

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640087

研究課題名(和文)チアカリックスアレーン類縁体の抗がん作用とがん細胞の細胞周期進行に与える影響

研究課題名(英文) Effects of thiacalixarene derivatives on the proliferation and the cell cycle distribution of leukemia cell line

研究代表者

夏井 美幸 (Natsui, Miyuki)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：60227527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：チアカリックスアレーンは架橋部位に硫黄原子を有するp-アルキルフェノールの環状オリゴマーである。私たちはこれまで、チアカリックス[6]アレーンヘキサスルホン酸(TC6AHS)が白血病細胞株の細胞周期の進行に影響を及ぼすことを見出してきた。本研究では、TC6AHS類縁体を新たに合成し、細胞周期に与える影響さらに抗腫瘍活性を調べることを目的としている。TC6AHS類縁体の細胞周期に対する影響を調べた結果、TC6AHSがG2/M期で停止するのに対し、チアカリックス[6]アレーン(TC6A)はG1期で停止することが分かった。また、TC6AはTC6AHSよりも強い細胞増殖抑制効果を示すことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Thiacalixarenes, cyclic oligomers of p-alkylphenol bridged by sulfur atoms, are supramolecules known to have potent coordinating ability to metal ions. We have found so far that thiacalix[6]arene hexasulfate (TC6AHS) affects the distribution of cell cycle in leukemia cell lines. In this study, we aimed to elucidate the effect of newly-synthesized TC6AHS derivatives on the cell cycle progression and the proliferation. Thiacalix[6]arene (TC6A) was found to be induced the arrest at the G1 phase, while TC6AHS arrested at the G2/M phase. Moreover, TC6A exhibited a potent anti-proliferative activity against Jurkat cells, as compared to TC6AHS.

研究分野：生化学

キーワード：チアカリックスアレーン 抗がん剤 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

カリックスアレーンとはメチレン基によって架橋された *p*-アルキルフェノールの環状オリゴマーで、分子の空孔内に小分子や金属イオンを包接できることからホスト-ゲスト化学における主要な化合物である。架橋部位にスルフィド基を用いたチアカリックスアレーン (図 1) は、遷移金属イオンとの複合体 (錯体) 形成能がカリックスアレーンと比べ飛躍的に向上し、さらには水酸基や *p* 位を誘導体化することにより選択的な金属イオンとの錯体形成が可能となることが報告されている。このような金属イオンとの錯体形成能を有するチアカリックスアレーンは、生体内において様々な重要な働きをしている金属イオンの機能をも調節することが可能であると考えられる。

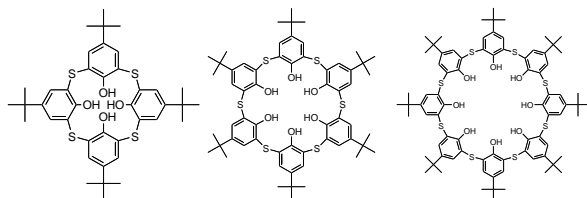


図 1 tert-ブチルチアカリックス[n]アレーン  
左から、n=4、6、8

我々はチアカリックスアレーン誘導体の生物活性を探索する過程において、これまでにチアカリックス[4]アレーンテトラスルホン酸 (TC4ATS、図 2) のカドミウムイオン錯体が白血病細胞株の増殖抑制を引き起こすこと、さらにはマウスを用いた異種移植モデルにおいて抗腫瘍効果を示すことを明らかにしてきた。最近、さらなる検討を行なった結果、チアカリックス[6]アレーンヘキサスルホン酸 (TC6AHS、図 2) が T 細胞性白血病細胞株の細胞周期の進行を G2/M 期で停止することを見出した。

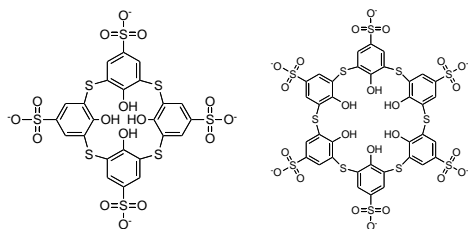


図 2 チアカリックスアレーンスルホン酸  
左から、TC4ATS、TC6AHS

2. 研究の目的

本研究では、TC6AHS 類縁体を新たに合成し、細胞周期に与える影響さらに抗腫瘍活性を調べることを目的としている。

3. 研究の方法

TC6AHS 類縁体

TC6AHS 類縁体として、tert-ブチルチアカリックス[6]アレーン、チアカリックス[6]アレーン、チアカリックス[6]アレーンプロピル化体、チアカリックス[6]アレーンエチルエステル化体、チアカリックス[6]アレーンアセチル化体を合成した (図 3)。また、チアカリックス[8]アレーンオクタスルホン酸 (TC8AOS) も合成した (図 3)。

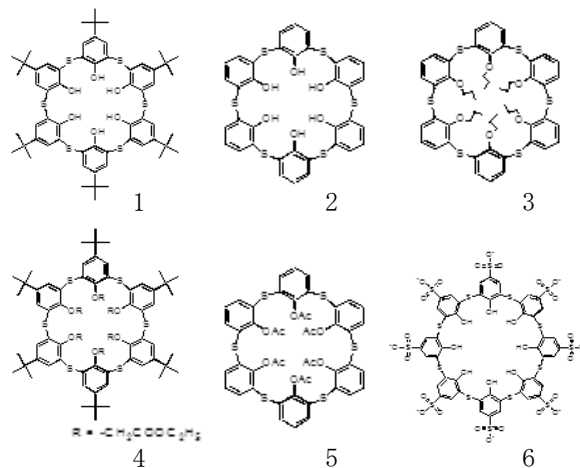


図 3 本研究で用いた TC6AHS 誘導体

1: tert-ブチルチアカリックス[6]アレーン、2: チアカリックス[6]アレーン、3: チアカリックス[6]アレーンプロピル化体、4: チアカリックス[6]アレーンエチルエステル化体、5: チアカリックス[6]アレーンアセチル化体、6: チアカリックス[8]アレーンオクタスルホン酸 (TC8AOS)

細胞周期の分析

96 ウェルプレートに  $1 \times 10^5$  cells の T 細胞性急性白血病細胞株 Jurkat 細胞および被検試料を添加し、37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養する。20 時間後、培養上清を除去し、DNA 染色液 (50 µg/ml ヨウ化プロピジウム、20 µg/ml RNase A、0.1% クエン酸ナトリウム、0.3% Nonidet P-40) を添加し、室温で 2 時間反応する。細胞に含まれる DNA 含量を Flow cytometer により測定し、細胞周期の分布の解析を行なう。

MTT アッセイ

96 ウェルプレートに  $2 \times 10^4$  cells の Jurkat 細胞および被検試料 2-7 を添加し、37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養する。48 時間後、終濃度が 500 µg/ml となるよう MTT を添加し、4 時間さらに反応する。反応終了後、細胞溶解液 (40% ジメチルホルムアミド、2% 酢酸、20% SDS、0.03 M 塩酸) を添加し、室温で一晩攪拌する。マイクロプレートリーダーで 570 nm の吸光度を測定し、細胞の生存率を算出する。

#### 4. 研究成果

TC6AHS の誘導体 5 種、*tert*-ブチルチアカリックス[6]アレーン、チアカリックス[6]アレーン、チアカリックス[6]アレーンプロピル化体、チアカリックス[6]アレーンエチルエステル化体、チアカリックス[6]アレーンアセチル化体を用いて細胞周期の進行に与える影響を調べた (図 4)。TC6AHS は Jurkat 細胞の細胞周期の進行を 20  $\mu\text{M}$  の濃度で G2/M 期に停止した。TC6AHS のスルホ基が *tert*-ブチル基に置換した *tert*-ブチルチアカリックス[6]アレーンは細胞周期の停止を示さなかった。*tert*-ブチルチアカリックス[6]アレーンの水酸基に酢酸エチルが付加したエチルエステル化体にも細胞周期への影響は観察されなかった。*p* 位に置換基がないチアカリックス[6]アレーンは G2/M 期での停止を誘導しなかったのに対し、10-20  $\mu\text{M}$  の濃度で弱い G1 期での停止を導いた。しかし、チアカリックス[6]アレーンの水酸基がプロピル化したプロピル化体や、アセチル化したアセチル化体では G1 期停止は観察されなかった。これらの結果から、TC6AHS の G2/M 期停止誘導には *p* 位のスルホ基が必須であることがわかった。

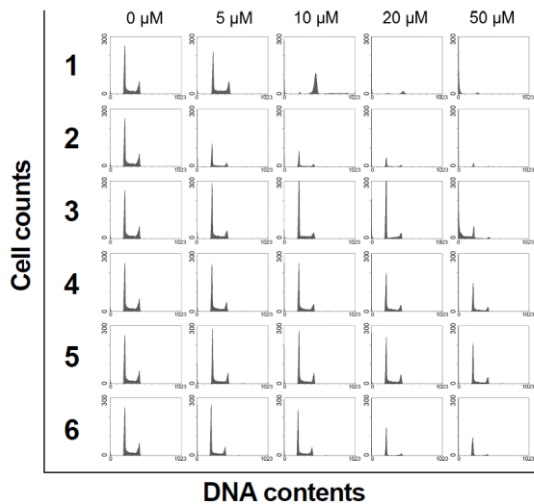


図 4 Jurkat 細胞の細胞周期の進行に対するチアカリックス[6]アレーン誘導体の影響

1: TC6AHS, 2: *tert*-ブチルチアカリックス[6]アレーン, 3: チアカリックス[6]アレーン, 4: チアカリックス[6]アレーンプロピル化体, 5: チアカリックス[6]アレーンエチルエステル化体, 6: チアカリックス[6]アレーンアセチル化体

次に、TC6AHS の誘導体 5 種の細胞増殖抑制効果を調べた (図 5)。TC6AHS の 50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は 30  $\mu\text{M}$  を示した。一方、チアカリックス[6]アレーンは 5.8  $\mu\text{M}$ 、チアカリックス[6]アレーンアセチル化体は 1.1  $\mu\text{M}$  の  $\text{IC}_{50}$  値を示し、TC6AHS より強い細胞増殖抑制活性が有ることがわかった。*tert*-ブチルチアカリックス[6]アレーン、チアカリックス[6]アレーンプロピル化体、チアカリックス[6]

アレーンエチルエステル化体の  $\text{IC}_{50}$  値は >100  $\mu\text{M}$  だった。

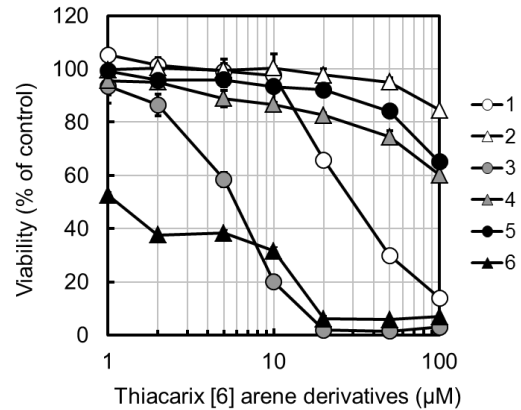


図 5 Jurkat 細胞の増殖に対するチアカリックス[6]アレーン誘導体の影響

1: TC6AHS, 2: *tert*-ブチルチアカリックス[6]アレーン, 3: チアカリックス[6]アレーン, 4: チアカリックス[6]アレーンプロピル化体, 5: チアカリックス[6]アレーンエチルエステル化体, 6: チアカリックス[6]アレーンアセチル化体

これまでの結果から、TC6AHS のスルホ基の存在が G2/M 期停止には必須であること、また重合度が低い TC4ATS では活性が確認されることがわかっている。そこで、重合度が高いチアカリックス[8]アレーンオクタスルホン酸 (TC8AOS) を合成し、細胞周期の進行に与える影響を調べた (図 6)。TC6AHS は Jurkat 細胞の細胞周期の進行を 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (37  $\mu\text{M}$ ) の濃度で G2/M 期に停止したのに対し、TC8AOS は 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (55  $\mu\text{M}$ ) の濃度で G2/M 期停止を誘導した。以上の結果と以前の TC4ATS の活性が確認されなかった結果から、チアカリックスアレーン誘導体の細胞周期停止作用には至適重合度が存在することが考えられる。

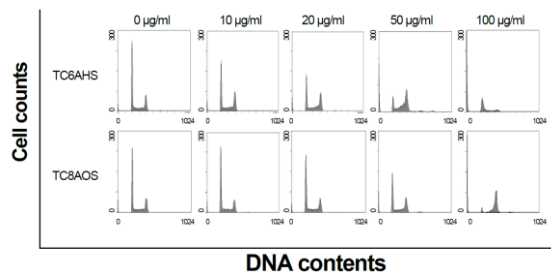


図 6 Jurkat 細胞の細胞周期の進行に対するチアカリックス[8]アレーンオクタスルホン酸の影響

次に、TC8AOS の細胞増殖抑制効果を調べた (図 7)。TC4ATS および TC6AHS の 50%

阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) はそれぞれ >300 µg/ml (>331 µM) と 49 µg/ml (36 µM) だったのに対し、TC8AOS は 270 µg/ml (149 µM) の IC<sub>50</sub> 値を示した。この細胞増殖抑制活性の強度 (TC6AHS > TC8AOS > TC4ATS) は細胞周期停止誘導活性と相関を示した。

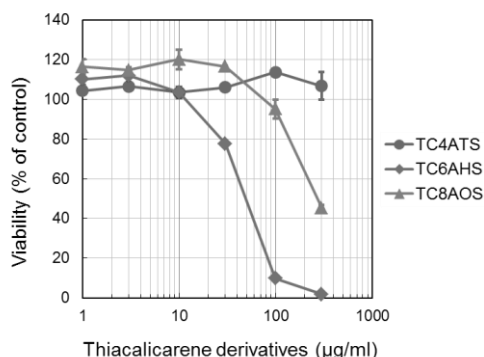


図7 Jurkat細胞の増殖に対するTC4ATS、TC6AHSおよびTC8AOSの影響

今回の結果から、TC6AHSのG2/M期停止誘導活性にはスルホン酸の存在が必須であり、ポリマーの重合度が上昇すると活性が低下することも分かった。また、スルホン酸の除去により、G1期停止という異なった活性発現が誘導されることが新たにわかった。

今後、

- ・チアカリックスアレーンスルホン酸の細胞周期誘導活性における至適重合度
- ・TC6AHSの官能基である-OH基、-SO<sub>3</sub>-基、または架橋部-S-の置換による効果
- ・マウス異種移植モデルを用いたTC6AHSの抗腫瘍効果
- ・TC6AHSによる細胞周期停止誘導の作用機序

などの解明が待たれる。

以上の結果から、超分子であるチアカリックスアレーンの誘導体が新たな抗がん剤開発に役立つことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Zhou X, Koizumi Y, Zhang M, Natsui M, Koyota S, Yamada M, Kondo Y, Hamada F, Sugiyama T. Cadmium-coordinated supramolecule suppresses tumor growth of T-cell leukemia in mice. *Cancer Sci*, 106, 635-641 (2015). 査読有  
DOI: 10.1111/cas.1265
2. Natsui M, Kawagoe M, Somei M, Koizumi Y, Koyota S, Sugiyama T. Stimulation of the hair growth by α2-blocker SST-VED. *Akita*

*J Med.* 41, 23-33 (2014) 査読有

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009839555/en>

3. Natsui M, Kawagoe M, Nagai S, Qiao Z, Sato Y, Flores MJ, Koizumi Y, Koyota S, Sugiyama T. Stimulation of the hair growth by a natural origin *Glechoma hederacea* extract. *Akita J Med.* 40, 1-12 (2013) 査読有  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009598136/en>

[学会発表] (計1件)

1. 2013年5月 日本生化学会東北支部 第79回例会・シンポジウム(仙台)「毛包器官培養法を用いたカキドオシ・エキスの発毛促進作用」夏井美幸、喬志偉、小泉幸央、小代田宗一、杉山俊博

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏井 美幸 (Miyuki Natsui)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：60227527