

抗腫瘍活性食用植物成分 curcumin をリードとする創薬化学研究

東北大院薬¹、秋田大院医² ○高山 亜紀¹、山越 博幸¹、叶 直樹¹、
柴田 浩行²、岩渕 好治¹

【背景と目的】

Curcumin は、低毒性で多様な生物活性を示す食用植物成分として広く知られる化合物である。当研究室では、curcumin の抗腫瘍活性に着目し、curcumin と類似の構造を有する化合物ライブラリーのがん細胞増殖阻害活性スクリーニングを行い、curcumin よりも低濃度で活性を示す bis(arylmethylidene)acetone 型アナログ (以下、C₅-curcuminoid と称する) GO-035 と共に、それと類似の構造でありながら殆ど活性を示さない GO-949 を見出した (Figure 1)。C₅-curcuminoid のようにエノン構造を有する化合物群は、求電子性の高さから毒性が懸念され、創薬展開された研究報告例は少ない。今回我々は、芳香環置換基のわずかな違いにより生じる活性の変化に興味を抱き、C₅-curcuminoid の抗腫瘍活性発現における詳細な分子認識機構を解明することを目的として、以下の研究を行った。

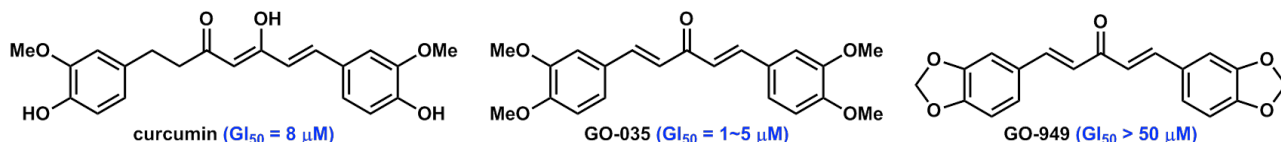


Figure 1. GI_{50} value for curcumin, GO-035 and GO-949

【方法と結果】

1. 構造活性相関研究

100 種類以上の誘導体を合成し、curcumin より 10 倍以上強い活性を有する GO-Y030 を見い出すと共に、C₅-curcuminoid の構造活性相関についての知見を得た (Figure 2)。特に、ジエノン構造に関する構造活性相関研究からは、活性発現に必須なジエノン構造が、Michael acceptor として働いていることが強く示唆された¹⁾。また、抗がん剤リード化合物として有望な GO-Y030 は、正常肝細胞に対して毒性を持たず、家族性大腸がんモデルマウスに対して延命効果をもたらした。

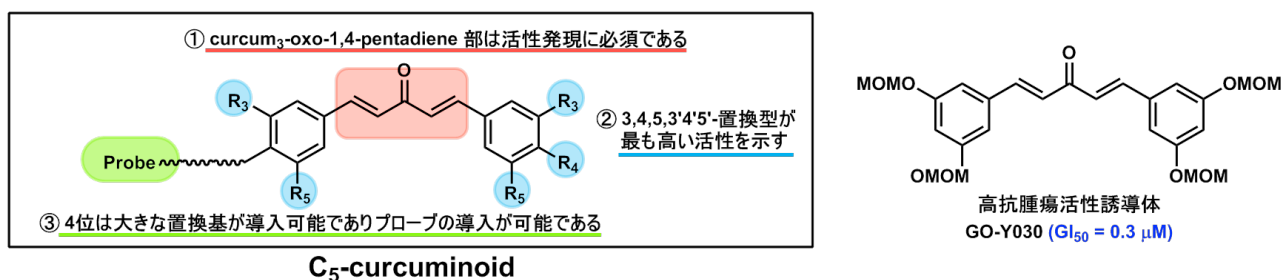


Figure 2. SAR about C₅-curcuminoids

2. 標的分子探索研究

構造活性相関で得られた知見を参考に、4 位に適切なリンカーを介してビオチン tag を導入した標的分子探索用プローブを設計した。この設計指針のもとに合成した GO-Y086 は抗腫瘍活性を保持していたため、GO-Y088 をコントロールとして標的分子の探索を行った。具体的には、GO-Y086, 088 を大腸がん細胞 HCT116 に投与し、その細胞抽出液をビオチン-アビジン相互作用を利用した免疫沈降によって精製した (Figure 3B)。得られたサンプルをゲル電気泳動させ、GO-Y086 特異的に検出された約 75 kDa のタンパク質 (Figure 3C, D) を PMF (Peptide Mass Fingerprinting) 法によって解析した結果、標的タンパク質として核内転写制御因子 KSRP (KH type splicing regulatory protein) を同定することができた²⁾。

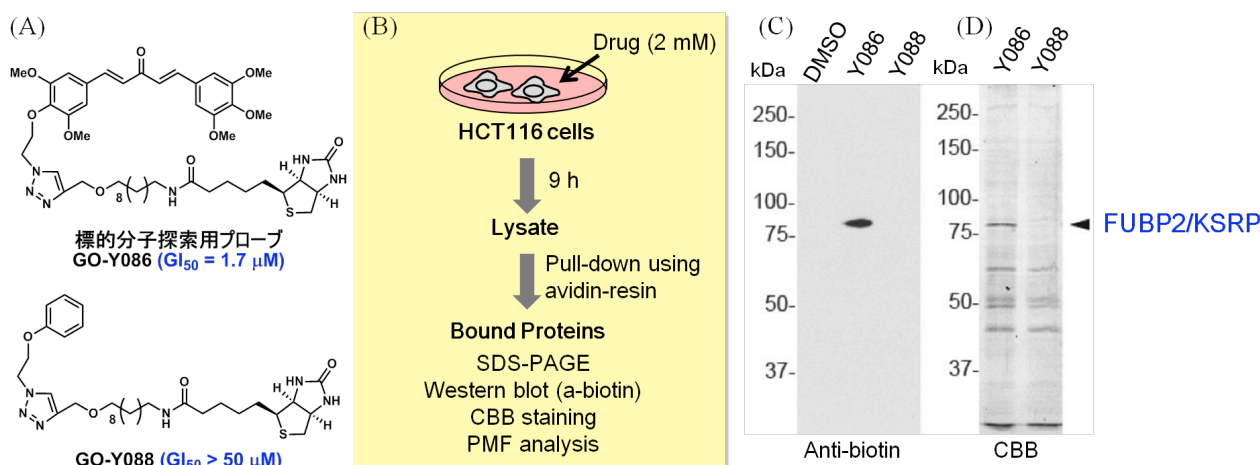


Figure 3. (A) The chemical structure of GO-Y086, 088. (B) Procedure for analyzing target protein. (C) Western blot. (D) CBB staining.

3. C₅-Curcuminoid の Michael acceptor としての性質の調査

C₅-Curcuminoid の Michael acceptor としての性質を精査するため、GO-Y030 とシステアミンを DMSO-*d*₆ 中混合し、¹H-NMR 解析を行うことで、Michael 反応及び retro Michael 反応の観測を行った。その結果、混合直後に GO-Y030 が消失して付加体が生成し、その後徐々に GO-Y030 が再生成することが確認された(**Figure 4**)。このことから、C₅-curcuminoid のジェノン構造は可逆的な Michael 反応を起こすという性質が示唆された。

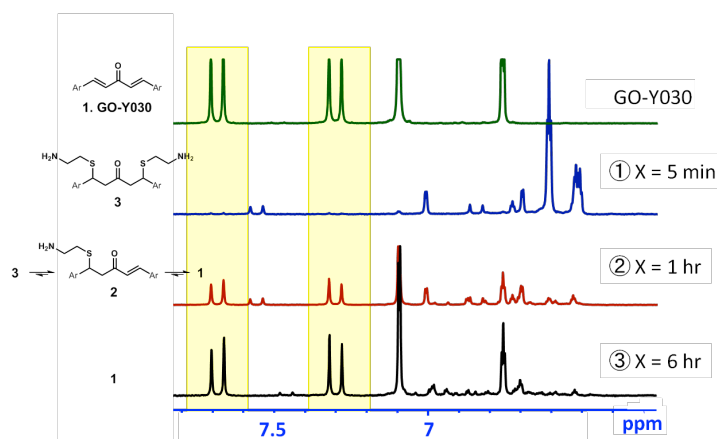


Figure 4. The ¹H-NMR spectra of GO-Y030 and GO-Y030 after X hr addition of cysteamine (4 eq.) in DMSO-*d*₆.

4. C₅-Curcuminoid プロドラッグ化による水溶性誘導体の獲得

3 で判明した C₅-curcuminoid の化学的性質を利用して、高活性誘導体 GO-Y030 にチオールを付加させたプロドラッグを 20 種類合成し抗腫瘍活性を評価した。合成した誘導体のほとんどは活性を保持しており、C₅-curcuminoid はチオールを付加させたプロドラッグ化が適用可能であることを実証できた。さらに、プロドラッグ化によって水溶性の改善に成功し、高活性水溶性誘導体 GO-Y140 を獲得した(**Figure 5**)³⁾。

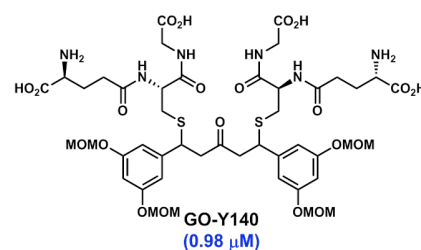


Figure 5. The chemical structure of GO-Y140

【考察】

1~4 の結果によって、C₅-curcuminoid の抗腫瘍活性発現における細胞内挙動メカニズムを次のように考察した(**Figure 6**)。すなわち、C₅-curcuminoid は細胞内で様々な生体チオール分子と可逆的な Michael 反応を起こしながら、核内に輸送されていき最終的に最も親和性の高い KSRP と共有結合を形成して細胞毒性を発現すると考えられる。

References : 1) Ohori, H.; Yamakoshi, H.; Ishioka, C.; Iwabuchi, Y.; Shibata, H. *et al. Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 153-159. 2) Yamakoshi, H.; Iwabuchi, Y. *et al. ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 273-276. 3) Yamakoshi, H.; Kohyama, A. Iwabuchi, Y. *et al. Manuscript in Preparation*

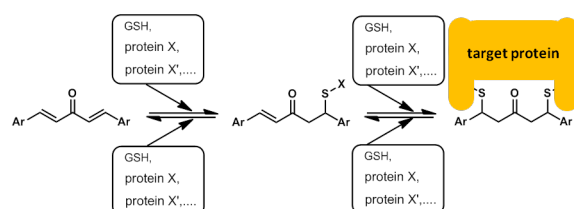


Figure 6. The mechanism of action of C₅-curcuminoids : hypothesis based on reversible Michael reaction