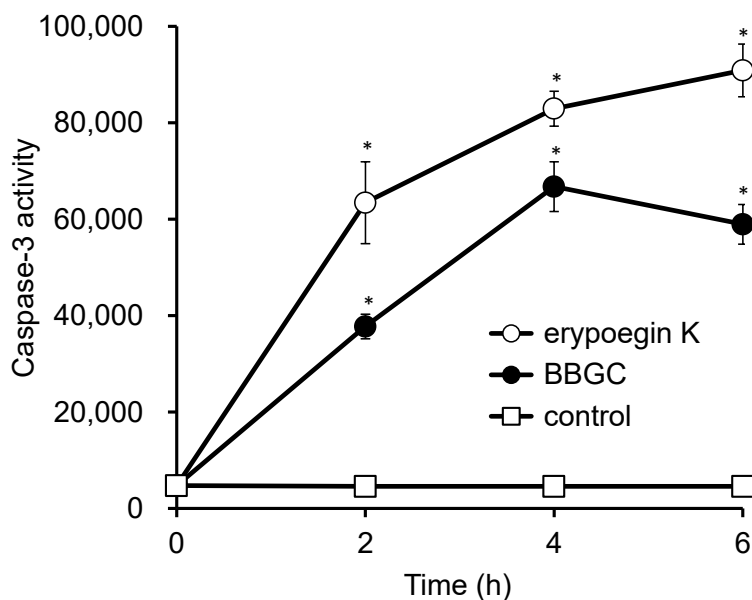


Fig. 3-4 Induction of caspase 3 activity in HL-60 cells treated with DMSO, erypoeegin K or BBGC.

HL-60 cells were treated with DMSO (control) or 15 μ M erypoeegin K or BBGC for the indicated period of time. Caspase 3 activity was measured using the caspase-3 fluorometric assay kit, and expressed as an arbitrary unit of fluorescence intensity in proportion to the reaction product. The values are presented as the mean $\pm$ SE of three independent experiments. Duplicate measurements were obtained in each experiment. The significance of differences was evaluated using the One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. * $p < 0.01$ vs. control

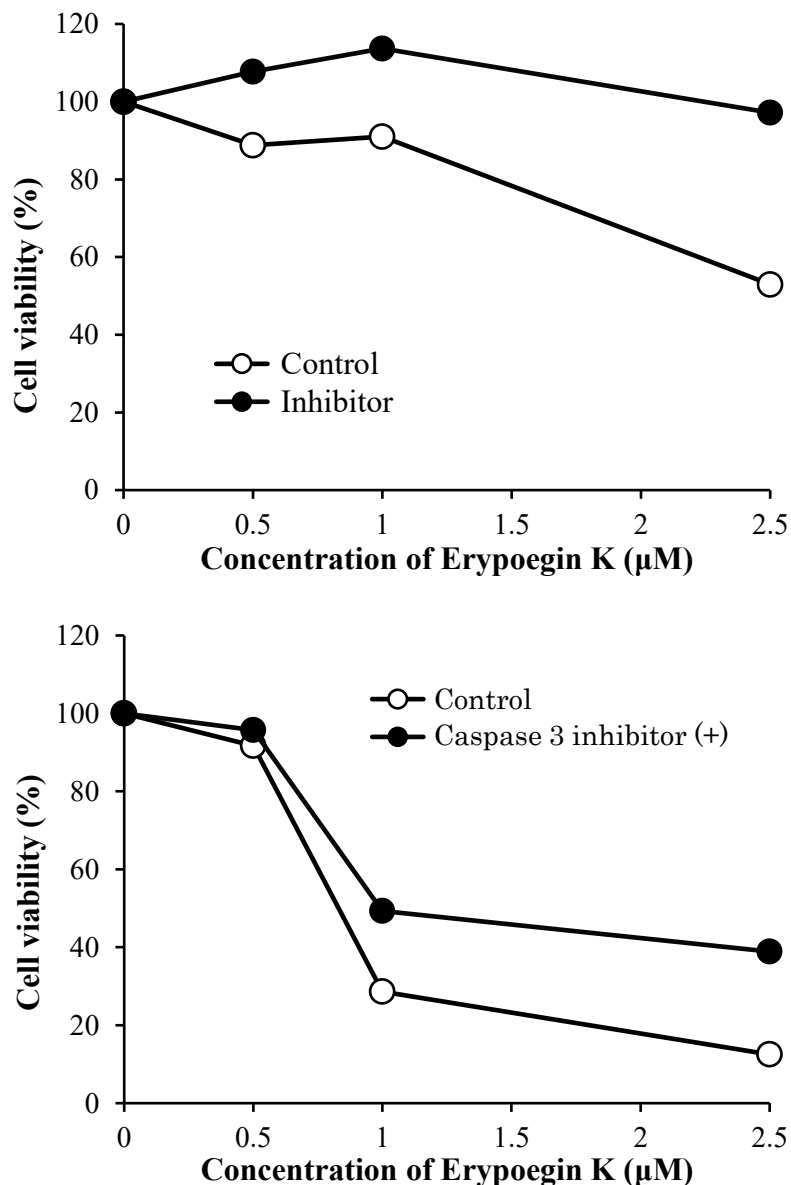


Fig. 3-5 Effect of the caspase 3 inhibitor on the viability in cells treated with erypoegin K for 6 h (a) or 24 h (b).

HL-60 cells were treated with various concentrations of erypoegin K in the presence or absence of 100 μM Z-DEVD-FMK. The inhibitor was added 2 h prior to treatment with erypoegin K. Each measurement was made in duplicate. Open circle: no caspase 3 inhibitor; closed circle: 100 μM caspase 3 inhibitor.

さらに、アポトーシス細胞に特徴的な形態である核の凝縮とゲノム DNA の断片化について検討した。その結果、核の凝縮は 10 μM の erypoegin K で 6 時間処理した細胞で観察された。それに対してコントロール (DMSO 処理) の細胞では核の断裂は全く観察されなか

った (Fig. 3-6)。また、アポトーシスに特徴的なゲノム DNA の規則的な切断パターン (DNA ラダー) について検討したところ、10 μ M の erypoegin K で 10 時間処理した細胞から抽出したゲノム DNA のアガロースゲル電気泳動によって特徴的な DNA ラダーが観察された (Fig. 3-7)。これらの結果から、erypoegin K は HL-60 細胞においてアポトーシス経路を活性化させることによって細胞死を誘導していることが明らかとなった。

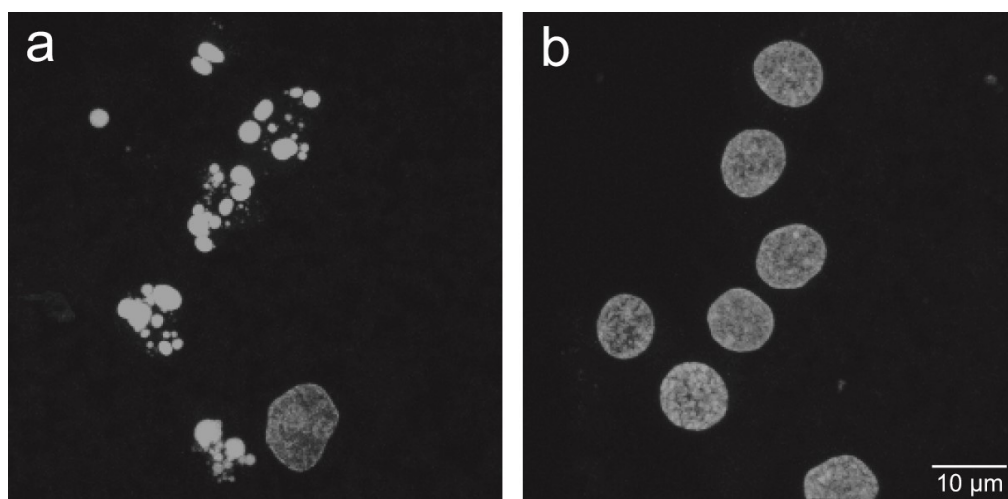


Fig. 3-6 Detection of nuclear condensation.

HL-60 cells were treated with 10 μ M erypoegin K or DMSO for 6 h. The nuclei were stained with Hoechst 33342 and fixed with 5% paraformaldehyde.

a, erypoegin K; b, DMSO (control)

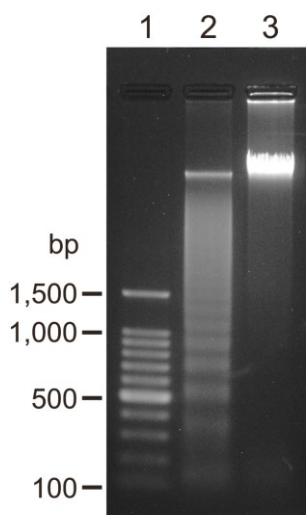


Fig. 3-7 Detection of apoptotic genome DNA ladder.

HL-60 cells were treated with 10 μ M erypoegin K or DMSO for 10 h. Genomic DNA was extracted from the cells using Apoptosis Ladder Detection Kit Wako and separated by 1.5% agarose gel electrophoresis.

Lane 1, 100 bp size marker; Lane 2, erypoegin K; Lane 3, DMSO (control)

4. MG の生成と蓄積

第一章において erypoegin K は精製ヒト組換え型 GLO I の酵素活性を阻害することを示した。そこで erypoegin K が実際に細胞内 GLO I を阻害しているかどうかを明らかにするために erypoegin K で処理した HL-60 細胞における MG の生成について検討した。その結果、MG は 10 μ M の erypoegin K で 24 時間処理した HL-60 細胞の溶解液では検出限界以下であったが、同様に処理した培養液中には高濃度の MG が検出され、その量は 10 μ M の BBGC で同様に処理したときの値の約 3.5 倍高濃度であった (Fig. 3-8)。これらの結果は erypoegin K が細胞内 GLO I 活性を阻害して MG を産生し、培養液中に分泌、蓄積したものであると考えられた。一方、細胞死誘導活性が弱かった erythrinin C においては MG の蓄積は認められなかった。すなわち、MG の生成と細胞死誘導活性には明らかな関連性のあることが示された。

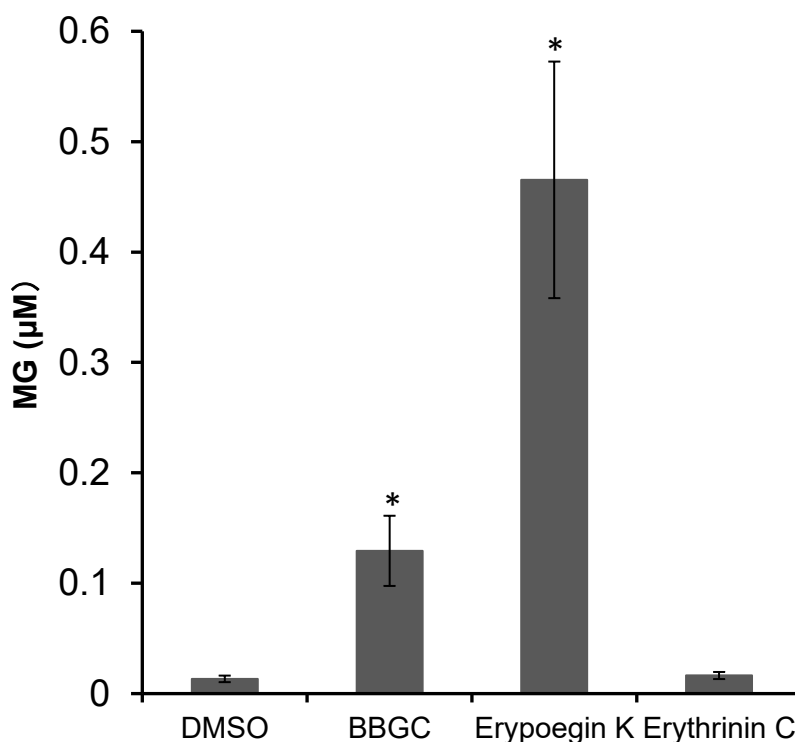


Fig. 3-8 MG accumulation in the culture medium of HL-60 cells treated with DMSO, BBGC, erypoegin K or erythrinin C.

HL-60 cells were treated with DMSO (control) or 10 μ M BBGC, erypoegin K, or erythrinin C for 24 h at 37°C. The concentration of MG in the culture medium was measured using HPLC/UV. The values are presented as the mean $\pm$ SE of three independent experiments. Duplicate measurements were obtained in each experiment. The significance of differences was evaluated using the One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. * $p < 0.05$ vs. control.

第四節 考察

ボリビアデイゴ樹皮から単離した **erypoeigin K**、**hydroxyerythrinin C** および **erythrinin C** のヒト白血病細胞株 **HL-60** に対する影響を調べた結果、**erypoeigin K** は非常に強力な細胞死誘導活性を示した。一方、A 環に縮合したフラン環の位置が異なる **erythrinin C** は、細胞死誘導活性が大きく減少し、さらに 3"位にヒドロキシ基を持つ **hydroxyerythrinin C** では細胞死誘導活性は認められなかった。細胞死誘導に直接関与すると考えられる **MG** の蓄積については、**HL-60** 細胞に **erypoeigin K** を作用させた時、**BBGC** を作用させた時よりも高濃度の **MG** が検出されたのに対して、**erythrinin C** を作用させた時はコントロール (**DMSO**) と同等であった。これらのことから細胞死誘導活性には、フラン環の位置が重要であることが示唆された。**erythrinin C** の 3"位にヒドロキシ基が付加した **hydroxyerythrinin C** は、**HL-60** 細胞の生存率に対する影響はほとんどみられなかった。ヒドロキシ基の付加による構造の変化が影響していると考えられる。

MG は主に解糖の代謝副産物として形成される反応性の高いジカルボニル化合物である⁷³⁾。これまでに細胞外から導入された **MG** はタンパク質、脂質、DNA などと容易に反応してフリーラジカルの細胞内産生の引き金となることが報告されている^{93, 94)}。また、フリーラジカルはその細胞毒性と密接に関連している⁹⁵⁾。実際、外部から培養液に加えた **MG** がヒト肝がん細胞株 **HepG2**⁹⁶⁾、ヒト骨芽細胞株⁹⁷⁾、さらにヒト白血病細胞株 **HL-60**⁹⁸⁾や **U937**⁹⁹⁾細胞でアポトーシスを誘導することが報告されている。

培養液に添加した **MG** による細胞毒作用に関する研究は、**mM** またはそれ以下の濃度範囲で行なわれている⁹⁶⁻⁹⁹⁾。筆者は 10% **FBS** を含む **RPMI-1640** 培養液に 1 **mM** の **MG** を添加して 24 時間静置した場合、培養液中の遊離 **MG** 濃度は 1 μM 程度に低下することを見出している。これは **MG** が培養液中に存在するタンパク質やアミノ酸と共有結合するためと考えられる。したがって、**erypoeigin K** で処理した細胞から放出された **MG** 量は **Fig. 3-8** で示されるよりもさらに高いレベルである可能性がある。

erypoeigin K をヒト末梢血リンパ細胞に作用させたところ、**HL-60** 細胞に作用させたときのような顕著な細胞死誘導活性を示さなかった。このことより、がん細胞に対してより選択的に細胞死を誘導する可能性が示唆された。

小括

ボリビアデイゴから単離された化合物である **erypoeigin K** はヒト白血病細胞株 **HL-60** に対して非常に強力な細胞死誘導活性 ($\text{IC}_{50} = 175 \text{ nM}$) を示すことが明らかになった。この作用は培養液中への **MG** の蓄積を伴い、ミトコンドリアを介したアポトーシスによるものであることが示唆された。一方、ヒト末梢血リンパ球に対する **erypoeigin K** の細胞毒性は低く、白血病細胞株である **HL-60** 細胞に対してより特異的であった。これらの知見は、**erypoeigin K** ががん細胞に選択的ながん治療薬開発のための基礎となる可能性がある。

第四章

(*S*)-erypoegin K の HL-60 細胞に対するエナンチオ選択的なアポトーシス誘導活性

第一節 緒言

第一章から第三章でポリビアデイゴ樹皮から単離した 10 種のイソフラボンの中で、erypoegin K が HL-60 細胞に対して最も強力な細胞死誘導活性とアポトーシス誘導活性を示すことを記述した。また、erypoegin K は正常ヒト末梢血リンパ球に対する細胞死誘導活性をほとんど示さなかったため、その作用はがん細胞に選択的であることが示唆された。

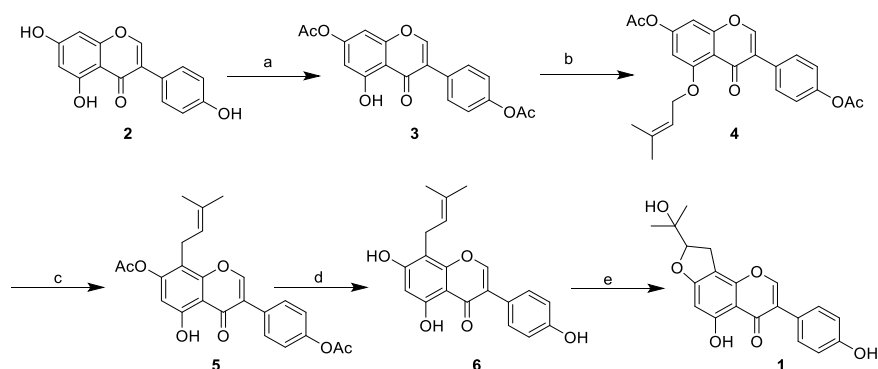
erypoegin K は、イソフラボンの A 環に縮合したフラン環の C-2”がキラル炭素になっており(*R*)-と(*S*)-erypoegin K の 2 つの光学異性体が存在しう。実際、ポリビアデイゴから単離した erypoegin K の比旋光度 $[\alpha]_D^{23}$ はゼロであることから、天然の植物中においては(*R*)-および(*S*)-光学異性体が 50%ずつからなるラセミ体として存在していると考えられる。

そこで本章では、(*R*)-、(*S*)-erypoegin K の 2 種の光学異性体の生理活性を詳細に検討するため、また、マウス個体を用いた *in vivo* での抗腫瘍活性を評価するため、genistein を出発材料として (*RS*)-erypoegin K を半合成することを試みた。合成した標品と天然由来の標品が同じ化学構造をもち生物学的に同等であることを確認した後、キラルカラムを用いて HPLC により両光学異性体を光学分割した。精製した 2 つの光学異性体を用いて、HL-60 細胞に対するそれぞれの細胞死誘導活性およびアポトーシス誘導活性について検討した。

第二節 実験方法

1. (*RS*)-erypoegin K の合成

(*RS*)-erypoegin K の半合成は、共同研究者の東北大学理学部（現 信州大学繊維学部）浅尾直樹教授らによって行われた。出発材料として genistein を用い、5 つの工程で(*RS*)-erypoegin K が合成された (Scheme 4-1)。



Scheme 4-1. Semisynthesis of erypoeigin K

Reagents and conditions : (a) Ac₂O, Pyridine, rt, 24 h, 86%; (b) 3-methyl-2-buten-1-ol (1.5 equiv), DIAD (1.8 equiv.), PPh₃ (1.8 equiv.), CH₂Cl₂, -10 to rt, 8 h, 78%; (c) Eu(fod)₃ (0.1 equiv.), CHCl₃, 60 °C, 20 h, 61%; (d) 10% aq. NaHCO₃, MeOH:THF (1:1), 60 °C to rt, 12 h, 79%; (e) m-CPBA (1.3 equiv.), K₂CO₃, CH₂Cl₂, rt, 12 h, 71%.

1.1 一般的方法

genistein は LC Laboratories (Woburn, MA, USA) から購入した。すべての反応は、オーブンで乾燥したガラス容器で、アルゴン気流下マグネティックスターラーで攪拌して行った。空気と反応性の高い試薬や溶液は容器にゴム栓をしてシリンジを用いて加えた。反応のモニタリングはシリカゲルプレート (60 F254, Merck, Darmstadt, Germany) を用いた TLC により行った。検出は UV ライトまたは KMnO₄ で浸漬した後、加熱することによって行った。すべての化合物はシリカゲル 60N (spherical, neutral, 40–100 μm; KANTO Chemical Co, Tokyo, Japan) またはシリカゲル 60 (Merck) を用いたカラムクロマトグラフィーで精製した。融点は自動融点測定装置 MPA100 (Stanford Research Systems, Sunnyvale, CA, USA) で測定した。IR スペクトルは FT/IR-6600 (JASCO, Tokyo, Japan) で測定した。¹H-NMR スペクトルは JNM AL 400 (400 MHz, JEOL, Tokyo, Japan) で測定した。¹H-NMR スペクトルについて、化学シフトは CDCl₃ : 7.26 ppm または acetone-*d*₆ : 2.04 ppm とし、積分値、多重度 (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, および br = broad signal) およびカップリング定数 (Hz) を示した。¹³C-NMR スペクトルは JNM AL 400 (100.5 MHz, JEOL) を使い、プロトンデカップリングにて測定し、化学シフトは CDCl₃ : 77 ppm または acetone-*d*₆ : 29.8 ppm とした。HRMS は、APEXIII (Bruker, Billerica, MA, USA) または JMS-700 MStation (JEOL) により測定した。

1.2 4-(7-acetoxy-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl) phenyl acetate (3)の合成

3 の合成は、Maharik らの方法を改変して行った¹⁰⁰。ピリジン 40 mL に溶解した

genistein (**2**) (2 g, 7.4 mmol) 溶液に無水酢酸 (14.8 mmol) をアルゴン気流下、0℃で滴下した。遮光して室温で 24 時間攪拌し、生じた暗色の溶液を氷冷した水に注ぎ入れた。沈殿した黄色の固体をろ過して乾燥した後、acetone/EtOH (3:1) で再結晶して淡黄色固体の **3** (2.25 g, 6.35 mmol) を収率 86% で得た。mp 203–206 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3077, 1751, 1654, 1589, 1542, 1490, 1251, 1128, 1047, 990, 897; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.74 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.54 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.76 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 2.33 (s, 3H), 2.32 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 180.9, 169.4, 168.3, 162.4, 156.8, 156.0, 153.4, 150.9, 130.0, 127.9, 123.6, 121.9, 109.4, 105.6, 100.9, 21.2, 21.1; HRMS calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_7$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 377.06317, found 377.06312.

1.3 4-(7-acetoxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl) phenyl acetate (**4**) の合成

4 の合成は、Maharik らの方法を改変して行った¹⁰⁰⁾。**3** (500 mg, 1.41 mmol) と triphenylphosphine (PPh_3 , 666 mg, 2.54 mmol) の混合物を CH_2Cl_2 (10 mL) に溶解し、10 分間 25℃ でソニケートした。この溶液に CH_2Cl_2 (5 mL) に溶解した 3-methyl-2-buten-1-ol (182 mg, 2.11 mmol) と diisopropyl azodicarboxylate (DIAD, 513 mg, 2.54 mmol) を -10℃ で 10 分以上かけて滴下した。次に、混液を -10℃ で 2 時間攪拌し、さらに室温で 6 時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、得られた濃い黄色の液体をシリカゲルクロマトグラフィーを用い EtOAc/hexane (20:80) で溶出し、粗固体 **4** を得た。さらに EtOH による再結晶を行い、白色固体の **4** (464 mg, 1.09 mmol) を収率 78% で得た。mp 164–168 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 2913, 1750, 1611, 1542, 1477, 1304, 1250, 1173, 1112, 1045, 1012, 908; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.81 (s, 1H), 7.55 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.11 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.83 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.60–5.53 (m, 1H), 4.64 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 1.70 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 174.9, 169.4, 168.3, 160.6, 158.6, 154.3, 150.9, 150.5, 138.1, 130.3, 129.4, 125.8, 121.4, 118.8, 113.4, 102.8, 102.3, 66.7, 25.7, 21.1, 21.0, 18.3; HRMS calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_7$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 445.12577, found 445.12574.

1.4 4-(7-acetoxy-5-hydroxy-8-(3-methylbut-2-en-1-yl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl) phenyl acetate (**5**) の合成

5 の合成は、Maharik らの方法を改変して行った¹⁰⁰⁾。脱水クロロホルム (2 mL) 中に溶解した **4** (1 g, 2.36 mmol) と $\text{Eu}(\text{fod})_3$ (246 mg, 0.236 mmol) を穏やかに還流しながら、アルゴン気流下攪拌しながら、24 時間加熱した。溶媒を減圧除去し、得られた濃い黄色の液体をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーを用い EtOAc/hexane (25:75) で溶出し、淡黄色の固体として、**5** (610 mg, 1.44 mmol) を収率 61% で得た。mp 143–145 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3065, 2932, 1742, 1686, 1654, 1647, 1482, 1357, 1206, 1175, 1058, 923, 880 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.63 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.56 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.18

(d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.59 (s, 1H), 5.15–5.07 (m, 1H), 3.38 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 1.78 (s, 3H), 1.76 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 181.3, 169.4, 168.4, 159.8, 154.8, 154.6, 153.7, 150.9, 132.7, 130.0, 128.0, 123.4, 121.9, 120.9, 112.9, 109.9, 106.4, 25.6, 22.5, 21.1, 20.9, 17.8; HRMS calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_7$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 445.12577, found 445.12575.

1.5 lupiwighteone (**6**)の合成

6の合成は、Maharik らの方法を改変して行った¹⁰⁰⁾。MeOH/THF (1:1, 25 mL)に懸濁した **5** (1 g, 2.36 mmol) に 10% NaHCO_3 (50 mL)水溶液を加えた。混液を 60°Cで 2 時間攪拌し、さらに室温で一晩攪拌した。減圧下で溶媒を半分まで留去し、2% HCl 水溶液 (5 mL)を加えた。次に、混液を EtOAc 抽出し、有機溶媒層を合わせて MgSO_4 で脱水後、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた黄色の固体をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーを用いて $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (50:1)で溶出、精製し、白色固体 **6** (632 mg, 1.86 mmol)を収率 79%で得た。mp 134–136 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3527, 3173, 2913, 1660, 1614, 1514, 1365, 1254, 1178, 1064, 829; ^1H -NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ : 12.98 (s, 1H), 9.14 (brs, 2H), 8.24 (s, 1H), 7.47 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.36 (s, 1H), 5.28–5.20 (m, 1H), 3.43 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.65 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ : 206.3, 181.9, 162.1, 161.4, 158.3, 156.2, 154.3, 132.0, 131.1, 123.6, 123.1, 123.0, 115.9, 107.1, 106.2, 99.3, 25.8, 21.8, 17.8; HRMS calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 361.10464, found 361.10460.

1.6 (*RS*)-erypoeigin K (**1**)の合成

6 (169 mg, 0.5 mmol)を CH_2Cl_2 (15 mL)に溶解したものに K_2CO_3 (207 mg, 1.5 mmol)と metachloroperoxybenzoic acid (*m*-CPBA, 160.24 mg, 0.65 mmol)を加えた。反応液をアルゴン気流下室温で12時間攪拌した。反応液をろ過後の残渣を数回 CH_2Cl_2 で洗浄した。ろ液を減圧留去し、得られた粗生成物をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーを用いてEtOAc/hexane (40:60)で溶出、精製し、**1** (125 mg, 0.35 mmol)を収率 71%で得た。mp 251–254 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3487, 3403, 3281, 3078, 2978, 1900, 1831, 1671, 1615, 1575, 1479, 1252, 1170, 1068, 958, 827; ^1H -NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ : 13.23 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.40 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.20 (s, 1H), 4.89–4.83 (m, 1H), 3.84 (s, 1H), 3.35–3.21 (m, 2H), 1.30 (s, 3H), 1.25 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ : 181.6, 167.6, 164.3, 158.4, 153.9, 153.6, 131.2, 124.0, 123.0, 115.9, 106.2, 104.7, 94.4, 92.7, 71.4, 29.2, 27.1, 25.9; HRMS calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 377.09956, found 377.09954.

(*R*)-erypoeigin K: mp 247–250 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3488, 3403, 3078, 2978, 2696, 1832, 1774, 1671, 1618, 1572, 1479, 1291, 1203, 1252, 1171, 1025, 959, 841, 826.

(*S*)-erypoegin K: mp 246 - 248 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3487, 3406, 3077, 2978, 2929, 2803, 2697, 1900, 1831, 1671, 1619, 1574, 1480, 1291, 1171, 1068, 959, 826.

2. キラルカラム HPLC による(*R*)-、(*S*)-erypoegin K の光学分割

ラセミ体として合成された(*RS*)-erypoegin K は、移動相イソプロパノール/ヘキサン (30 : 70)、流速 4 mL/min、検出 254 nm の条件下、キラルカラム CHIRALPAK AD-H (10 mm $\times$ 25 cm; Daicell, Osaka, Japan) で分離した。これらの条件下で、(*R*)- および(*S*)-erypoegin K の保持時間はそれぞれ 11.4 min と 19.2 min であった。各ピーク画分を分取し、ロータリーエバポレーターによって 40°C で留去した。

3. 比旋光度の測定

サンプルを 1.9 mg/mL の濃度でアセトンに溶解し、25°C における比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ を旋光度計 P-2200 (JASCO, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

4. HL-60 細胞の培養

HL-60 細胞は、第二章 2-2 と同様に行った。

5. カスパーゼ活性の測定

カスパーゼ 3 の測定は、第二章 2-5 と同様に行った。カスパーゼ 9 の活性測定は、Caspase-9 Fluorometric Assay Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) を用いた以外はカスパーゼ 3 と同様に行った。

6. 核の凝縮の検出

HL-60 細胞を、24-well プレートに 8.0×10^5 cells/well で播種した後、終濃度 5 μM の(*S*)- または、(*R*)-erypoegin K を添加し、37°C で 6 時間インキュベートした。以降は、第三章 2-6 と同様に行った。

7. ゲノム DNA 断片化の検出

HL-60 細胞を 3.5 cm ディッシュに 5×10^5 cells/well で播種した後、終濃度 1 μM または 3 μM の(*S*)-、(*R*)-erypoegin K をそれぞれ添加し、37°C で 5 時間インキュベートした。以降は、第三章 2-7 と同様に行った。

8. MG の定量

HL-60 細胞を 6 cm ディッシュ に 1.5×10^6 cells で播種し、37°C で 24 時間プレインキュベートした後、(*S*)-、(*R*)-erypoegin K をそれぞれ終濃度 1 μM または 3 μM になるように添加し、さらに 37°C で 8 時間または 24 時間インキュベートした。以降は、第二章 2-4

と同様に行った。

9. ヒト GLO I 酵素活性測定
第一章 2-8 と同様に行った。

10. 統計処理
第二章 2-7 と同様に行った。

第三節 結果

1. (*RS*)-erypoeegin K の合成

(*RS*)-erypoeegin K (**1**)の半合成は genistein (**2**)を出発材料として Scheme 4-1 に示した 5 段階の反応によって次のように行われた。まず、**2** の選択的アセチル化で 86%の収率で **3** が得られ、**3** は diethyl azodicarboxylate の代わりに diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) を用いた反応条件下、3-methylbut-2-en-1-ol で処理し 73%の収率で **4** が得られた。次いで Eu(fod)₃ を触媒としたクライゼン転位により 61%の収率で **5** を得た後、塩基性条件下で加水分解することにより 81%の収率で **6** が得られた。次に、**6** のプレニル基のエポキシ化に続いて 5-exo-tet 環化反応により五員環の環状エーテルの合成を試みたところ、K₂CO₃ の存在下で *m*-CPBA を反応させることで **1** のラセミ体が 71%の収率で得られた。lupiwighteone (**6**)は genistein から Maharik らの方法¹⁰⁰⁾に従い、4 段階の反応で合成され、収率は 44%であった。

各段階の反応条件と収率は第二節の 1 に詳細に記載した。genistein から erypoeegin K への全収率は 23%であった。合成した erypoeegin K と、天然由来 erypoeegin K の¹H-、¹³C-NMR スペクトルを測定したところ、完全に一致したことから合成 erypoeegin K 標品は天然由来標品と化学的に同等であることが確認された。

2. 合成した(*RS*)-erypoegin K の生理活性

合成した erypoegin K の生理活性は HL-60 細胞の細胞死誘導活性によって評価した。各濃度の合成または天然由来の erypoegin K を用いて 48 時間処理した。合成した erypoegin K は天然由来のラセミ体 erypoegin K と同様、強力な細胞死誘導活性を示し、その濃度—細胞生存率曲線は完全に一致した。どちらの IC₅₀ 値も前章にて記載したように 175 nM であったことから合成 erypoegin K は天然由来標品と生物学的にも同等であることが確認された (Fig. 4-1)。

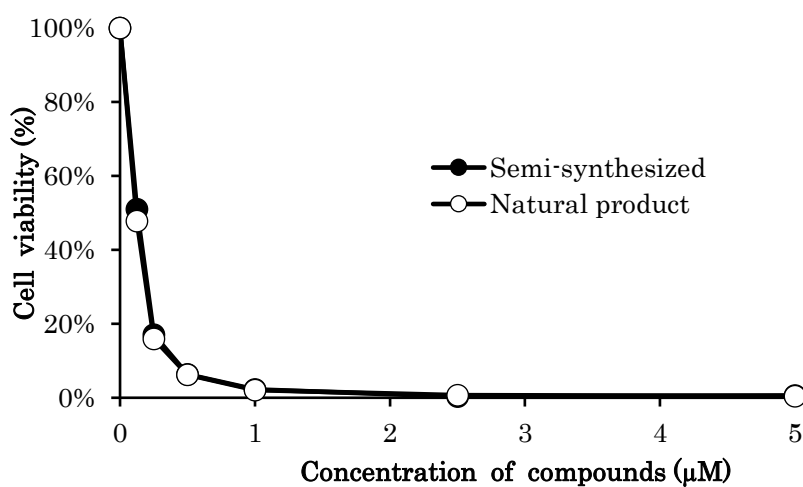


Fig. 4-1 Comparison of anti-proliferative activity of natural and semi-synthesized (*RS*)-erypoegin K.

Human leukemia HL-60 cells were treated for 48 h with various concentrations of (*RS*)-erypoegin K obtained from the natural or semi-synthetic sources. Cell viability was determined using the MTS-based assay.

3. ラセミ混合物から(*S*)-、(*R*)-erypoegin K の光学分割

光学異性体のどちらかまたは両方が生理活性を持つかどうかを明らかにするために、合成したラセミ体のerypoegin Kをそれぞれの光学異性体に分割することを試みた。Fig. 4-2aにキラルカラムを用いてHPLCで分離した光学異性体のクロマトグラムを示す。それぞれの絶対配置はそれらの比旋光度から推定した。すなわち、ピーク1 ($t_R=11.4$ min) とピーク2 ($t_R=19.2$ min) の比旋光度 $[\alpha]_D^{23}$ はそれぞれ -89° 、 $+86^\circ$ であった。Taharaら¹⁰¹⁾はerypoegin KのB環に2'-OHを有するイソフラボン化合物DK-M1 (Fig. 4-2c) について、そのフラン環のC-2''は*R*-配置で左旋性 ($[\alpha]_D^{23} = -76^\circ$) であることを報告している。このことから左旋性を示すピーク1を(*R*)-erypoegin K、右旋性を示すピーク2を(*S*)-erypoegin Kと決定した。Fig. 4-2bに(*R*)-および(*S*)-erypoegin Kの化学構造を示した。

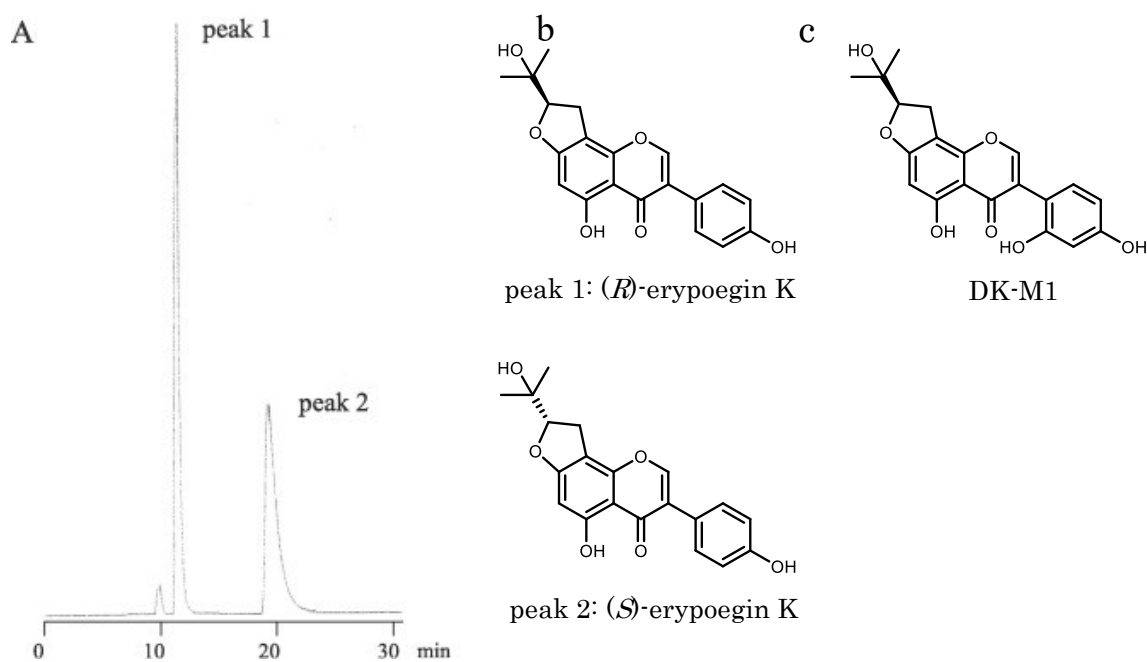


Fig. 4-2. Separation of (*R*)- and (*S*)-erypoegin K optical isomers by HPLC using a chiral column and their chemical structures.

a, (*R*)- and (*S*)-erypoegin K were separated from a semi-synthesized racemic mixture of erypoegin K by HPLC, using a chiral column of CHIRALPAK AD-H (10 mm × 25 cm), under the following conditions: mobile phase, isoPrOH/ hexane (30:70); flow rate, 4 mL/min; absorbance at 254 nm. The peaks were determined to be (*R*)-erypoegin K (peak 1, retention time: 11.4 min) and (*S*)-erypoegin K (peak 2, retention time: 19.2 min). b, Chemical structures of (*R*)- and (*S*)-erypoegin K. c, Chemical structure of DK-M1, which is 2'-hydroxy derivative of (*R*)-erypoegin K.

4. (*S*)-および(*R*)-erypoegin Kの細胞死誘導活性とアポトーシス誘導活性

HL-60細胞の生存率に対する両光学異性体の生理活性について検討した。HL-60細胞を様々な濃度のラセミ体、*R*体、*S*体のerypoegin Kで48時間処理し、細胞生存率をMTSアッセイによって評価した。Fig. 4-3に示すように、(*S*)-erypoegin KはHL-60細胞に対して強力な細胞死誘導活性を示し、そのIC₅₀値は90 nMでラセミ混合物のIC₅₀値 (175 nM) の約1/2であった。これに対して、(*R*)-erypoegin Kは50 μMまで濃度を上げてても細胞死誘導活性を示さなかった。このことから、erypoegin Kの活性体は(*S*)-erypoegin Kであり、(*R*)-erypoegin Kは不活性体であることが明らかとなった。

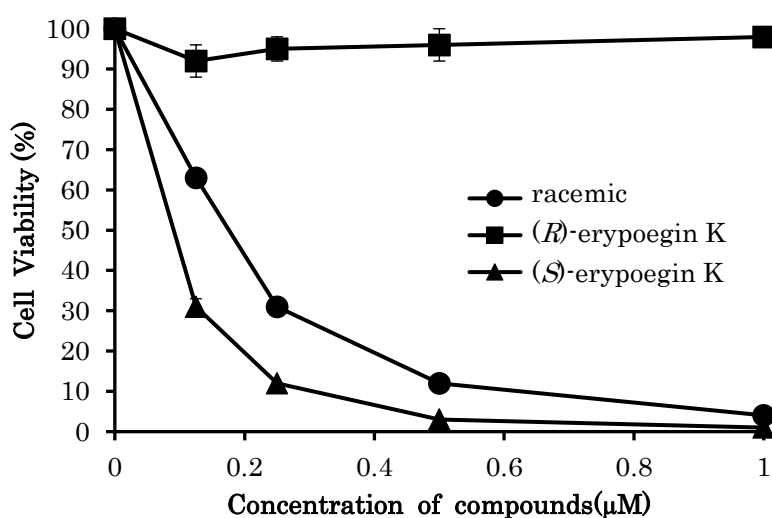


Fig. 4-3 Effects of racemic, (*R*)-, and (*S*)-erypoegin K on HL-60 cell viability.

HL-60 cells (1.2×10^4 cells/ well) were treated with various concentrations of racemic, (*R*)-, or (*S*)-erypoegin K for 48 h. The values are presented as the mean $\pm$ SE of three independent experiments. Triplicate measurements were performed in each experiment.

次に (*S*)-erypoeegin Kによって誘導される細胞死がアポトーシスによるものであることを明らかにするために、アポトーシスの二つの形態的特徴である核の凝縮／断裂とゲノムDNAのラダー形成の有無について検討した。その結果、(*S*)-erypoeegin Kで処理したHL-60細胞では核の凝縮と断裂が観察され (Fig. 4-4a)、(*S*)-erypoeegin K 1 μ M または 3 μ M処理によって約180塩基対の整数倍からなる典型的なゲノムDNAのラダー形成が見られた (Fig. 4-4b)。一方、(*R*)-erypoeegin K処理ではDMSO (コントロール) 処理と同様、このような核の凝縮やDNAラダーの形成は見られなかった (Fig.4-4)。

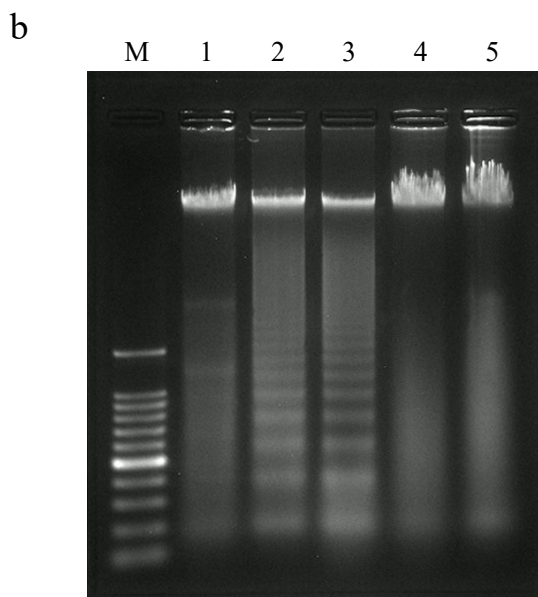
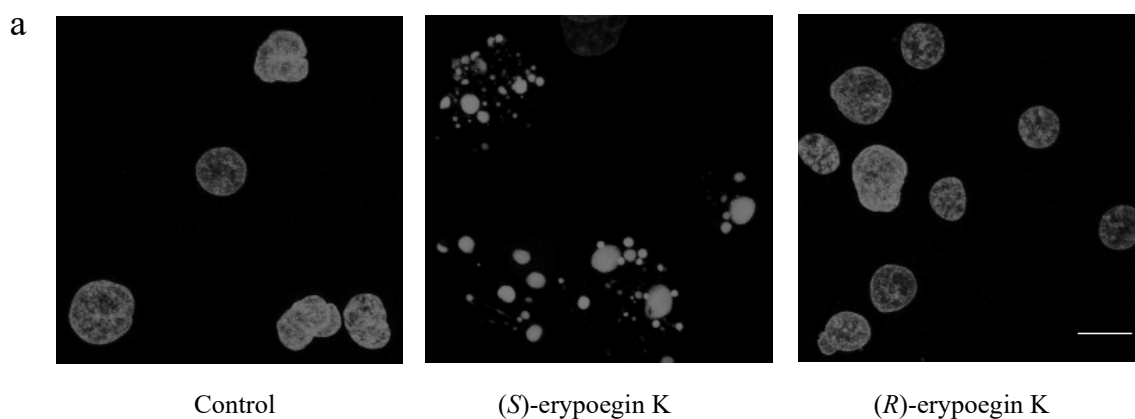


Fig. 4-4 Nuclear condensation/fragmentation and genomic DNA ladder formation.

a, Representative microscopy images of nuclear condensation/fragmentation. HL-60 cells were treated with 5 μ M (*S*)-erypoeegin K or (*R*)-erypoeegin K or DMSO as a control for 6 h, followed by staining with Hoechst 33342.

b, Genomic DNA ladder formation. Genomic DNA was extracted from the cells treated with the test compounds for 5 h and analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. M, 100-bp DNA size marker; Lane 1, DMSO (control); Lane 2, 1 μ M (*S*)-erypoeegin K; Lane 3, 3 μ M (*S*)-erypoeegin K; Lane 4, 1 μ M (*R*)-erypoeegin K; Lane 5, 3 μ M (*R*)-erypoeegin K.

(*S*)-erypoegin Kによる細胞死がアポトーシスであることをさらに確認するために、アポトーシスによって活性化されるカスパーゼ3と9の酵素活性を測定した。0.1または0.5 μ Mの(*S*)-または(*R*)-erypoegin Kで処理したHL-60細胞から経時的に細胞抽出液を調製し、抽出液中の酵素活性を測定したところ、Fig. 4-5aとFig. 4-5bに示すように (*S*)-erypoegin Kで処理したHL-60細胞ではカスパーゼ3と9のどちらも時間依存的かつ濃度依存的に著しく活性化された。一方、(*R*)-erypoegin Kで処理したものではそのような活性化は見られなかった。これらの結果より、(*S*)-erypoegin Kによる細胞死は、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスによるものであることが示唆された。

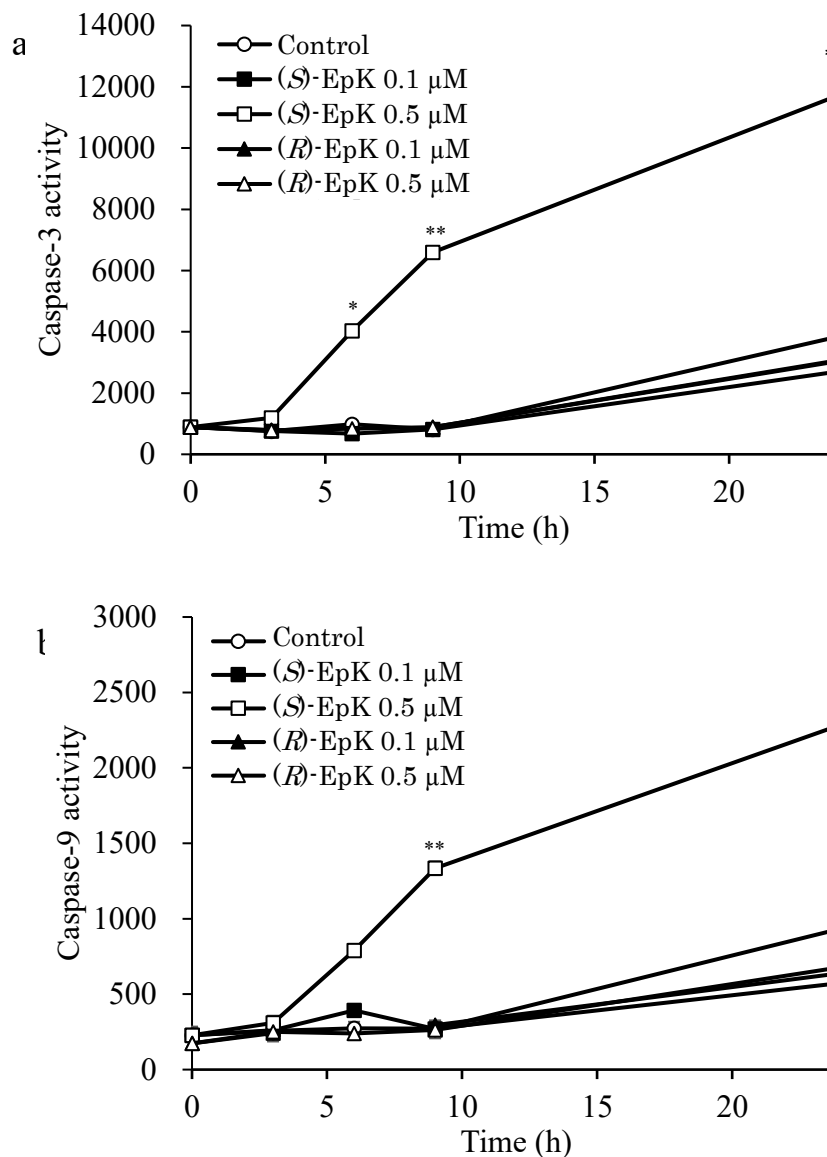


Fig.4-5 Effect of (*S*)-, and (*R*)-erypoein K on caspase 3 and caspase 9 activity in HL-60 cells.

HL-60 cells were treated with (*S*)- or (*R*)-erypoein K at concentrations of 0.1 and 0.5 μ M. After incubation for the indicated time periods, enzyme activities of caspase 3 (a) and caspase 9 (b) in cell extract were assayed using each specific fluorescent substrate. Enzyme activity is expressed as relative fluorescence intensity in an arbitrary unit. The values are presented as the mean $\pm$ SE of four independent experiments. Triplicate measurements were performed in each experiment. The significance of differences was evaluated using one-way ANOVA and Dunnett's method. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control. (*S*)-EpK, (*S*)-erypoein K; (*R*)-EpK, (*R*)-erypoein K.

5. (*S*)-および(*R*)-erypoegin Kで処理したHL-60細胞におけるMGの産生

第三章で述べたように、HL-60細胞を天然由来のラセミ混合物のerypoegin Kで処理すると細胞培養液中に高濃度のMGが分泌・蓄積した。しかもその濃度はerypoegin Kで処理した場合の方が、GLO Iの既知の阻害剤BBGCで処理した場合よりも高かった。そこでこのMG産生における両光学異性体の作用を調べるために、(*S*)-または(*R*)-erypoegin Kで処理したHL-60細胞の培養液中のMGレベルを測定した。その結果、Fig. 4-6に示すように*S*体で処理したときのみ、1 μ Mでは有意な差はみられなかったが、どちらの濃度も8時間でMGの蓄積が起こり、24時間でさらに蓄積量が増加した。一方、*R*-体ではそのような効果は見られなかった。

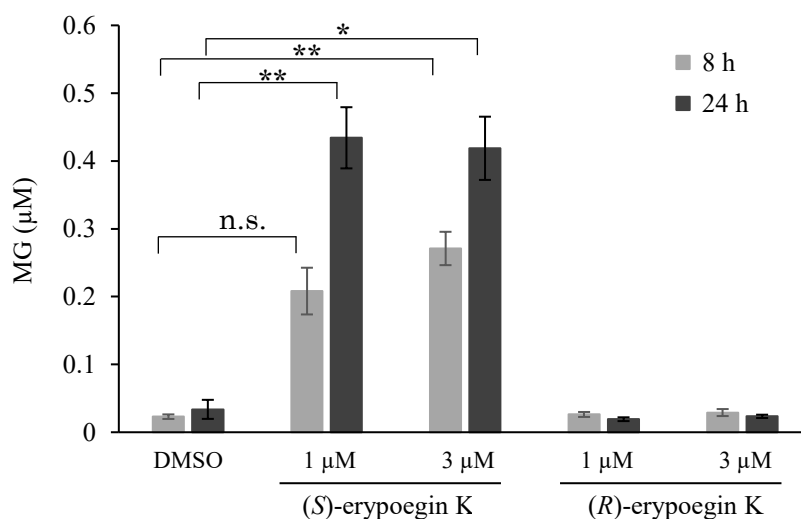


Fig. 4-6 Effect of (*S*)- and (*R*)-erypoegin K on the production of MG in HL-60 cells.

HL-60 cells were treated with (*S*)- and (*R*)-erypoegin K (1 or 3 μ M), and cultured for 8 or 24 h. Subsequently, MG level in the culture medium was determined by the α -phenylenediamine derivatization and HPLC/UV method. The values are presented as the mean $\pm$ SE of four independent experiments. Triplicate measurements were performed in each experiment. The significance of differences was evaluated using one-way ANOVA and Dunnett's method. * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. control. MG: methylglyoxal. n.s.: not significant.

6. (*S*)-および(*R*)-erypoegin K の精製 GLO I の酵素活性に及ぼす影響

MGが(*S*)-erypoegin Kで処理した細胞の培養液でのみ特異的に検出されたことをから、MGの産生は(*S*)-erypoegin KによるGLO Iの選択的阻害の結果であると考えられた。このことを確認するために精製ヒトGLO Iを用いて、その酵素活性に及ぼす(*S*)-erypoegin Kの効果について検討した。第一章で述べたようにerypoegin Kの精製GLO Iに対する阻害のIC₅₀値は109.4 μ Mであったことから、50 μ Mと100 μ Mの2点で酵素阻害活性を測定した。その結果、予想に反してどちらの濃度においても、*S*体、*R*体の酵素阻害活性に有意な差は見られなかった (Fig. 4-7)。酵素阻害に対するこれらのIC₅₀値はどちらもおよそ100 μ Mであり、ラセミ混合物のIC₅₀値 (109.4 μ M) とほぼ一致していた。これらの結果から、(*S*)-erypoegin Kによる選択的アポトーシス誘導活性はGLO Iの酵素阻害による機序では説明できず、GLO I阻害とは異なる別の機序によることが示唆された。

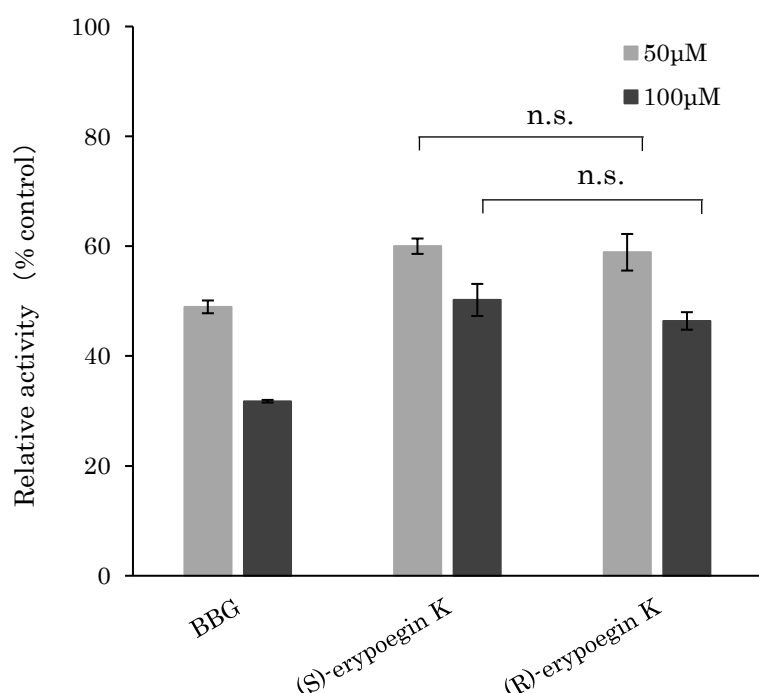


Fig. 4-7 Inhibitory effect of (*S*)- and (*R*)-erypoegin K on the enzyme activity of purified human GLO I.

Recombinant human GLO I was purified to homogeneity and its activity was measured in the presence or absence of (*S*)- and (*R*)-erypoegin K. The enzyme reaction was monitored by measuring the increase in optical density at 240 nm because of the formation of *S*-D-lactoylglutathione. Enzyme activity was expressed relative to the activity of the control treated with vehicle (DMSO), which was taken as 100%. The data are presented as the mean $\pm$ SE of three independent experiments.

BBG: *S*-*p*-bromobenzylglutathione. n.s.: not significant.

第四節 考察

本章ではgenistein (2) を出発材料としてerypoeigin Kをラセミ混合物として収率23%で半合成することに成功した。合成した(*RS*)-erypoeigin Kは¹H-NMRおよび¹³C-NMRなどの分光学的性質において天然由来標品と同一であり、さらにHL-60細胞の細胞死誘導活性に対しても天然由来の標品と同一のIC₅₀値 (175 nM) を示した。このことから合成標品は天然由来標品と化学的かつ生物学的に同等であることが明らかとなった。さらに*S*体、*R*体をキラルカラムを用いて光学分割に成功し、両光学異性体の腫瘍細胞に対する細胞死誘導活性の評価が可能となった。その結果、HL-60細胞に対するアポトーシスによる細胞死誘導活性は(*S*)-erypoeigin Kが特異的に有し、(*R*)-erypoeigin Kは全く活性を示さないことが明らかとなった。このエナンチオ選択的な生理作用は核の凝縮／断裂、ゲノムDNAの断片化、カスパーゼ3、9の活性化などアポトーシスに特徴的ないくつかの指標からも支持された。さらにこのことは、HL-60の細胞培養液中のMGの蓄積においてもみられ、GLO Iのエナンチオ選択的な酵素阻害によるものと想定された。しかし、精製酵素を用いた実験からは予想に反して*S*体、*R*体ともに阻害活性に差は見られなかった。第一章及び第三章で述べてきたように、(*S*)-erypoeigin KによるGLO I阻害のIC₅₀値 (約100 μM) とHL-60細胞に対する細胞死誘導のIC₅₀値 (90 nM) には約1,000倍の大きな乖離がある。このことは(*S*)-erypoeigin Kの作用機構として、当初想定したようなGLO Iの酵素阻害とそれに続く細胞培養液中のMGの蓄積によるアポトーシスという単純なメカニズムでは説明できない可能性が示唆された。事実、*S*体、*R*体の精製ヒトGLO I酵素活性に対する阻害活性には有意な差は見られなかった。MGの産生と培養液中における蓄積は、確かにエナンチオ選択的な(*S*)-erypoeigin Kの細胞死誘導活性に関連してはいるが、GLO Iの阻害とは異なる別の細胞内メカニズムに起因していることが強く示唆された。すなわち、グリオキサラーゼ系に含まれるもう一つの酵素であるGLO IIをはじめ、MGの解毒に関わる酵素には他にもDJ-1¹⁰²⁾ (glyoxalase IIIともよばれる) やアルドース還元酵素⁹⁴⁾などがあり、(*S*)-erypoeigin KはそれらのMG分解に関わる酵素の阻害や解糖系の亢進、dihydroxyacetone phosphateなどからのMG合成の活性化などに寄与している可能性がある。

小括

ポリビアデイゴに含まれるイソフラボン(*S*)-erypoeigin Kは、本研究によりヒト白血病細胞株 HL-60 に対して、強力かつエナンチオ選択的なアポトーシスによる細胞死誘導活性を示すことを明らかにした。しかし、精製ヒト GLO I に対する酵素阻害活性は *S* 体と *R* 体でほとんど変わらなかったことから、(*S*)-erypoeigin K による細胞死誘導の機序は、GLO I の阻害とは異なるものであることが示唆された。

第五章

(S)-erypoegin K の標的分子の探索と新規トポイソメラーゼ II 阻害剤としての働き

第一節 緒言

前章で(S)-erypoegin Kの標的分子がGLO Iではない可能性が示唆された。そこで(S)-erypoegin Kの標的分子を探索するため、(公財)がん研究会と共同でヒトがん細胞株パネル(JFCR39)を用いた化合物の標的分子の探索を行った。この方法は、39種のヒトがん細胞株(肺がん7系、胃がん6系、大腸がん5系、卵巣がん5系、脳腫瘍6系、乳がん5系、腎がん2系、前立腺がん2系およびメラノーマ1系)からなる細胞株パネルを用い、細胞株によって種々の化合物に対する薬剤感受性(50%増殖阻害濃度、GI₅₀)の違いをフィンガープリントとして表し、フィンガープリントの類似性から未知化合物の作用メカニズムを予測しようとする方法である^{103, 104}。これまでに、標的分子が同定されている化学療法剤や分子標的薬2,000種類の化合物のフィンガープリントがデータベース化されている。未知化合物のJFCR39に対するGI₅₀を測定し、このデータベース中のフィンガープリントと比較することにより、既存薬のどれと作用メカニズムが類似しているか、どれとも異なるユニークな作用メカニズムを有するかを評価することが可能である。今回、(S)-erypoegin Kのフィンガープリントをデータベースと比較したところ、Topoisomerase II (Topo II) 阻害剤であるetoposideと極めて高い類似性を示すことが明らかとなった。etoposide以外にも類似性が高かったものはいずれもTopo II阻害剤であり、(S)-erypoegin Kの標的分子はTopo IIである可能性が示唆された。

ヒトTopo IIは細胞の分裂や増殖に必要な酵素であり^{105, 106}、 α と β のサブタイプが存在する。 α サブタイプは、増殖している細胞で発現が高く、主にDNAの複製と細胞周期のG2期における姉妹染色分体の脱連環(デカテネーション)において機能している。そのため、この酵素の阻害は染色体の異常な分離と細胞周期の停止を導く。一方、 β サブタイプは主に静止期の細胞で発現しており、転写や複製中に蓄積したDNAのねじれストレスを開放することがその生理的役割である¹⁰⁶。

そこで本章では、(S)-erypoegin KのTopoisomerase II酵素活性に対する効果および*in silico*による立体化学を評価した。また、第四章までは、浮遊細胞であるヒト白血病細胞株HL-60に対する細胞増殖阻害活性について検討してきたが、固形がんに対する作用についても明らかにするため、ここでは2種のヒト胃がん細胞株GCIYおよびMKN-1を用いてこれらの細胞に対する(S)-erypoegin Kの作用について検討した。また、(S)-erypoegin Kによるこれらの細胞の細胞周期に及ぼす影響について検討した。これまでは培養がん細胞を用いた*in vitro*の系における細胞増殖阻害活性ならびに細胞死誘導活性についての評価であった。マウス個体における*in vivo*での作用を明らかにするため、ヌードマウスにGCIY細胞を移植した担がんモデルマウスを作成し、(S)-erypoegin Kによる抗腫瘍効果について検討した。

第二節 実験方法

1. ヒトがん細胞パネル

ヒトがん細胞株39系（肺がん7系、胃がん6系、大腸がん5系、卵巣がん5系、脳腫瘍6系、乳がん5系、腎がん2系、前立腺がん2系およびメラノーマ1系）のがん細胞を96wellプレートに播き、翌日、細胞培養液に10 nM～100 μ Mまでの10倍希釈系列の薬液を添加し、48時間培養後、細胞生存率をスルホローダミンBによる比色定量法により測定した。測定はduplicateで行った。

JFCR39の各がん細胞株について、サンプル物質に対する有効濃度をJFCR39の平均値からの濃度偏差として棒グラフで表現したMean Graphにより、各細胞株の相対的な薬剤感受性が一覧表示される。ここでは薬剤を曝露する前（Time zero）の細胞数を基準として、薬剤未処理で48時間培養したControlでの増加分を100%とした。Controlに比べて、薬剤処理により細胞数の増加を50%抑制する濃度をGI₅₀とし、そのMean Graphで表現されるスペクトルをフィンガープリントとよぶ。このフィンガープリントとデータベースに含まれる標的分子既知の約2,000化合物のフィンガープリントとを類似性計算プログラムCOMPAREを用いて解析した。COMPAREプログラムは二つの薬剤間で統計学的相関性を検定するもので、サンプルのフィンガープリントに類似したフィンガープリントをもつ薬剤が類似性の高い順にリストアップされる。類似性（Pearson相関係数：r） $r \geq 0.75$ の場合、被験化合物とレファレンス化合物の作用メカニズム（標的分子）が同等である可能性が高く、 $0.60 \leq r < 0.75$ の場合もメカニズムの共通性が予測されるが、有効濃度が極端に高いまたは低い細胞株の数など総合的な判断を要する。 $r < 0.5$ の場合は、レファレンス化合物のどれとも異なるユニークな作用メカニズムを持つことが予想される。

2. Topoisomerase II α assay

Topoisomerase II α assayは、Topoisomerase II assay kit (TG1001-1A、TopoGen、Buena Vista、CO) を用い、添付のマニュアルを若干改変して行った。キットに含まれるAssay buffer AとBを1：1で混和後、QW、Topo IIおよび終濃度50-400 μ Mになるように化合物またはDMSO（溶媒）を加え（DMSO濃度5%）で混和し、基質としてスーパーコイル型のプラスミドpSL1180を加え、37℃で30分間反応した。反応停止液を加えて混和し、エタノール沈殿した後、proteinase Kを加え37℃で30分間反応し、クロロホルム/イソアミルアルコール（24：1）抽出、エタノール沈殿を行った。反応生成物を1%アガロースゲル上で泳動相0.5 μ g/mL臭化エチジウムを含む 1×TAE（40 mM Tris-acetate buffer、1 mM EDTA、pH7.4）中で200 V、4℃、約60分間泳動し、超純水（QW）中で15分間脱色後、ゲル撮影装置FAS-IV（日本ジェネティクス株式会社、Tokyo、Japan）を用いてUV照射下、バンドを検出した。

3. 分子ドッキングシミュレーション

分子ドッキングシミュレーションは名城大学薬学部 小田彰史教授らにより行われた。ヒトDNA Topo II α とetoposide複合体の三次元(3D)結晶構造はProtein Data Bank (PDB ID: 5GWK) から得た。Topo II α はホモ二量体を形成しており、2 molのMg²⁺が結合している。結晶構造からMg²⁺と2分子のetoposide分子を取り除き、Topo II α と20 bpの二本鎖DNAとの複合体の3D構造を得た。AmberToolsのreduce module¹⁰⁷⁾を用いて欠損した水素原子を付加した後、Topo II α に対する(*S*)-および(*R*)-erypoegin Kのドッキングシミュレーションを行った。(*S*)-および(*R*)-erypoegin Kはetoposideが結合していたポケットにドッキングさせた。ドッキングシミュレーションはGOLD program¹⁰⁸⁾を用いて行われた。

4. 細胞培養

ヒト胃がん細胞株GCIYは愛知県がんセンター研究所腫瘍病理学部中西速夫先生からご供与いただいた。またヒト胃がん細胞株MKN-1は理化学研究所より購入した。GCIYおよびMKN-1細胞はそれぞれ10% FBS、penicillin (100 units/mL)、streptomycin (100 μ g/mL)を添加したD-MEM培地(低グルコース、Fujifilm Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)またはRPMI-1640培地(Gibco, Grand Island, NY, USA)中で5% CO₂を含む気相下、37°Cで培養した。

5. 細胞生存率の測定

GCIY 細胞または MKN-1 細胞を、96-well プレートに 5.0×10^3 cells/well、 1.0×10^4 cells/well でそれぞれ播種した。37°Cで24時間プレインキュベートした後、0–5 μ M の(*S*)-erypoegin Kを添加し、以降は第二章2-3と同様に行った。

6. カスパーゼ活性の測定

GCIY 細胞または MKN-1 細胞を、24-well プレートに 1.25×10^5 cells/well、 2.5×10^5 cells/well でそれぞれ播種し 37°C で 24 時間プレインキュベートした後、(*S*)-または(*R*)-erypoegin Kを終濃度1、10 μ Mになるように添加した。37°Cで6–33時間インキュベートした後、PBSで2回洗浄し、添付の細胞溶解液を加えて氷上で10分間インキュベートして細胞を溶解した。溶解後の液を1.5 mL チューブに移し取り、遠心(153 $\times g$ 、6分間)した上清を細胞溶解液とし、第四章2-5と同様に行った。

7. 細胞周期

Muse™ Cell Cycle Kit (Luminex Co., Austin, TX, USA)を用いて添付のマニュアルに沿って行った。3.5 cm ディッシュに GCIY 細胞を 1.25×10^5 cells で播種し、37°C で 24 時間プレインキュベートした後、(*S*)-erypoegin Kを終濃度0.1、0.3、1 μ Mになるように添加した。37°C で 24 時間インキュベート後、メディウムを除去し、細胞を PBS で 2 回洗

浄後、0.25%トリプシン-EDTAを加えて37℃、3分間インキュベートした。メディウムを加えて反応を停止し、ピペッティングによりシングルセルにした後、1.5 mLチューブに移し取り、遠心して細胞を集め、PBSで洗浄した。細胞を少量のPBSに懸濁し、冷70%エタノールが入った1.5 mLチューブに細胞が塊にならないようにゆっくり混ぜながら加え、-30℃で3時間以上静置し固定した。固定後上清を除去し、PBSで洗浄後、ヨウ化プロピジウムを含むMuse™ Cell Cycle Reagentを加えて攪拌した。遮光下、室温で30分間静置した後、Muse™ Cell Analyzer (Luminex Co.)を用いて細胞周期各期に属する細胞の割合を測定した。

8. がん細胞移植マウスの作製

8週令の雄ヌードマウス(KSN/Slc, SLC, Shizuoka, Japan)にGCIY細胞を一匹当たり、 5×10^6 細胞/100 μ L PBSで左鼠径部付近に皮下注射して移植した(0日目)。移植後4日目にノギスによる腫瘍の大きさおよび体重の測定を行った。腫瘍の大きさに偏りが出ないようにDMSO、(*S*)-erypoegin K、(*R*)-erypoegin K、5-フルオロウラシル(5-FU、ポジティブコントロール)投与群の4群(n=8-11)に分け、それぞれの薬物またはDMSO(コントロール)を腹腔内投与した。なお、(*S*)-erypoegin K、(*R*)-erypoegin KはDMSOで溶解後、コントロールのDMSOとともにオリーブオイルでそれぞれ希釈し(DMSO終濃度5%)、40 mg/kg/100 μ Lを週2回、4週間腹腔内投与した。5-FU(40 mg/kg)は注射剤(Kyowa Kirin, Tokyo, Japan)をPBSで希釈して同様に投与した。4日目以降は一週間に2回、薬物投与と同時に腫瘍の大きさと体重を測定した。腫瘍の大きさはノギスで測定し、腫瘍体積(mm³)を長径×短径²/2の計算式で近似した。最後の薬物投与の2日後(移植後32日目)、マウスはCO₂を用いて安楽死させ、腫瘍を摘出してその重量を測定した。

なお、本動物実験の実施については、名城大学動物実験委員会の承認を得たものである(承認番号2019PE7号)。

9. 統計処理

第二章2-7と同様に行った。

第三節 結果

1. JFCR39ヒトがん細胞パネルを用いたCOMPARE分析

(*S*)-erypoeigin Kの標的分子を探索するために、ヒトがん細胞パネル (JFCR39) 解析を行った。その結果、(*S*)-erypoeigin Kの39種のがん細胞株に対するlog GI₅₀の平均値 (GI₅₀: コントロールに対する相対的な50%細胞増殖阻害濃度) は-5.98 (1.0 μ M) であったのに対し、光学異性体の(*R*)-erypoeigin Kおよびリード化合物のgenistein (Fig. 5-1) はそれぞれ-4.07 (85 μ M)、-4.48 (33 μ M) であった (Fig. 5-2)。これらの結果から、genisteinを含む3つの化合物中、(*S*)-erypoeigin Kが最も強い細胞増殖阻害効果を有することが示された。さらに、(*S*)-erypoeigin Kの最も感受性の高い細胞株と最も感受性の低い細胞株の有効濃度 (対数値) の差であるRange、および最も感受性が高い細胞株の有効濃度 (対数値) と平均値との差であるDeltaは、それぞれ3.15、1.18であった。Delta $\geq$ 0.5、Range $\geq$ 1である場合、化合物の作用に特異性があると判定される¹⁰⁴⁾。このことから、(*S*)-erypoeigin KはJFCR39パネルの各細胞株に対して特異性を有することが示された。次に、(*S*)-erypoeigin Kの標的分子を探索するために、COMPARE分析を行った。その結果、Table 1に示すように、各種がん細胞の(*S*)-erypoeigin Kに対するフィンガープリントは、etoposide (Fig. 5-1, Pearson r=0.889)、NK-611 (0.865) およびidarubicin (0.820) のようなTopo II阻害剤と極めてよく類似していた。対照的に、genisteinおよび(*R*)-erypoeigin KはTopo II阻害剤とはほとんど類似していなかった (Pearson r は、それぞれ0.49、0.11)。これらの結果から(*S*)-erypoeigin KはTopo II阻害剤として機能し、細胞周期の進行を妨害することによって、その細胞死誘導活性ならびにアポトーシス誘導活性を表すことが強く示唆された。

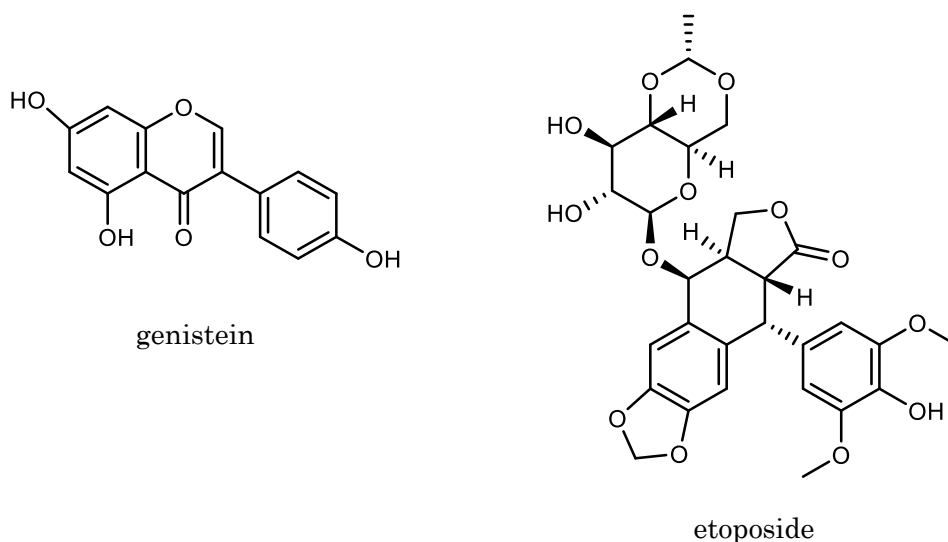


Fig. 5-1 Chemical structure of genistein and etoposide.

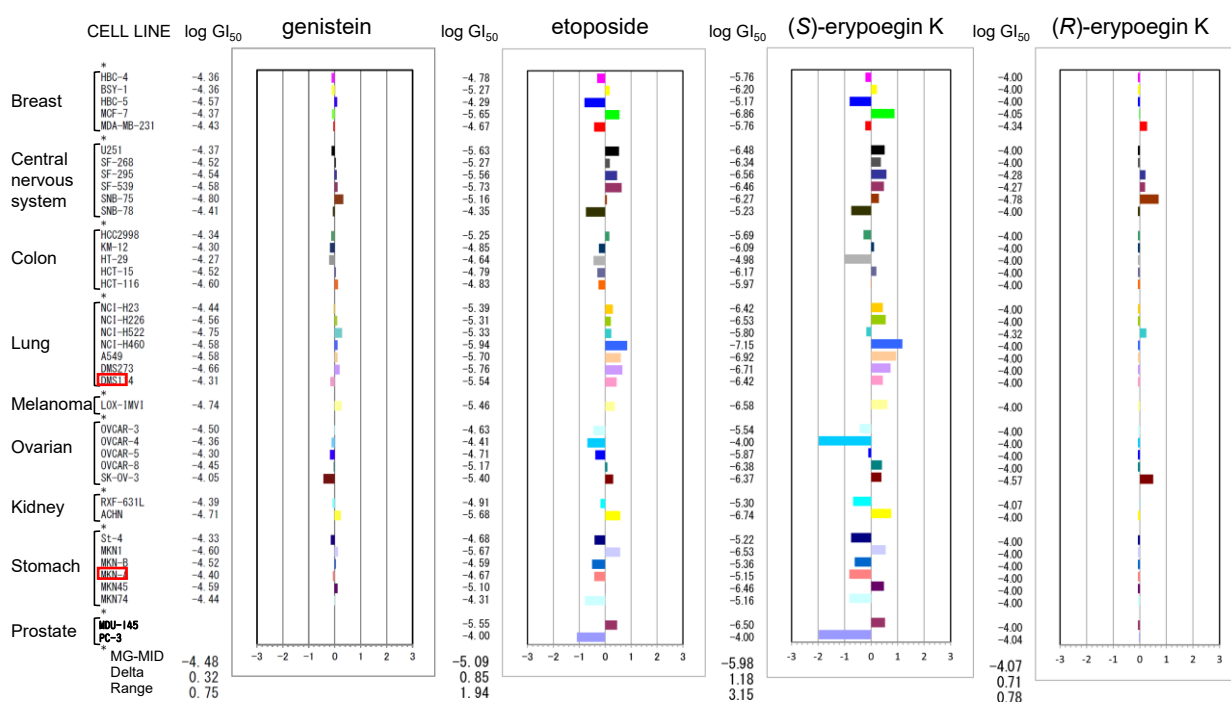


Fig. 5-2 Comparison of the fingerprints of etoposide, (S)-erypoegin K, (R)-erypoegin K and genistein.

Fingerprint indicates the differential growth inhibition pattern of genistein, (S)-erypoegin K, (R)-erypoegin K and etoposide, respectively, for the cell lines in the JFCR39 panel¹⁰⁴). The X-axis shows the difference in logarithmic scale between the mean of log GI₅₀ values for all 39 cell lines (MG-MID, expressed as 0 in the fingerprint) and the log GI₅₀ for each cell line in the JFCR panel. Columns to the right of 0 indicate sensitivity of the cell lines to a given compound and columns to the left indicate their resistance. MG-MID = mean of log GI₅₀ values for all 39 cell lines; Delta = difference between the MG-MID and the log GI₅₀ value for the most sensitive cell line; Range = difference between the log GI₅₀ values for the most resistant cell line and the most sensitive cell line. The cell lines indicated by red square show the cell lines used in the later experiments.

Table 5-1. COMPARE analysis of (*S*)-Erypoein K.

Rank	Pearson r	Pvalue	Drug name	Mode of action
1	0.889	4.09E-14	Etoposide	DNA topoisomerase II inhibitor
2	0.865	1.24E-12	NK611 hydrochloride	DNA topoisomerase II inhibitor
3	0.820	1.70E-10	Idarubicin hydrochloride	DNA topoisomerase II inhibitor
4	0.818	2.04E-10	NC-190	DNA topoisomerase II inhibitor
5	0.809	4.60E-10	TAS-103 hydrochloride	DNA topoisomerase I/II inhibitor
6	0.796	1.38E-09	Amsacrine	DNA topoisomerase II inhibitor
7	0.790	2.24E-09	Gemcitabine hydrochloride	Pyrimidine antagonist/Antimetabolite
8	0.781	4.48E-09	Gemcitabine monophosphate	Pyrimidine antagonist/Antimetabolite
9	0.774	7.51E-09	Neocarzinostatin	DNA strand break
10	0.766	1.33E-08	Gemcitabine	Pyrimidine antagonist/Antimetabolite
cf	0.49	1.54E-03	Genistein	EGFR tyrosine kinase inhibitor DNA topoisomerase II inhibitor
	0.11	0.51	(<i>R</i>)-Erypoein K	-

2. Topo II α 酵素活性に対する(*S*)-erypoegin Kの阻害活性

ヒトがん細胞パネル解析で (*S*)-erypoegin Kの標的分子はTopo IIである可能性が示唆されたことから、精製ヒトTopo II α を用いて酵素活性に対する(*S*)-erypoegin Kの阻害の有無について検討した (Fig. 5-3)。基質としてスーパーコイル型のプラスミドpSL1180を用いた。プラスミドDNAをTopo II α で処理するとスーパーコイル型DNAは切断された後、ねじれを解消し、再結合されることにより、スーパーコイルが解除されたDNA (relaxed) とニックの残存により、オープンサーキュラー型DNA (nicked) となった二本のバンドが検出された (Lane : Cont)。一方、(*S*)-erypoegin Kを作用させると、Topo II α 阻害剤である etoposideの場合と同様、切断されたDNAが再結合されなかったために直鎖状となったDNA (linear) が検出された。また、(*R*)-erypoegin Kにおいては、濃度を増加させてもコントロールと同様、直鎖状DNAは検出されなかった。これらのことから、(*S*)-erypoegin Kは etoposideと同様にTopo II α を標的分子として阻害し、その阻害作用はトポII毒として分類されるものであることが確認された。

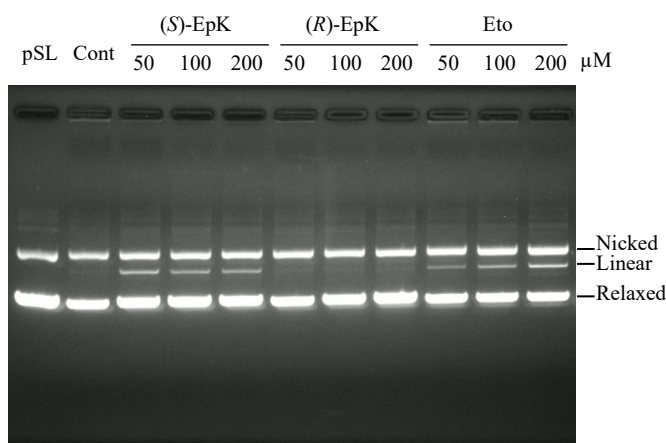


Fig. 5-3 Inhibition of Topo II α enzyme activity by (*S*)-erypoegin K.

Cleavage complex formation in the presence of (*S*)-erypoegin K. Supercoiled plasmid DNA (480 ng) was treated with Topo II α in the presence of various concentrations of (*S*)-erypoegin K, (*R*)-erypoegin K or etoposide at 37°C for 30 min. The linear DNA band represents cleavage DNA-Topo II α complex formation. pSL, plasmid DNA alone; Cont, plasmid DNA treated with Topo II α .

Epk; erypoegin K

3. (*S*)-erypoeegin K と Topo II α の分子ドッキング

前項の結果に示したように、(*S*)-erypoeegin K の Topo II α に対する阻害活性が *S* 体を選択的であったことから、*S* 体と *R* 体で酵素タンパク質との結合様式にどのような違いがあるかを明らかにするため、計算化学的手法を用いてドッキングシミュレーションを行った。Topo II α -20bp DNA-etoposide の三者複合体の結晶構造をもとに、そこから etoposide を取り除き、代わりに(*S*)-または(*R*)-erypoeegin K をドッキングさせた。Fig. 5-4 はドッキングシミュレーションによって得られた Topo II α -20bp DNA 複合体に対する(*S*)-または(*R*)-erypoeegin K の最適なドッキングポーズを示す。(*S*)-または(*R*)-erypoeegin K の GOLD score はそれぞれ 84.68 と 83.65 で大きな違いはなかったが、*R* 体の結合様式は、*S* 体の結合様式とは大きく異なり、それぞれの光学異性体の結合はお互いに逆向きであることが示唆された。すなわち、Topo II α -20bp DNA-(*S*)-erypoeegin K 複合体では、2 つの水素結合 (4'-OH とリボース分子の酸素原子間、および 4"-OH と Tyr805 側鎖の OH 間) ならびに 5-OH とチミンの芳香環との間に OH/ π 相互作用が確認された。4"-OH と Tyr805 の側鎖 OH 間の水素結合は、cleavage complex を安定化する上で重要な役割を担っていると考えられた。これらの結果から、*S* 体は cleavage complex を安定化させることにより、強い酵素阻害活性を示すことが明らかになった。一方、Topo II α -20bp DNA-(*R*)-erypoeegin K 複合体では、4'-OH とリン酸基間、5-OH とグアニンの酸素原子および 4"-OH 間と Arg487 のグアニジン基間の 3 つの水素結合が形成が示唆されたが、cleavage complex に関与する Tyr805 の側鎖 OH との間に水素結合は観察されなかった。これらの結果から、*R* 体は cleavage complex を安定化せず、酵素阻害活性を示さないと考えられた。

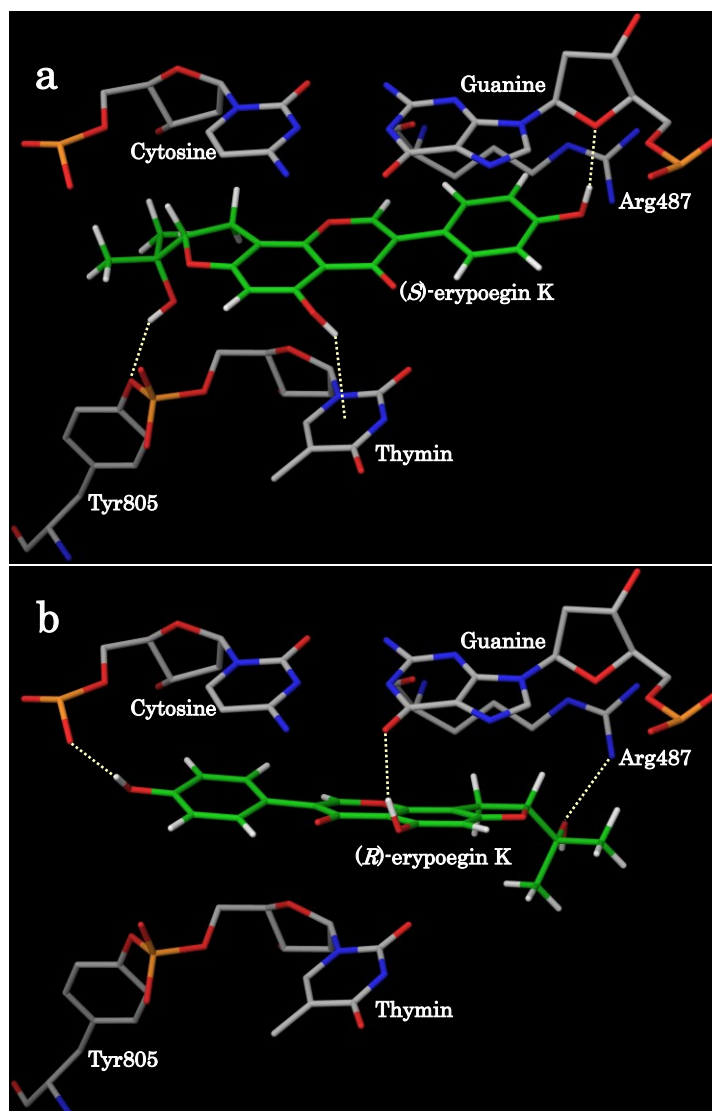


Fig. 5-4. Molecular docking simulation of (*S*)- and (*R*)-erypoeigin K to human Topo II α .

Panels a and b, poses of (*S*)-erypoeigin K and (*R*)-erypoeigin K obtained by computational docking, respectively. In panel a, linkage between Tyr805 and thymine residues indicate the transient DNA- Topo II α covalent cleavage complex. Note the presence of hydrogen bonds between the 4'-OH group and oxygen on the ribose moiety, and between the 4''-OH group and the side chain OH group of Tyr805, and an OH/ π interaction between the 5-OH group and the aromatic ring of thymine as illustrated by dashed white lines. In panel b, no hydrogen bonds nor interactions exist to stabilize the cleavage complex. Gray, carbon of Topo II α and DNA; green, carbon of (*S*)- and (*R*)-isomers; white, hydrogen; blue, nitrogen; red, oxygen; orange, phosphorus atoms.

4. (*S*)-および(*R*)-erypoegin Kのヒト胃がん細胞に対する細胞死誘導活性

これまで(*S*)-erypoegin Kのヒト白血病細胞株HL-60における細胞死誘導作用について検討してきたが、次に固形がんに対する作用について検討した。ここでは固形がんとしてヒト胃がん細胞株GCIYおよびMKN-1を用いた。その結果、(*S*)-erypoegin KはHL-60細胞のときと同様にGCIY細胞 (Fig. 5-5a) およびMKN-1細胞 (Fig. 5-5b) に対しても、エナンチオ選択的に強力な細胞死誘導活性を示し、そのIC₅₀値はそれぞれ0.270 μ M (GCIY細胞) および0.327 μ M (MKN-1細胞) であった。

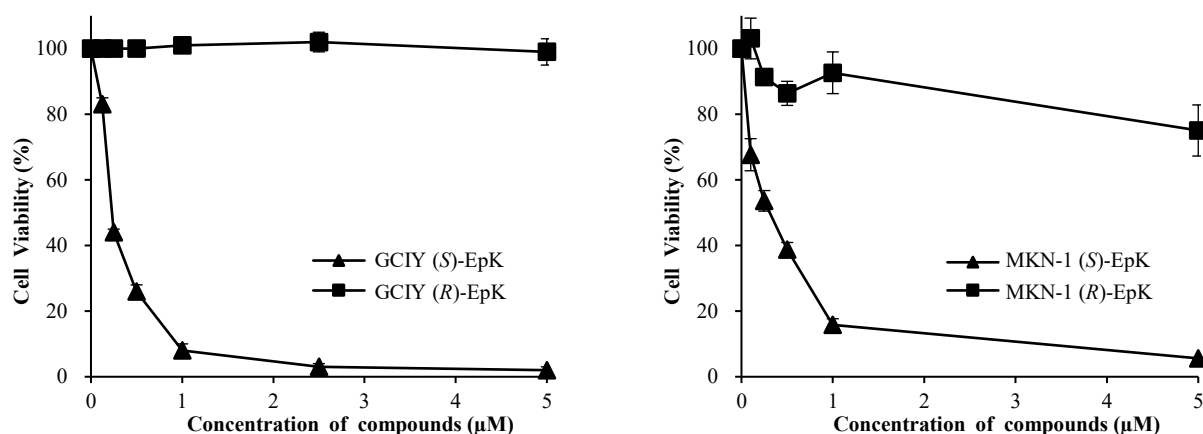


Fig. 5-5 Cytotoxicity of (*S*)-erypoegin K against human gastric cancer cells line.

Enantioselective cytotoxicity of (*S*)-erypoegin K against human gastric cancer cells lines. GCIY (5×10^3 cells/well) (a) or MKN-1 (1.0×10^4 cells/well) (b) cells were treated with various concentrations of (*S*)- or (*R*)-erypoegin K for 48 h, and cell viability was measured by MTS assay. The values are presented as the mean $\pm$ SE of three independent experiments. Triplicate measurements were performed in each experiment. (*S*)-Epk; (*S*)-erypoegin K

5. (*S*)-および(*R*)-erypoegin Kのヒト胃がん細胞に対するカスパーゼ 3 および 9 誘導活性

GCIYならびにMKN-1細胞に対する(*S*)-erypoegin Kによる細胞死がアポトーシスであるかどうかを検討するために、カスパーゼ3と9の酵素活性を測定した。1または10 μ Mの(*S*)-erypoegin Kで処理したそれぞれの細胞から経時的に細胞抽出液を調製し、抽出液中の酵素活性を測定した。その結果、GCIY細胞において(*S*)-erypoegin K 処理によりカスパーゼ 3 および9の時間的かつ濃度依存的な活性化が認められた (Fig. 5-6a, b)。同様の結果はMKN-1細胞においても観察された (Fig. 5-6c, d)。これらの結果より、(*S*)-erypoegin Kによる細胞死は、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスが関与していることが示唆された。

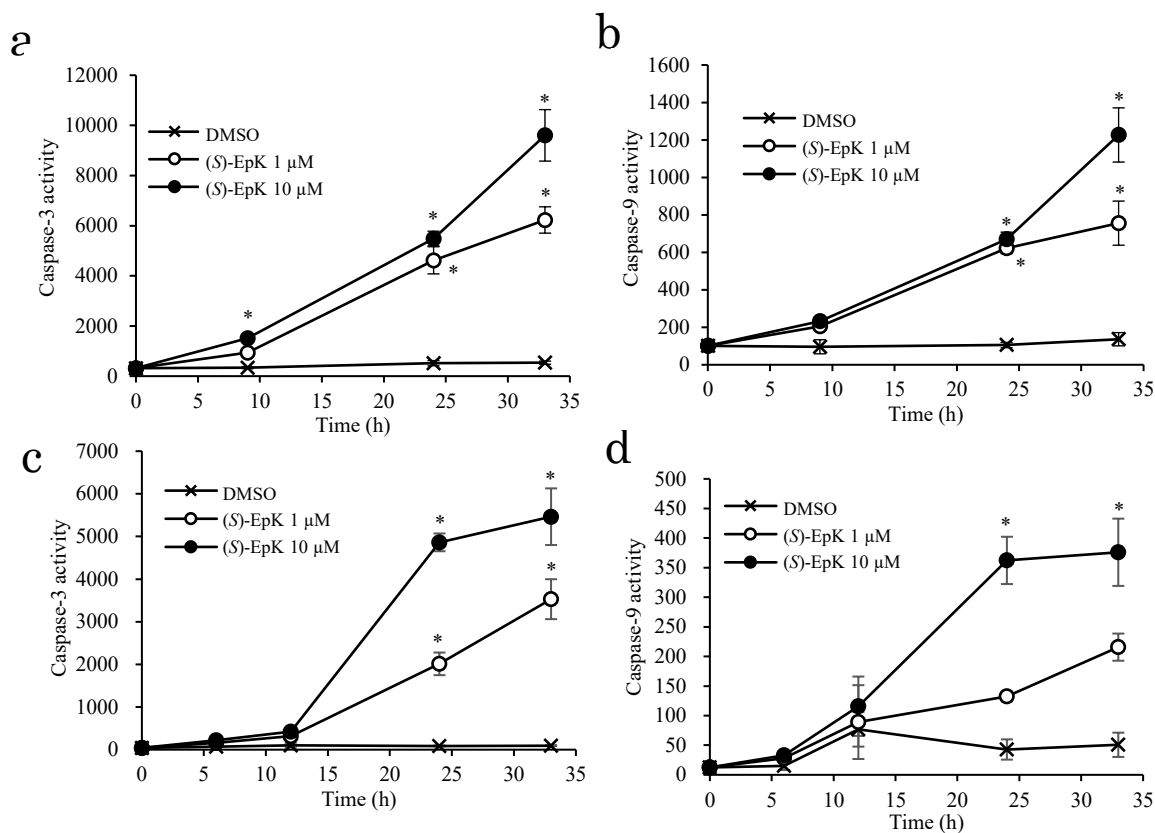


Fig. 5-6 Induction of caspase 3 and 9 activities in GCIY (a, b) and MKN-1 (c, d) cells treated with (S)-erypoeegin K.

GCIY or MKN-1 cells were treated with (S)- or (R)-erypoeegin K at concentrations of 1 and 10 μM. After incubation for the indicated time period, enzyme activities of caspase 3 (a, c) and caspase 9 (b, d) in the cell extracts were assayed using the corresponding specific fluorescent substrate. Enzyme activity is expressed as relative fluorescence intensity in an arbitrary unit. The values are represented as the mean ± SE of three independent experiments. Triplicate measurements were performed in each experiment. The significance of differences was evaluated using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. *p < 0.01 vs. control (DMSO). (S)-Epk; (S)-erypoeegin K

6. (S)-erypoeegin K の細胞周期に及ぼす影響

次に(S)-erypoeegin K が細胞周期のどの時期に影響を及ぼしているかを明らかにするため、細胞周期の測定を行った。細胞周期はG0（静止期）/G1→S（合成期）→G2→M（有糸分裂期）の順に周る。核内のDNA量はG0/G1期では染色体数2nに相当し、S期ではDNA複製によりDNA含量が増加する。さらに、G2/M期ではDNAの複製が完了し、DNA含量は約

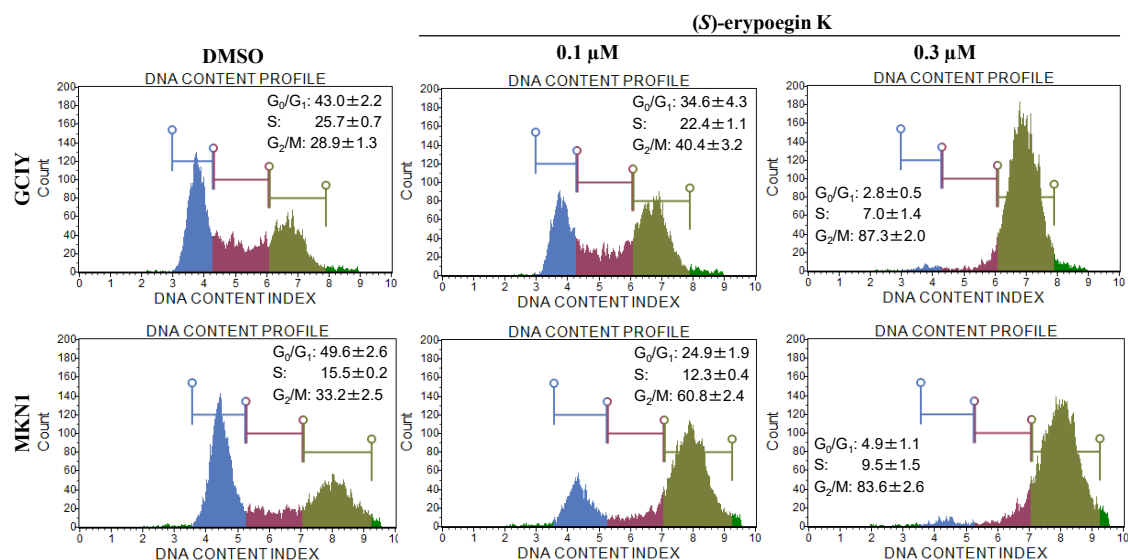


Fig. 5-7 G2/M cell cycle arrest induced by (S)-erypoeegin K in human gastric cancer cells.

GCIY and MKN-1 cells were treated with (S)-erypoeegin K at concentrations of 0.1 or 0.3 μM for 24 h. Cells were treated with trypsin-EDTA, washed with PBS, and then stained with propidium iodide solution. The proportion of cells in each cell cycle phase is presented in the various panels as the mean (%) ± SE of three independent experiments.

2倍（4nに相当）となる。Fig. 5-7のヒストグラムはDNA含量（横軸）に対する細胞数（縦軸）を表わしている。青、赤、うぐいす色はそれぞれ、G₀/G₁、S、G₂/M期を表わしている。

GCIY細胞またはMKN-1細胞を0.1または0.3 μMの(S)-erypoeegin Kで37℃、24時間処理し、各細胞周期にある細胞数の割合を測定した。Fig. 5-7に示すように、GCIY細胞では(S)-erypoeegin K 処理によってG₀/G₁期の細胞の割合は43.0%（コントロール）、34.6%（0.1 μM）、2.8%（0.3 μM）と減少し、これに対してG₂/M期の細胞の割合は28.9%（コントロール）、40.4%（0.1 μM）、87.3%（0.3 μM）と(S)-erypoeegin Kの濃度に応じて著しく増大した。MKN-1細胞も同様に、(S)-erypoeegin K 処理によってG₀/G₁期の細胞の割合は49.6%（コントロール）、24.9%（0.1 μM）、4.9%（0.3 μM）と減少し、これに対してG₂/M期の細胞の割合は33.2%（コントロール）、60.8%（0.1 μM）、83.6%（0.3 μM）と(S)-erypoeegin Kの濃度依存的に著しく増大した。これらのことから、(S)-erypoeegin KはGCIY細胞およびMKN-1細胞において、G₂アレスト（停止）を引き起こしていることが示唆された。

7. ヒト胃がん担がんモデルマウスを用いた(*S*)-erypoegin Kの*in vivo*抗腫瘍活性の評価

前項までは培養細胞を用いた(*S*)-erypoegin Kの*in vitro*での効果を検討してきたが、本項では(*S*)-erypoegin Kの*in vivo*における効果を検討するために担がんモデルマウスを作成し、抗腫瘍活性を評価した。ヌードマウスにGCIY細胞を移植し、移植後4日目から (*S*)-erypoegin K、(*R*)-erypoegin Kならびにポジティブコントロールとして5-フルオロウラシル (5-FU) の3群にそれぞれ40 mg/kgを腹腔内投与した。5-FUは臨床で胃がん治療に最も一般的に使用されている薬剤の一つである。ネガティブコントロールにはDMSOを投与した。移植した腫瘍の大きさと体重の変化をFig. 5-8に示す。(*S*)-erypoegin K投与群は、薬物を2回投与した後の11日目から有意に腫瘍の成長抑制が見られた (Fig. 5-8a)。最終的に摘出した腫瘍の重量も有意に減少していた (Fig. 5-8b)。その抑制度合は、同濃度の5-FUよりもやや強い傾向であった。一方、(*R*)-erypoegin K投与群は、DMSO投与群と有意な違いはみられなかった (Fig. 5-8a)。なお、体重変化はいずれの群においても有意差はなく (Fig. 5-8c)、用いた投与量において各薬物の毒性は出ていないと判断された。

以上のことより、(*S*)-erypoegin Kは*in vivo*においても抗腫瘍作用を示すことが明らかとなり、その作用は臨床現場で一般に汎用されている5-FUと同等、あるいはそれ以上であることが示唆された。

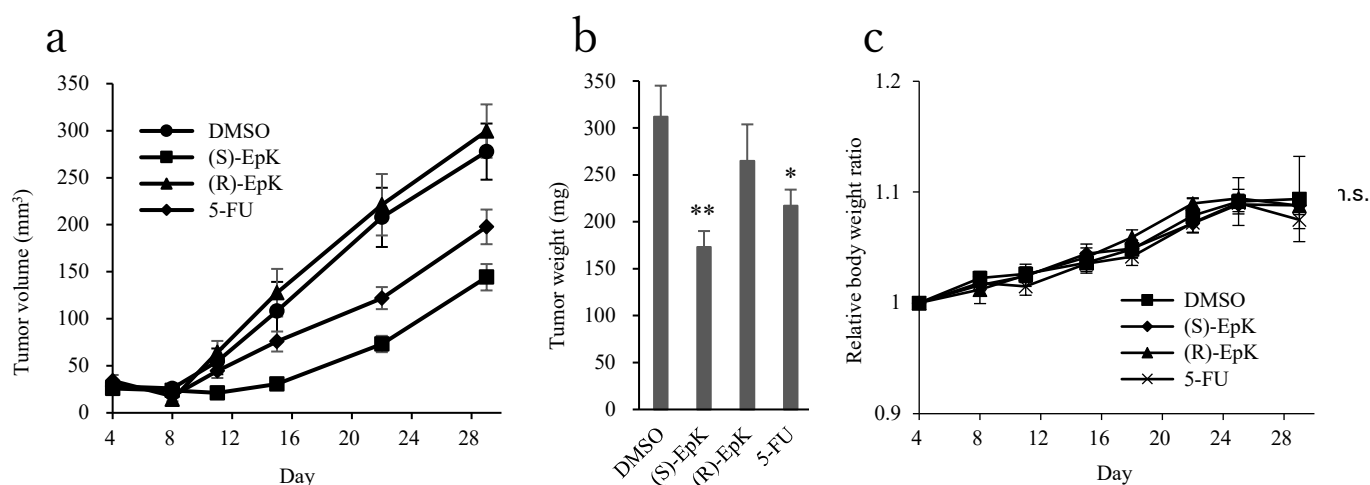


Fig. 5-8 Antitumor effect of (S)-erypoeegin K in a human gastric cancer cell xenograft mouse model.

Human gastric cancer GCIY cells were inoculated subcutaneously into nude mice (n = 8–11). Test compounds were all administered intraperitoneally at a dose of 40 mg/kg body weight twice a week, starting four days after the inoculation of the cancer cells. a, Time course of tumor growth (cells were inoculated at day 0). Tumor size was measured once or twice a week until day 29. b, Tumor weight removed from mice three days after the last injection of test compound. c, Time course of body weight of each mouse during the experiment. One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s.; no significant differences. Epk; erypoeegin K

第四節 考察

第四章で(*S*)-erypoeegin K の標的分子が GLO I でないことが示唆されたことから、ヒトがん細胞パネルにより標的分子を探索したところ、Topo II 阻害剤の etoposide と各種がん細胞株に対する効果の類似性が極めて高い(Pearson $r=0.889$) ことが明らかとなった。一方、(*R*)-erypoeegin K は類似性がほとんどなかった (0.11)。(*S*)-erypoeegin K のリード化合物であるイソフラボンの genistein は上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤¹⁰⁹⁾として知られ、かつ Topo II 阻害活性も有している^{110, 111)}。しかし、genistein に対して相対的に低い Pearson r 値 (0.49) であったことから、(*S*)-erypoeegin K はより特異的な Topo II 阻害剤であることを示している。これらの結果から、(*S*)-erypoeegin K の標的分子は Topo II である可能性が示唆された。

次に、(*S*)-erypoeegin K が標的分子候補である Topo II を阻害するかを確かめるため、精製ヒト Topo II α 標品を用いて酵素活性に及ぼす影響を調べたところ、エナンチオ選択的に Topo II α の酵素活性を阻害したことから、Topo II α が標的分子であることが確認された。これまでに天然または化学合成された多くの Topo II 阻害剤が知られているが、これら Topo II 阻害剤は二つのグループに分けることができる。すなわち、Topo II 毒または触媒阻害剤である¹¹²⁾。Topo II 毒は通常の酵素反応における、DNA と酵素タンパク質間の共有結合性反応中間体 (cleavage complex) を安定化し、二本鎖切断部位の再結合を阻害する。その結果、DNA に多くの二本鎖切断が残存することになり、細胞は G2 期において細胞周期の停止 (G2 アレスト) とアポトーシスを引き起こす。触媒阻害剤は、多段階からなる酵素反応のいくつかの段階で反応を妨害することにより阻害活性を表す。今回の実験では、(*S*)-erypoeegin K を作用させると etoposide を作用させたときと同様に cleavage complex 由来の linear DNA が検出されたことから、(*S*)-erypoeegin K は Topo II 毒として阻害していることが明らかとなった。しかし、etoposide は濃度依存的に linear DNA が増加傾向にあるのに対し、(*S*)-erypoeegin K は高濃度においても linear DNA の増加は見られなかったことから、etoposide とは作用機序に何らかの違いがある可能性が示唆された。

(*S*)-erypoeegin K が固形がんにおいても細胞増殖阻害活性を示すかどうかを検討するため、ヒト胃がん細胞株 GCIY および MKN-1 に対する (*S*)-erypoeegin K による細胞生存率への影響を調べたところ、HL-60 細胞と同様に強い細胞死誘導活性がみられた (GCIY ; IC₅₀ = 0.270 μ M、MKN-1 ; 0.327 μ M)。また、両細胞に (*S*)-erypoeegin K を作用させて細胞周期に及ぼす影響を検討したところ、どちらの細胞も G2/M 期細胞の著しい増加がみられたことから、G2 アレストが引き起こされていることが想定された。すなわち、がん細胞は (*S*)-erypoeegin K により、細胞周期の正常な回転が阻害され、その結果、アポトーシスによる細胞死が引き起こされるものと考えられる。さらに、GCIY 細胞をヌードマウスに移植し、*in vivo*での抗腫瘍活性について検討した。(*S*)-erypoeegin K 投与群はコントロール群に比べて有意に腫瘍の増殖が抑制され、*in vivo*でも細胞増殖阻害活性を示すことが示された。しかし、腫瘍組織の増大を完全に止めたり、腫瘍が消失するまでには至らなかった。今後、(*S*)-erypoeegin K

の構造展開ならびに他の抗がん剤との併用による相乗効果などについて検討する必要がある。

以上、(S)-erypoeegin K は今後、新たな抗がん剤開発にとって極めて有用なリード化合物であることが示された。

小括

(S)-erypoeegin K の標的分子は、Topo II α であり、細胞周期の G2 アレストを引き起こすことにより細胞にアポトーシスを誘導すること、さらに(S)-erypoeegin K は固形がんであるヒト胃がん細胞株 GCIY ならびに MKN-1 に対しても、強力かつエナンチオ選択的な細胞死誘導活性を示すことを明らかにした。また担がんマウスを用いた実験から、(S)-erypoeegin K は用いた投与量では毒性を示すことなく *in vivo* での抗腫瘍活性を有することが示された。以上より、(S)-erypoeegin K は新たな抗がん剤の開発に向けて有用なリード化合物である可能性がある。

総括

本研究では、抗腫瘍活性を有する新規の植物由来イソフラボンを見い出すことを目的とし、マメ科植物ボリビアデイゴ (*Erythrina poeppigiana*) 樹皮から 10 種のイソフラボンを単離し、ヒトグリオキサラーゼ I (GLO I) 酵素活性に対する阻害活性とヒト白血病細胞株 HL-60 ならびに胃がん細胞株 GCIY に対する効果を検討した。

第一章では、単離したイソフラボンは 9 種が既知化合物であり、1 種が新規化合物であったことから、新規化合物を erythgianin A と命名し、その化学構造を各種の分光学的分析によって決定した。erythgianin A は高度に酸化された 3'',4''-dihydroxy-2''-hydroxymethyl-2''-methyl-2'',3''-dihydropyrano 置換基を有していた。また、既知化合物の 1 種については、これまでにクワ科植物からの報告が一報あるのみでマメ科植物から初めての報告であり、固有の名称を与えられていなかったことから erypoeigin K と命名した。次いで、ヒト GLO I に対する阻害活性を調べるため、遺伝子工学的手法を用いてヒト GLO I を大腸菌発現系にて発現させ、均一に精製することに成功した。精製酵素を用いて単離したすべてのイソフラボンについて阻害活性を調べた結果、分子内に 2 個のプレニル基を有する isolupalbigenin が最も強い阻害活性を示すことを明らかにした。

第二章では、第一章で比較的強いヒト GLO I 阻害活性がみられた化合物について、HL-60 細胞に対する作用を調べた。isolupalbigenin は HL-60 細胞に対してメチルグリオキサール (MG) の蓄積を引き起こし、さらにカスパーゼ 3 活性を有意に増大したことからアポトーシス誘導活性のあることを明らかにした。しかし、isolupalbigenin の HL-60 細胞に対する IC₅₀ 値は 13.4 μ M であり、既知の GLO I 阻害剤である *S*-*p*-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester (BBGC) の IC₅₀ 値 (3.6 μ M) より強力なものではなかった。isolupalbigenin の 2 個のプレニル基は HL-60 細胞中の GLO I 阻害に効果があり、細胞のアポトーシスを誘導したことから、今後 isolupalbigenin の構造をもとにより有効なリード化合物を見出せる可能性が示唆された。

第三章では、イソフラボン骨格の A 環に五員環を有する erypoeigin K と erythrinin C が互いに位置異性体であることから、これらの化合物の構造 - 活性相関を明らかにするためヒドロキシ基を有する hydroxyerythrinin C も含めて、HL-60 細胞に対する増殖阻害活性について検討した。その結果、erypoeigin K は HL-60 に対して極めて強力な細胞死誘導活性 (IC₅₀ = 175 nM) を示すことが明らかになった。この作用は GLO I 活性の阻害による MG の蓄積を伴い、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスによるものであることが示唆された。一方、ヒト末梢血リンパ球に対する erypoeigin K の細胞死誘導活性は低く、がん細胞に対してより特異的であった。一方、erypoeigin K の位置異性体である erythrinin C や hydroxyerythrinin C は HL-60 細胞の生存率に対する影響はあまり認められなかった。これらの知見から、erypoeigin K はがん細胞に選択的ながん治療薬開発のための基礎を提供する可能性があることが示唆された。

第四章では、erypoeegin K が HL-60 に対して極めて強力な細胞死誘導活性を示したことから、その生理活性について調べた。ポリビアデイゴ中に含まれる erypoeegin K はラセミ混合物であるため、(*R,S*)-erypoeegin K の化学合成を行った後、光学分割により(*R*)-、(*S*)-erypoeegin K を得、HL-60 細胞に対する作用を検討した。その結果、(*S*)-erypoeegin K が、強力かつエナンチオ選択的な細胞死誘導活性を示すことを明らかにした。しかし、ヒト GLO I 精製標品に対する(*S*)および(*R*)-erypoeegin K の阻害活性はほぼ同じで違いがなかったことから、GLO I が標的分子でない可能性が示唆された。

第五章では、ヒトがん細胞パネル (JFCR39) を用いて(*S*)-erypoeegin K の標的分子を探索した。その結果、Topoisomerase II (Topo II) が候補として挙げられ、精製ヒト Topo II α に対する(*S*)-erypoeegin K の影響を調べたところ、共有結合性反応中間体 (cleavage complex) 由来の linear DNA が検出された。一方、(*R*)-erypoeegin K ではそのような DNA バンドは検出されなかった。また、ドッキングシミュレーションの結果から、(*S*)-erypoeegin K は、DNA と酵素タンパク質間の cleavage complex を安定化する水素結合をもつのに対し、(*R*)-erypoeegin K は、酵素への結合が(*S*)-erypoeegin K と逆向きであり、cleavage complex を安定化する水素結合なども見い出されなかった。以上から、(*S*)-erypoeegin K の標的分子は Topo II α であることが明らかになった。

次に、固形がんである胃がん細胞株 GCIY 細胞ならびに MKN-1 細胞に対する作用を検討した。その結果、(*S*)-erypoeegin K はいずれの細胞に対しても、強力かつエナンチオ選択的な細胞死誘導活性を示すことを明らかにした。また(*S*)-erypoeegin K は細胞周期の G2 アレストを引き起こすことによりアポトーシスを誘導することが示された。最後に担がんマウスを用いた実験から、(*S*)-erypoeegin K は用いた用量では毒性を示すことなく *in vivo* で抗腫瘍活性を有することが示された。以上より、(*S*)-erypoeegin K は新たな抗がん剤の開発に向けての有用なリード化合物であることを明らかにした。

謝辞

本研究全般において、長年にわたりご懇篤なるご指導を賜りました名城大学大学院薬学研究科教授 金田典雄先生に深く謝意を表します。研究の遂行にあたり日々、貴重なご助言を賜りました同准教授 村田富保先生に深く感謝いたします。

本研究において天然化合物の単離精製および構造決定を行っていただき、ご指導を賜りました名城大学名誉教授 田中 齊先生ならびに加藤國基先生（中部 TLO コーディネータ）に深く感謝申し上げます。また、**erypoeegin K** の合成をお引き受けいただきました東北大学理学部（現 信州大学繊維学部）教授 浅尾直樹先生、**JFCR39** ヒトがん細胞株パネルを用いた **COMPARE** 解析をしていただきました（公財）がん研究会がん化学療法センター分子薬理部長 旦 慎吾先生、ならびに **GCIY** 細胞のご提供と担がんマウス作成の手技をご指導を賜りました愛知県がんセンター研究所 中西速夫先生に深謝いたします。

本学位論文の作成にあたり、貴重なご意見、ご指導を賜りました名城大学大学院薬学研究科教授 井藤千裕先生ならびに山田修平先生にお礼申し上げます。

erypoeegin K の分子ドッキングシミュレーションを行っていただきました名城大学薬学部教授 小田彰史先生、名城大学大学院薬学研究科（博士課程） 仲吉朝希氏、**erypoeegin K** の $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ の測定を行っていただきました名城大学大学院薬学研究科准教授 坂井健男先生、高分解能質量分析でご協力いただきました名城大学分析センター助手 酒井達子先生に感謝いたします。

最後に、本研究を進めるにあたり、ご指導、ご助言を賜りました名城大学薬学部の多くの先生方、一生懸命実験をしていただいた学生、卒業生の皆さんに心から感謝申し上げます。

引用文献

1. Liu RH, Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *J Nutr*, **134**, 3479S–3485S (2004)
2. Katz L, Baltz RH, Natural product discovery: Past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **43**, 155–176 (2016)
3. Kumar A, Premoli M, Aria F, Bonini SA, Maccarinelli G, Gianoncelli A, Memo M, Mastinu A, Cannabimimetic plants: Are they new cannabinoidergic modulators? *Planta*, **249**, 1681-1694 (2019)
4. Hwang D, Kim M, Park H, Jeong MI, Jung W, Kim B. Natural products and acute myeloid leukemia: a review highlighting mechanisms of action. *Nutrients*, **11**, e1010 (2019)
5. Drahl C, Cravatt BF, Sorensen EJ, Protein-reactive natural products. *Angew Chem Int Ed Engl*, **44**, 5788–5809 (2005)
6. Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, Mastinu A, *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J Ethnopharmacol*, **227**, 300–315 (2018)
7. Park J-W, Woo KJ, Lee J-T, Lim JH, Lee T-J, Kim SH, Choi YH, Kwon TK, Resveratrol induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human colon cancer cells. *Oncol Rep*, **18**, 1269–1273 (2007)
8. Carter LG, D’Orazio JA, Pearson KJ, Resveratrol and cancer: Focus on in vivo evidence. *Endocr Relat Cancer*, **21**, R209–R225 (2014)
9. Yang C, Ma X, Wang Z, Zeng X, Hu Z, Ye Z, Shen, G, Curcumin induces apoptosis and protective autophagy in castration-resistant prostate cancer cells through iron chelation. *Drug Des Dev Ther*, **11**, 431–439 (2017)
10. Kim C, Kim B, Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: A Review. *Nutrients*, **10**, e1021 (2018)

11. Newman DJ, Cragg GM, Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 *J Nat Prod*, **79**, 629–661 (2016)
12. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT, Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, **93**, 2325-2327 (1971)
13. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB, Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature* **277**, 665-667 (1979)
14. Wall ME, Wani MC, Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *J ethnopharmacol*, **51**, 239-254 (1996)
15. Lin CM, Ho HH, Pettit G R, Hamel E, Antimitotic natural products combretastatin A-4 and combretastatin A-2: studies on the mechanism of their inhibition of the binding of colchicine to tubulin. *Biochemistry*, **28**, 6984-6991 (1989)
16. Magedov IV, Evdokimov NM, Karki M, Peretti AS, Lima DT, Frolova LV, Reisenauer MR, Romero AE, Tongwa P, Fonari A, Altig J, Rogelj S, Antipin MY, Shuster CB, Kornienko A, Reengineered epipodophyllotoxin. *Chem Commun (Camb)*, **48**, 10416-10418 (2012)
17. Bastos JK, Burandt CL, Nanayakkara ND, Bryant L, McChesney JD. Quantitation of aryltetralin lignans in plant parts and among different populations of *Podophyllum peltatum* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Nat Prod*, **59**, 406-408 (1996)
18. Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP Jr., The vinca alkaloids: A new class of oncolytic agents. *Cancer Res*, **23**, 1390-427 (1963)
19. Lin CM, Singh SB, Chu PS, Dempcy RO, Schmidt JM, Pettit GR, Hamel E, Interactions of tubulin with potent natural and synthetic analogs of the antimitotic agent combretastatin: a structure-activity study. *Mol Pharmacol*, **34**, 200-208 (1988)
20. Balunas MJ, Kinghorn AD, Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*, **78**, 431–441 (2005)

21. Safe S, Kasiappan R, Natural products as mechanism-based anticancer agents: Sp transcription factors as targets. *Phytother Res*, **30**, 1723-1732 (2016)
22. Okouneva T, Hill BT, Wilson L, Jordan MA, The effects of vinflunine, vinorelbine, and vinblastine on centromere dynamics, *Mol Cancer Ther*, **2**, 427-436 (2003)
23. Goldwasser F, Shimizu T, Jackman J, Hoki Y, O'Connor PM, Kohn KW, Pommier Y, Correlations between S and G₂ Arrest and the Cytotoxicity of Camptothecin in Human Colon Carcinoma Cells., *Cancer Res*, **56**, 4430-4437 (1996)
24. Chen GL, Yang L, Rowe TC, Halligan BD, Tewey KM, Liu LF, Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem*, **259**, 13560-13566 (1984)
25. Ouyang B, Beljin M, Stark GR, Taylor WR. G₂ arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. *Cancer Res*, **63**, 4074-4081 (2003)
26. Ouyang L, Luo Y, Tian M, Zhang SY, Lu R, Wang JH, Kasimu R, Li X, Plant natural products: from traditional compounds to new emerging drugs in cancer therapy. *Cell Prolif*, **47**, 506-515 (2014)
27. Lichota A, Gwozdziński K, Anticancer activity of natural compounds from plant and marine environment. *Int J Mol Sci*, **19**, e3533 (2018)
28. Ito C, Itoigawa M, Tan HT, Tokuda H, Mou X, Mukainaka T, Ishikawa T, Nishino H, Furukawa H, Anti-tumor-promoting effects of isoflavonoids on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett*, **152**, 187–192 (2000)
29. Lee K-T, Sohn I-C, Kim Y-K, Choi J-H, Choi J-W, Park H-J, Itoh Y and Miyamoto K-I, Tectorigenin, an isoflavone of *Pueraria thunbergiana* Benth., induces differentiation and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biol Pharm Bull*, **24**, 1117–1121 (2001)
30. Yokosuka A, Haraguchi M, Usui T, Kazami S, Osada H, Yamori T, Mimaki Y, Glaziovianin A, a new isoflavone, from the leaves of *Ateleia glazioviana* and its cytotoxic activity against human cancer cells. *Bioorg Med Chem. Lett*, **17**, 3091–3094 (2007)

31. Atindehou KK, Queiroz EF, Terreaux C, Traore D, Hostettmann K, Three new prenylated isoflavonoids from the root bark of *Erythrina vogelii*. *Planta Med*, **68**, 181–182 (2002)
32. Awouafack MD, Spiteller P, Lamshöft M, Kusari S, Ivanova B, Tane P, Spiteller M, Antimicrobial isopropenyl-dihydrofuranoisoflavones from *Crotalaria lachnophora*. *J Nat Prod*, **74**, 272–278 (2011)
33. Araya-Cloutier C, den Besten HM, Aisyah S, Gruppen H, Vincken JP, The position of prenylation of isoflavonoids and stilbenoids from legumes (Fabaceae) modulates the antimicrobial activity against Gram positive pathogens. *Food Chem*, **226**, 193-201 (2017)
34. Argenta DF, Silva IT, Bassani VL, Koester LS, Teixeira HF, Simões CMO, Antiherpes evaluation of soybean isoflavonoids. *Arch Virol*, **160**, 2335-2342 (2015)
35. Ahn E-M, Nakamura N, Akao T, Nishihara T, Hattori M, Estrogenic and antiestrogenic activities of the roots of *Moghania philippinensis* and their constituents. *Biol Pharm Bull*, **27**, 548–553 (2004)
36. Ito C, Itoigawa M, Kumagaya M, Okamoto Y, Ueda K, Nishihara T, Kojima N, Furukawa H, Isoflavonoids with antiestrogenic activity from *Millettia pachycarpa*. *J Nat Prod*, **69**, 138–141 (2006)
37. Veitch NC, Isoflavonoids of the leguminosae. *Nat Prod Rep*, **30**, 988-1027 (2013)
38. Ito C, Murata T, Itoigawa M, Nakao K, Kumagai M, Kaneda N, Furukawa H, Induction of apoptosis by isoflavonoids from the leaves of *Millettia taiwaniana* in human leukemia HL-60 cells. *Planta Med*, **72**, 424–429 (2006)
39. Tanaka H, Etoh H, Shimizu H, Oh-Uchi T, Terada Y, Tateishi Y, Erythrinan alkaloids and isoflavonoids from *Erythrina poeppigiana*. *Planta Med*, **67**, 871–873(2001)
40. Tanaka H, Oh-Uchi T, Etoh H, Shimizu H, Tateishi Y, Isofavonoids from the roots of *Erythrina poeppigiana*. *Phytochemistry*, **60**, 789–794 (2002)
41. Tanaka H, Oh-Uchi T, Etoh H, Sako M, Sato M, Fukai T, Tateishi Y, An

- arylbenzofuran and four isoflavonoids from the roots of *Erythrina poeppigiana*. *Phytochemistry*, **63**, 597–602 (2003)
42. Tanaka H, Etoh H, Kulkarni A, Fukai T, Phenolic constituents and alkaloids from *Erythrina* species. *Recent Res Devel Phytochem*, **8**, 83–116 (2004)
43. Tanaka H, Oh-Uchi T, Nitanda T, Baba M, Etoh H, Shimizu H, Prenylated cinnamylphenols, HIV-1 replication inhibitors, from *Erythrina poeppigiana*. *Int J Pharmaceut*, **238**, 1–12 (2002)
44. Sato M, Tanaka H, Tani N, Nagayama M, Yamaguchi R, Different antibacterial actions of isoflavones isolated from *Erythrina poeppigiana* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol*, **43**, 243–248 (2006)
45. Sato M, Tanaka H, Yamaguchi R, Oh-Uchi T, Etoh H, *Erythrina poeppigiana*-derived phytochemical exhibiting antimicrobial activity against *Candida albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol*, **37**, 81–85 (2003)
46. Djiogue S, Halabalaki M, Alexi X, Njamen D, Fomum ZT, Alexis MN, Skaltsounis A-L, Isoflavonoids from *Erythrina poeppigiana*: evaluation of their binding affinity for the estrogen receptor. *J Nat Prod*, **72**, 1603–1607 (2009)
47. Djiogue S, Halabalaki M, Njamen D, Kretzschmar G, Lambrinidis G, Hoepping J, Rafaelli FM, Mikros E, Skaltsounis A-L, Vollmer G, Erythroidine alkaloids: a novel class of phytoestrogens. *Planta Med*, **80**, 861–869 (2014)
48. Warburg O, On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269–270 (1956)
49. Racker E, The mechanism of action of glyoxalase. *J Biol Chem*, **190**, 685–696 (1951)
50. Thornalley PJ, The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J*, **269**, 1–11 (1990)
51. Geng X, Ma J, Zhang F, Xu C, Glyoxalase I in tumor cell proliferation and survival and as a potential target for anticancer therapy. *Oncol Res Treat.*, **37**, 570–574 (2014)

52. Rulli A, Carli L, Romani R, Baroni T, Giovannini E, Rosi G, Talesa V, Expression of glyoxalase I and II in normal and breast cancer tissues. *Breast Cancer Res Treat*, **66**, 67–72 (2001)
53. Ranganathan S, Tew KD, Analysis of glyoxalase-I from normal and tumor tissue from human colon. *Biochim Biophys Acta*, **1182**, 311–316 (1993)
54. Sakamoto H, Mashima T, Sato S, Hashimoto Y, Yamori T, Tsuruo T, Selective activation of apoptosis program by *S*-*p*-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in glyoxalase I-overexpressing human lung cancer cells. *Clin Cancer Res*, **7**, 2513–2518 (2001)
55. Sakamoto H, Mashima T, Kizaki A, Dan S, Hashimoto Y, Naito M, Tsuruo T. Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis. *Blood*, **95**, 3214–3218 (2000)
56. Thornalley PJ, Rabbani N, Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. *Semin Cell Dev Biol*, **22**, 318–325 (2011)
57. Cheng WL, Tsai MM, Tsai CY, Huang YH, Chen CY, Chi HC, Tseng YH, Chao IW, Lin WC, Wu SM, Liang Y, Liao CJ, Lin YH, Chung IH, Chen WJ, Lin PY, Wang CS, Lin KH, Glyoxalase-I is a novel prognosis factor associated with gastric cancer progression. *PLoS One*, **7**, e34352 (2012)
58. Takasawa R, Takahashi S, Saeki K, Sunaga S, Yoshimori A, Tanuma S, Structure-activity relationship of human GLO I inhibitory natural flavonoids and their growth inhibitory effects. *Bioorg Med Chem*, **16**, 3969–3975 (2008)
59. Oray B, Norton SJ, Glyoxalase I from mouse liver. *Methods Enzymol*, **90** 542–546 (1982)
60. Vince R, Daluge S, Wadd WB, Studies on the inhibition of glyoxalase I by *S*-substituted glutathiones. *J Med Chem*, **14**, 402-404 (1971).
61. Dai J, Shen D, Yoshida WY, Parrish SM, Williams PG, Isoflavonoids from *Ficus benjamina* and their inhibitory activity on BACE1. *Planta Med*, **78**, 1357–1362 (2012)

62. CAS Registry Number: 913690-46-7
63. Tahara S, Ingham JL, Mizutani J, New coumaronochromones from white lupin, *Lupinus albus* L. (Leguminosae). *Agric Biol Chem*, **49**, 1775–1783 (1985)
64. Kinoshita T, Ichinose K, Takahashi C, Ho FC, Wu JB, Sankawa U, Chemical studies on *Sophora tomentosa*: the isolation of a new class of isoflavonoid. *Chem Pharm Bull*, **38**, 2756–2759 (1990)
65. Tanaka H, Tanaka T, Etoh H, Watanabe N, Ahmad M, Qurashi I, Khan MR, Two new isoflavones from *Erythrina suberosa* var. *glabrescences*. *Heterocycles*, **48**, 2661–2667 (1998)
66. Hashidoko Y, Tahara S, Mizutani J, New complex isoflavones in the roots of Yellow Lupin (*Lupinus luteus* L., cv. Barpine). *Agric Biol Chem*, **50**, 1797–1807 (1986)
67. Sato H, Tahara S, Ingham JL, Dziedzic SZ, Isoflavones from pods of *Laburnum anagyroides*. *Phytochemistry* **39**, 673–676 (1995)
68. Tahara S, Katagiri Y, Ingham JL, Mizutani J, Prenylated flavonoids in the roots of Yellow Lupin. *Phytochemistry*, **36**, 1261–1271 (1994)
69. Tahara S, Ingham JL, Mizutani J, Stereochemical studies on dihydrofuranoisoflavones. *Agric Biol Chem* **51**, 211–216 (1987)
70. Iio M, Ishimoto S, Nishida Y, Shiramizu T, Yunoki, H, Effects of baicalein, a flavonoid, and other anti-inflammatory agents on glyoxalase-I activity. *Agric Biol Chem*, **50**, 1073–1074 (1986)
71. Santel T, Pflug G, Hemdan NY, Schäfer A, Hollenbach M, Buchold M, Hintersdorf A, Lindner I, Otto A, Bigl M, Oerlecke I, Hutschenreuther A, Sack U, Huse K, Groth M, Birkemeyer C, Schellenberger W, Gebhardt R, Platzer M, Weiss T, Vijayalakshmi MA, Krüger M, Birkenmeier G. Curcumin inhibits glyoxalase 1: a possible link to its anti-inflammatory and anti-tumor activity, *PLoS One*, **3**, e3508 (2008)

72. 飯尾雅嘉、金城順英、野原稔弘、クズから抽出したイソフラボンがグリオキサラーゼ I 活性と培養細胞の増殖に及ぼす影響、*日本栄養・食糧学会誌*、44、123-125 (1991)
73. Vince R, Wadd WB, Glyoxalase inhibitors as potential anticancer agents. *Biochem Biophys Res Commun*, **35**, 593–598 (1969)
74. Vince R., Daluge, S. Glyoxalase inhibitors. A possible approach to anticancer agents. *J Med Chem* **14**, 35-37 (1971)
75. Wolf D, Rotter V, Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**, 790–794 (1985)
76. Levine AJ, Momand J, Finlay CA, The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, **351**, 453-456 (1991)
77. Thornalley PJ, Ladan MJ, Ridgway SJ, Kang Y, Antitumor activity of *S*-(*p*-bromobenzyl)glutathione diesters *in vitro*: a structure-activity study. *J Med Chem*, **39**, 3409-3411 (1996)
78. Chaplen FWR, Fahl WE, Cameron DC. Method for determination of free intracellular and extracellular methylglyoxal in animal cells grown in culture. *Anal Biochem*, **238**, 171-178 (1996)
79. Nicolini F, Burmistrova O, Marrero MT, Torres F, Hernández C, J Quintana, F Estévez, Induction of G₂/M phase arrest and apoptosis by the flavonoid tamarixetin on human leukemia cells. *Mol Carcinog*, **53**, 939-950 (2014)
80. Park S, Kim DS, Kim JH, Kim JS, Kim HJ, Glyceollin-containing fermented soybeans improve glucose homeostasis in diabetic mice. *Nutrition*, **28**, 204-211 (2012)
81. Kretzschmar G, Zierau O, Wober J, Tischer S, Metz P, Vollmer G, Prenylation has a compound specific effect on the estrogenicity of naringenin and genistein. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **118**, 1-6 (2010)
82. Arung ET, Shimizu K, Tanaka H, Kondo R, 3-Prenyl luteolin, a new prenylated flavone with melanin biosynthesis inhibitory activity from wood of *Artocarpus*

heterophyllus. *Fitoterapia*, **81**, 640-643 (2010)

83. Barbieri R, Coppo E, Marchese A, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SF, Nabavi SM, Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiol Res* **196**, 44–68 (2017)

84. Křížová L, Dadáková K, Kašparovská J, Kašparovský T, Isoflavones, *Molecules*, **24**, 1076–1103 (2019)

85. de Ávila ARA, de Queirós LD, Ueta TM, Macedo GA, Macedo JA, Exploring in vitro effects of biotransformed isoflavones extracts: Antioxidant, antiinflammatory, and antilipogenic. *J Food Biochem*, **43**, e12850 (2019)

86. Leclercq G, Jacquot Y. Interactions of isoflavones and other plant derived estrogens with estrogen receptors for prevention and treatment of breast cancer-considerations concerning related efficacy and safety. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **139**, 237–244 (2014)

87. Nabavi SF, Braidly N, Gortzi O, Sobarzo-Sanchez E, Daglia M, Skalicka-Woźniak K, Nabavi SM, Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: a brief review. *Brain Res Bull*, **119**, 1–11 (2015)

88. Baxa DM, Luo X, Yoshimura FK, Genistein induces apoptosis in T lymphoma cells via mitochondrial damage. *Nutr Cancer*, **51**, 93–101 (2005)

89. Mahmoud AM, Yang W, Bosland MC. Soy isoflavones and prostate cancer: a review of molecular mechanisms. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **140**, 116–132 (2014)

90. Uifălean A, Schneider S, Ionescu C, Lalk M, Iuga CA, Soy isoflavones and breast cancer cell lines: molecular mechanisms and future perspectives. *Molecules*, **21**, e13 (2015)

91. Su SJ, Chow NH, Kung ML, Hung TC, Chang KL, Effects of soy isoflavones on apoptosis induction and G2-M arrest in human hepatoma cells involvement of caspase-3 activation, Bcl-2 and Bcl-XL downregulation, and Cdc2 kinase activity. *Nutr Cancer*, **45**, 113–123 (2003)

92. Boyum A, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **97**, 77–89 (1968)
93. Desai KM, Wu L, Free radical generation by methylglyoxal in tissues. *Drug Metabol Drug Interact*, **23**, 151–173 (2008)
94. Kalapos MP, The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem Biol Interact*, **171**, 251–271 (2008)
95. Talukdar D, A brief critical overview of the biological effects of methylglyoxal and further evaluation of a methylglyoxal-based anticancer formulation in treating cancer patients. *Drug Metabol Drug Interact*, **23**, 175–210 (2008)
96. Seo K, Ki SH, Shin SM, Methylglyoxal induces mitochondrial dysfunction and cell death in liver. *Toxicol Res*, **30**, 193–198 (2014)
97. Chan WH, Wu HJ, Shiao NH, Apoptotic signaling in methylglyoxal-treated human osteoblasts involves oxidative stress, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3, and p21-activated kinase 2. *J Cell Biochem*, **100**, 1056–1069 (2007)
98. Kang Y, Edwards LG, Thornalley PJ, Effect of methylglyoxal on human leukaemia 60 cell growth: modification of DNA G1 growth arrest and induction of apoptosis. *Leuk Res*, **20**, 397–405 (1996)
99. Okado A, Kawasaki Y, Hasuike Y, Takahashi M, Teshima T, Fujii J, Taniguchi N, Induction of apoptotic cell death by methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in macrophage-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, **225**, 219–224 (1996)
100. Maharik NA, Botting NP. Synthesis of lupiwightone via a *para*-Claisen-Cope rearrangement. *Tetrahedron*, **59**, 4177–4181 (2003)
101. Tahara S, Misumi E, Mizutani J, Ingham JL, Fungal metabolism of the prenylated isoflavone 2,3-dehydrokieveitone. *Z Naturforsch*, **42** 1055–1062 (1987)
102. Hasim S, Hussin NA, Alomar F, Bidasee KR, Nickerson KW, Wilson MA, A glutathione-independent glyoxalase of the DJ-1 superfamily plays an important role in

managing metabolically generated methylglyoxal in *Candida albicans*. *J Biol Chem*, **289**, 1662-1674 (2014)

103. Dan S, Tsunoda T, Kitahara O, Yanagawa R, Zembutsu H, Katagiri T, Yamazaki K, Nakamura Y, Yamori T, An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines. *Cancer Res*, **62**, 1139–1147 (2002)

104. Kong D, Yamori T. JFCR39, a panel of 39 human cancer cell lines, and its application in the discovery and development of anticancer drugs. *Bioorg Med Chem*, **20**, 1947-1951 (2012)

105. Vos SM, Tretter EM, Schmidt BH, Berger JM. All tangled up: How cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 827-841 (2011)

106. Chen SH, Chan NL, Hsieh TS, New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, **82**, 139-170 (2013)

107. Case DA, Cerutti DS, Cheatham TE III, Darden TA, Duke RE, Giese TJ, Gohlke H, Goetz AW, Greene D, Homeyer N, Izadi S, Kovalenko A, Lee TS, LeGrand S, Li P, Lin C, Liu J, Luchko T, Luo R, Mermelstein D, Merz KM, Monard G, Nguyen H, Omelyan I, Onufriev A, Pan F, Qi R, Roe DR, Roitberg A, Sagui C, Simmerling CL, Smith WMB, Swails J, Walker RC, Wang J, Wolf RM, Wu X, Xiao L, York DM, Kollman PA, *AMBER* 2017, University of California, San Francisco

108. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R, Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol*, **3**, 727-748 (1997)

109. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y, Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, **262** 5592-5595 (1987)

110. Bandele OJ, Osheroff N, Bioflavonoids as poisons of human topoisomerase II α and II β . *Biochemistry*, **46**, 6097-6108 (2007)

111. Markovits J, Linassier C, Fossé P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, Saucier

J, Le Pecq J, Larsen AK, Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res*, **49**, 5111-5117 (1989)

112. D'Arcy N, Gabrielli N, Topoisomerase II inhibitors and poisons, and the influence of cell cycle checkpoints. *Curr Med Chem*, **24**, 1504-1519 (2017)