

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651229

研究課題名（和文）両親媒性液晶の集合機能を用いた固形がん細胞へのアポトーシスの誘導

研究課題名（英文）Supramolecular Assembly of Amphiphilic Mesogenic Compounds Inducing Apoptosis in a Human Solid Cancer Cell Line

研究代表者

吉澤 篤 (YOSHIZAWA ATSUSHI)

弘前大学・大学院・理工学研究科・教授

研究者番号：30322928

研究成果の概要(和文):細胞膜との相溶性が高いと推定される液晶性低分子量化合物を設計し、それらが固形がんである肺がん細胞の増殖抑制に及ぼす効果およびその薬理活性の作用機序を調べた。ピリジン環またはピリミジン環を含む3環からなる複素環化合物が 10 μ M の添加で 90%の細胞増殖抑制率を示した。いずれの化合物でもアポトーシスによる細胞死を誘導したが、含窒素芳香環の位置によってそのメカニズムが異なることが分かった。

研究成果の概要(英文): We investigated anti-cancer activity of mesogenic compounds possessing a hydroxyl group. The compounds were tested against A549 human lung adenocarcinoma cell line. Three ring heterocyclic derivatives containing a phenol unit showed significant suppression of the cell growth. The cell cycle analysis indicates that these compounds induce apoptosis. To determine the influence of these derivatives on normal cells, they were tested against WI-38 human lung fibroblast cell line under the same condition. Very interestingly, suppression of the normal cells was found to be dependent on the core structure of the mesogenic moiety. Some compounds induces apoptosis selectively against the tumor cell without suppressing the normal cell.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：医薬品探索・液晶・分子認識・がん・アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

がん細胞に対する化学療法が広く行われており、薬剤としては天然由来のものから合成物質まで多岐に渡っている。一方、固形がんである肺がんについては有効な化学療法剤は確立されていない。その理由として、薬剤が多層に渡る細胞膜を通過できずがん細胞に到達できないこと、および細胞内の分布が不十分なことによることが知られている (*Clin. Cancer Res.*, 2005, 11, 8782)。液晶はディスプレイに広く利用されているが、生体内の細胞膜も液晶構造を有する。液晶の生物学的応用について興味を持たれている。我々はディスプレイを超えた液晶の応用を目的にして様々な液晶オリゴマーを設計し、それらが階層構造を持つ液晶相を発現することを示してきた (Yoshizawa, *J. Mater. Chem.*, 2008, 18, 2877)。最近、肺がん細胞株に対する評価で液晶性と抗がん作用に相関が有ることを見つけた (Yoshizawa, *et al.*, *Chem. Lett.*, 2009, 38, 310)。また、側鎖に1級アルコールを持つシアノビフェニル誘導体ではがん細胞の増殖のみを抑制したのに対し、対応する2級アルコールの化合物はがん細胞と通常細胞の両者の増殖を抑制した (Yoshizawa, *et al.*, *Chem. Lett.*, 2009, 38, 530)。さらに、血液がんである白血病細胞株において、フェニールを持つ複素環化合物ががん細胞にストレスによるアポトーシスを誘導することがわかった (Fukushi, Yoshizawa, Kashiwakura *et al.*, *Invest. New Drugs*, 2011, 29, 827)。以上の研究から、液晶性を利用することで、通常細胞とがん細胞の違いを認識し、固形がん細胞のみにアポトーシスを誘導する分子設計が可能であると着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では液晶分子の分子間相互作用を用いて低分子量化合物からなる分子集合体を設計し、それらが固形がんである肺がん細胞と通常細胞である繊維芽細胞の増殖抑制に及ぼす効果およびその薬理活性の作用機序を調べる。両親媒性低分子量液晶性化合物を用いることにより、固形がんの問題となる細胞膜透過性を向上させるとともに、その両親媒性分子が膜透過後の細胞内で分子間相互作用により集合体を形成することを特色とする。構造-活性相関をもとに、低濃度 (1 μM 以下) の添加でがん細胞のみに選択的にアポトーシスを誘導する系を見つける。

3. 研究の方法

申請者らはこれ迄の研究で通常細胞には作用せずに肺がん細胞の増殖を抑制する混合物を得ているが、アポトーシスを誘導する

には至っていない。そこで、低濃度でアポトーシスを誘導する材料系の探索を当初の主眼とし、期間後半でその作用機序を明らかにする。手法は以下の通りである。両親媒性化合物を合成し、液晶性評価とともに混合系における分子間相互作用の有無について調べる。ヒト肺がん細胞および通常細胞である繊維芽細胞に投与し、それぞれの細胞増殖抑制に及ぼす効果を調べる。効果があったものについて細胞周期、シグナル伝達ならびに細胞内での液晶材料の分布を調べ、分子構造をもとに作用機序を検討する。他のがんに対する薬理活性について予備的な評価をする。

4. 研究成果

(1) フェノール性複素環化合物による抗腫瘍効果

フェノール性ヒドロキシ基とアルキル基 (またはアルコキシ基) を持つ含窒素複素環化合物について肺がん細胞 A549 の増殖に及ぼす効果を調べた。検討化合物の構造を表 1 に示す。

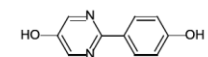
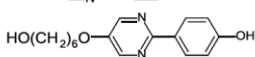
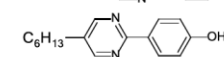
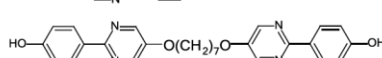
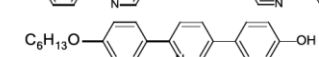
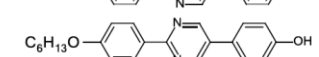
Compound	Structural formula
C1	
C2	
C3	
C4	
C5	
C6	

表 1. 抗腫瘍効果を調べたフェノール性ヒドロキシ基を持つ複素環化合物

腫瘍細胞として A549 ヒト肺がん細胞、正常細胞として WI-38 ヒト肺正常線維芽細胞を使用した。A549 細胞は 10% ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変培地 (DMEM) を用い、WI-38 細胞は 10% ウシ胎児血清を含む最小必須培地 (MEM) を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 雰囲気下で培養した。評価した化合物はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、細胞播種 24 時間後に培地中濃度が 10 μM となるように添加した。コントロールとして DMSO のみを添加した細胞を用いた。所定日数培養後、細胞を回収し生細胞をカウントした。アポトーシス解析および細胞周期測定はフローサイトメーター (Cytomics, Beckman-Coulter, CA, USA) を用いて行った。

各化合物の添加 72 時間後における A549 細胞のコントロールに対する生存率を図 1 に

示す。

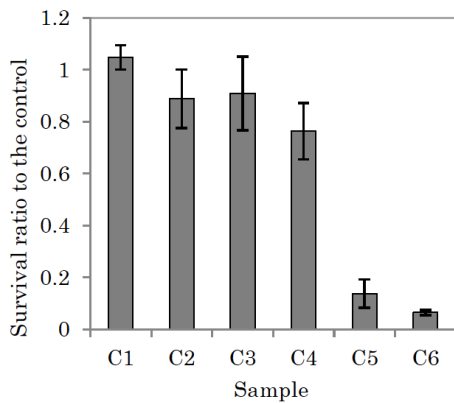


図 1. 各化合物添加 72 時間後における A529 細胞のコントロールに対する生存率

特に 3 環のピリミジン及びピリジン誘導体が顕著な抗腫瘍効果を示した。

次に強い抗腫瘍効果を示した C5 および C6 の細胞周期を測定した。図 2 に示すヒストグラムは横軸が色素 PI の蛍光強度、縦軸が細胞数を表している。PI は DNA に結合するため、細胞 1 つ 1 つの蛍光強度を測ることで細胞に含まれる DNA 量が測定され、ひいては細胞周期内のどの時期に細胞があるのかが明らかになる。細胞はアポトーシスを起こすと自ら DNA を分断し小胞体を形成するため Sub G1 期における細胞の蓄積はアポトーシス誘導を示唆している。

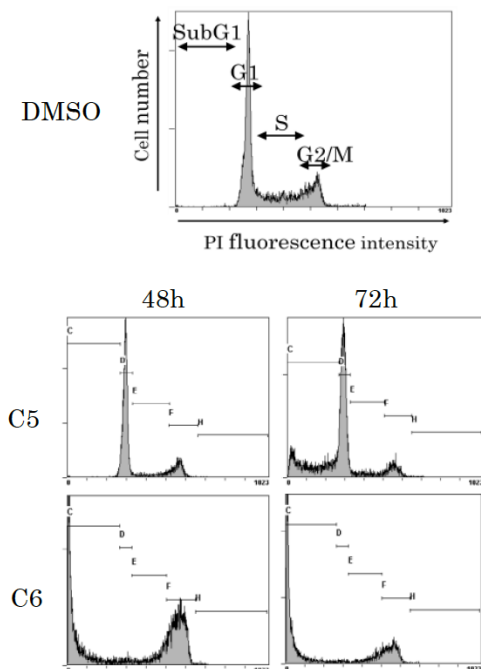


図 2. 各化合物添加時の A549 細胞周期

C5 では添加 48 時間で G1 期の細胞が増加し 72 時間後に Sub G1 期に集団が見られアポトーシスが誘導されていた。一方、C6 では 48 時間で G1 期の細胞が無くなり、Sub G1 期に顕著な蓄積が見られる。

さらに、C5 と C6 の正常細胞への影響を調べた。用いた細胞は WI-38 ヒト肺正常線維芽細胞で培地中の化合物濃度は同様に $10 \mu\text{M}$ である。C5 は WI-38 細胞に対し抑制効果を示さないのに対し、C6 では強い抑制を示した (図 3)。

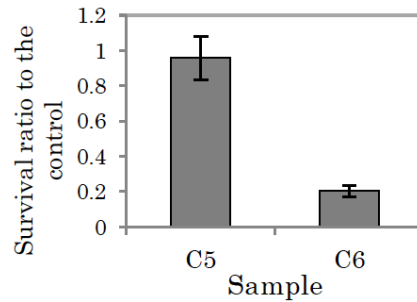


図 3. 正常細胞 WI-38 に対する影響

以上の結果から 3 環化合物においてコアの構造によってアポトーシス誘導のメカニズムが異なり、細胞選択性があることが示唆された。

(2) クラウンエーテル誘導体による細胞死の誘導

細胞膜の透過性を向上させるためにクラウンエーテル誘導体を用いた研究がなされており、アポトーシス (プログラムされた細胞死) の誘導による抗腫瘍効果が報告されている [1]. 細胞死には他にネクローシス (細胞の壊死) やネクロプトーシス (プログラムされたネクローシス) と呼ばれるものがある。我々は以前、液晶形成基にシアノビフェニルを用いた両親媒性化合物が A549 ヒト肺癌細胞株に対して抑制作用を示すことを報告した [2]。本研究では、液晶形成基にシアノビフェニルまたはフェニルピリミジンを用い、末端にクラウンエーテルを結合した化合物を合成し、A549 ヒト肺癌細胞株に対する作用を調べた。

検討した化合物の分子構造を図 4 に示す。薬理活性評価を行った化合物は全て DMSO に溶解し、サンプルとした。液体培地にサンプルを添加したものと、DMSO のみを添加したコントロールを用意し、これらの培地で A549 細胞を 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 存在下で所定日数培養後、細胞を回収し、コントロールと生細胞数を比較した。更に、より詳細な作用メカニズムを調べるためにフローサイトメトリーによる解析を行った。

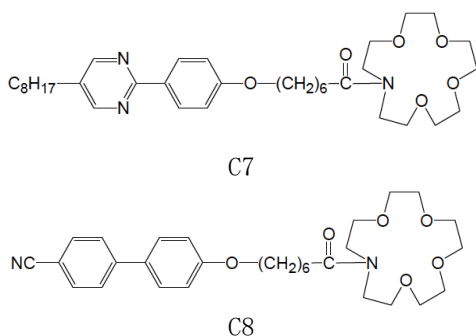


図4. クラウンエーテル含有液晶性化合物

10 μ M 添加ではコントロールに対して生存率が C7 と C8 で、それぞれ 1 % と 5 % であり、いずれも顕著な増殖抑制効果を示した。一方、クラウンエーテル単独ではほとんど抑制効果を示さなかった。また、A549 細胞での IC50 (細胞増殖を 50% 阻害する濃度) を調べたところ、C7 は 1.5 μ M、C8 は 5.2 μ M であった。

次に両者について細胞死のメカニズムを調べた。いずれの化合物を添加した際にも、細胞膜が崩壊するというネクローシスのような形態的变化が見られていた為、ネクロプトーシス阻害剤 (ネクロスタチン-1) を用いて解析を行った。C8 ではネクロプトーシス阻害剤の添加に関わらず生細胞がほぼ存在していなかったのに対し、C7 ではネクロプトーシス阻害剤を添加したことにより、生細胞の存在割合が増加した。これらの結果から、C7 は A549 細胞に対しネクロプトーシスを誘導したことが分かった。以上より、液晶形成基により細胞死のメカニズムが異なることが分かった。

また、他のがん細胞における抗腫瘍効果を予備的に検討した。浮遊系白血病細胞 THP1 においてもクラウンエーテル誘導体は細胞増殖を抑制した。また、C7 がアポトーシスを、C8 がネクローシスを誘導することがわかった。

参考文献

- [1] F. Supek, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 3444.
 [2] Y. Takahashi, et al., *Invest. New Drugs*, 2011, **29**, 659.

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) (いずれも査読有り)

- (1) Liquid crystal-related compound induces cell cycle arrest at G2/M phase and apoptosis in human non-small cancer cell line A549, T.

Wakasaya, H. Yoshino, Y. Fukushi, A. Yoshizawa, I. Kashiwakura, *International J. Oncology*, 2013, **42**, 1205-1211, DOI: 10.3892/ijo.2013.1804.

(2) Suppressive effects of liquid crystal compounds on the growth of U937 human leukemic monocyte lymphoma cells, J. Ishikawa, Y. Takahashi, M. Hazawa, Y. Fukushi, A. Yoshizawa, I. Kashiwakura, *Cancer Cell International*, 2012, **12**:3/1-7, DOI: 10.1186/1475-2867-12-3.

(3) 創薬化学における液晶, 富士由佳子, 吉澤 篤, 液晶, 2013, 16, 21-29.

〔学会発表〕 (計 4 件)

(1) 富士紗織, 液晶性化合物によるヒト肺がん細胞株 A549 の増殖抑制効果と構造-活性相関, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27 日~2013 年 3 月 30 日, パシフィコ横浜 (横浜市).

(2) 田中里奈, 液晶性化合物のがん増殖抑制におけるクラウンエーテルの効果, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27 日~2013 年 3 月 30 日, パシフィコ横浜 (横浜市).

(3) 富士紗織, 液晶性化合物による A549 ヒト肺がん細胞へのアポトーシス誘導, 2012 年日本液晶学会討論会, 2012 年 9 月 5 日~2012 年 9 月 7 日, 千葉大学西千葉キャンパス (千葉市).

(4) 田中里奈, ヒト肺癌細胞株に対するクラウンエーテル含有液晶性化合物の抗腫瘍効果, 2012 年 9 月 5 日~2012 年 9 月 7 日, 千葉大学西千葉キャンパス (千葉市).

〔図書〕 (計 1 件)

(1) 液晶の創薬分野への展開, 吉澤 篤, 日本学術振興会情報科学用有機材料第 142 委員会液晶部会編「液晶ディスプレイ物語 - 50 年の液晶開発と未来に託す夢 -」494-508 項, エース出版, 2013 年.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.st.hirosaki-u.ac.jp/~lclab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉澤 篤 (YOSHIZAWA ATSUSHI)

弘前大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号: 30322928