

抗ガン剤の新作作用機構：ポドフィロトキシン関連化合物と銅(II)から生成される有機ラジカル種の同定と解析

高木 和佳奈・杉野 圭司・安井 裕之・桜井 弘

(京都薬科大学・代謝分析学教室*)

A new mechanism of anticancer drug: Analysis and identification of free radicals derived from podophyllotoxin related compounds in the presence of Cu (II)

Wakana TAKAGI, Keisuke SUGINO, Hiroyuki YASUI and Hiromu SAKURAI

Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

VP-16 is a clinical anticancer drug for the treatment of a number of human cancers. Anticancer activity of VP-16 has been suggested to be due to a covalent enzyme-DNA complex between the drug and type II topoisomerase or to involvement of free radical species, which in turn cause double-strand DNA breaks in cancer. Previously, we have found that hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) is generated during a redox-dependent complex formation between Cu(II) and VP-16 in the presence of molecular dioxygen (O_2), suggesting the $\cdot\text{OH}$ participation in the single- and double-strand breaks of DNA. On the basis of results, we extended our investigation to look into the mechanism in detail, and VP-16 and its related compounds were found to form both organic free radical species and $\cdot\text{OH}$ in the presence of Cu(II) as detected by ESR and spin-trapping methods, respectively, their structures being analyzed by computer simulation and molecular orbital calculation. Then, we examined the relationship between the free radical formations and DNA-cleaving activities, and proposed a new mechanism of the free radicals-dependent DNA cleavage.

VP-16は、*Podophyllum peltatum*から単離されるポドフィロトキシンを基本骨格とした半合成抗ガン剤であり、現在臨床薬として用いられている。その作用機序は、トポイソメラーゼIIの阻害や、ラジカル産生によるDNA切断とされてきた。我々は、ラジカル産生機構に注目し、生体内金属元素との反応性の観点から研究してきた¹⁻³⁾。

最近、我々はVP-16およびその関連化合物であるDEPD (demethylepipodophyllotoxin) およびシリング酸 (SA) (Fig. 1) とCu(II)との反応により産生される有機ラジカル種をESRで検出し、その構造をシミュレーションにより同定するとともに、分子軌道法を用いて、ラジカル構造を提案した⁴⁾。さらに、この有機ラジカルかもしくは同時に産生される酸素分子由来の活性酸素種 (ROS) が、DNA切断に関与しているかを検討し、有機ラジカルが産生される条件下でDNAが切断されることを明らかにした。そこで、これらの結果および酸化還元電位を測定し、ラジカル産生によるDNA切断反応のメカニズムを総合的に議論することとした。

実験方法

ESRスピントラップ法：反応溶液は、最終濃度として4 mM SA, DEPDまたはVP-16, 20 μM CuCl_2 および2 mM H_2O_2 含み、最後にスピントラップ剤である45 mM DMPO (5,5'-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)を加えて混和し、室温でESR測定を開始した。SAは、pH 8のコリジン塩酸緩衝液に、VP-16およびDEPDはアセトニトリルとコリジン塩酸

*所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

緩衝液の混液 (4 : 1) に溶解したものをを用いた。測定条件を以下に示す。Magnetic field : 336.5 ± 5 mT, power : 4 mW, modulation amplitude width : 0.1 mT or 0.01 mT, sweep time : 2 min, time constant : 0.03 sec, gain : 200-500。ESRスペクトルシミュレーション : Isotropic EPR Simulation ver. 2.2A (LABOTEC Co., Ltd.) をを用いた⁵⁾。分子軌道 (MO) 計算 : 分子モデリングソフトMOLDAを用いてそれぞれの分子をモデリングし、最適化構造を決定後、MOPAC semi-empirical molecular orbital package program (ver. 7.0) をを用いて計算した。DNA切断実験 : シリンガ酸 (SA) 系は、コリジン塩酸緩衝液 (pH 8), $0.3 \mu\text{g}$ pUC19 DNA, SA, 2 mM H_2O_2 , $25 \mu\text{M}$ CuCl_2 の順に、VP-16系は、同緩衝液, $0.3 \mu\text{g}$ ColE1 DNA, VP-16, $50 \mu\text{M}$ CuCl_2 の順に試料を加えて反応 (37°C, 1時間もしくは3時間) した後、アガロースゲル電気泳動法により解析した。サイクリックボルタンメトリー (CV) : 2 mM SA, DEPDもしくはVP-16に、0.1 M KOHを添加してpHを上昇させ、CVを測定した。2 mM SA, DEPDもしくはVP-16は、50 (v/v) %アセトニトリルまたは、アセトニトリルとコリジン塩酸緩衝液の混液 (1 : 9) に溶解し、CVを測定した。支持電解質として、0.1 M NaClO_4 を用いた。電極は、グラッシーカーボン電極、キャロメル型参照電極、Ptカウンター電極を用い、BAS100Bで測定した。

結果・考察

1. 有機ラジカルの検出とその同定

コリジン塩酸緩衝液 (pH 8) 中において、SA, H_2O_2 , Cu(II) およびDMPOを反応させるとSA由来の有機ラジカルとヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) が同時検出された。一方、VP-16, Cu(II) およびDMPOを反応させると、VP-16由来の強い有機ラジカルが検出された (Fig. 2)。

得られた有機ラジカルの構造をESRシミュレーションしたところ、SA, DEPD, およびVP-16は共にフェノキシラジカルであり、7' 位の水素、メトキシ基の6つの水素、ベンゼン環の2つの水素、さらに8' 位、8位の水素がカップリングしたラジカルであることが、予想された (Table. 1)。

次に、SA, DEPDおよびVP-16のHOMO, SOMOおよびs-spin密度を計算した。1' 位の炭素、3' 位5' 位の炭素、4' 位の酸素のHOMOおよびSOMOの値が大きくなったことから、Fig. 3のような共鳴構造をもつフェノキシラジカルであることが予想され、ESRシミュレーション結果と相関した。

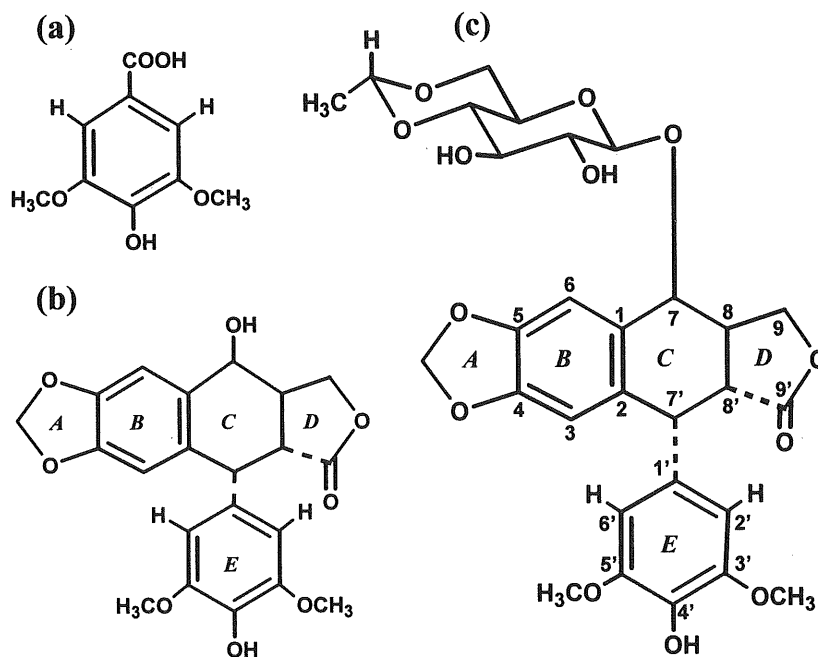


Fig. 1 Structures of (a)SA, (b)DEPD and (c)VP-16

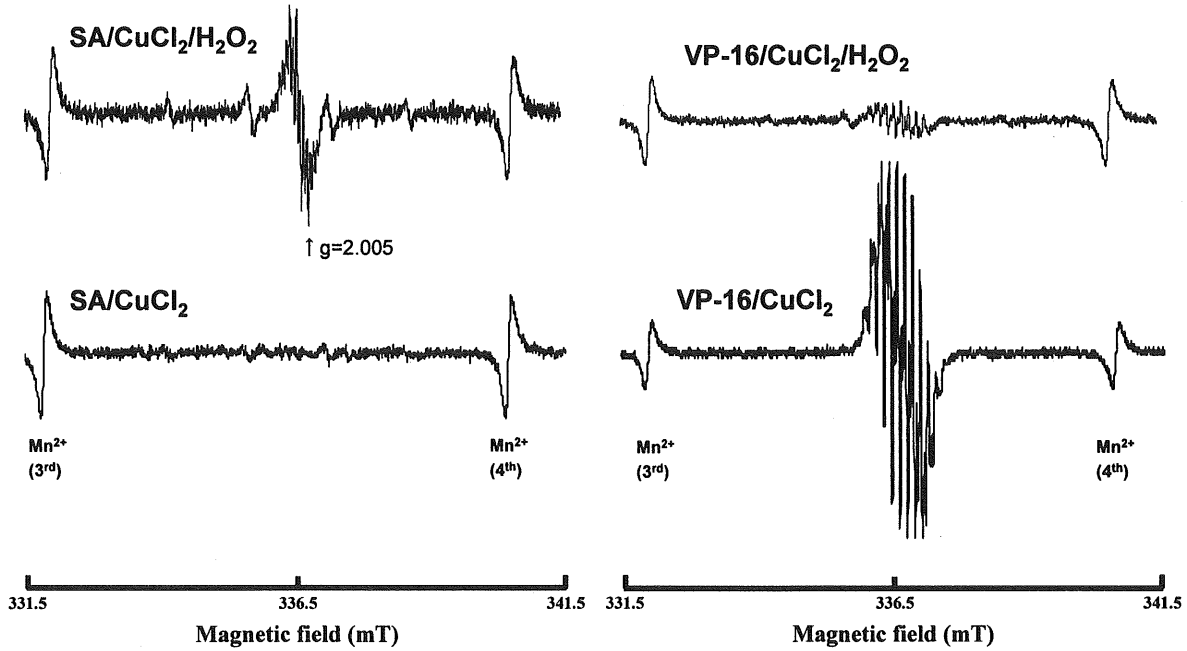


Fig. 2 ESR spectra of hydroxyl radical, SA radical and VP-16 radical in CuCl₂ and/or H₂O₂ systems

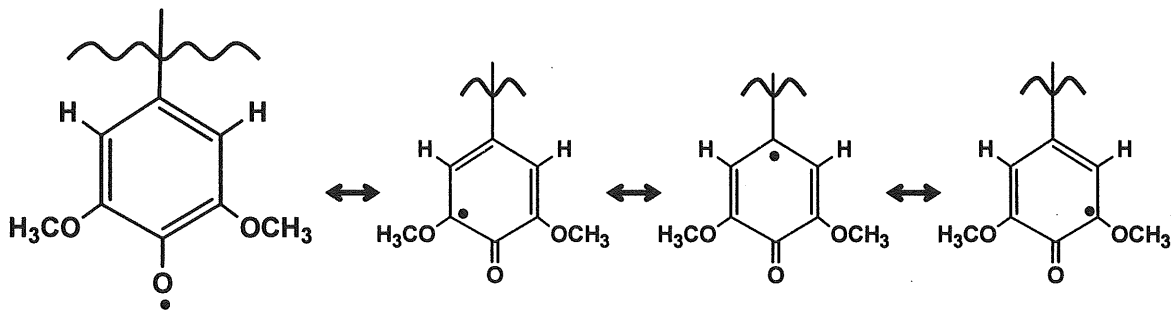


Fig. 3 The resonance structures of dimethoxyppyrogallol moiety in SA radical, DEP-D radical or VP-16 radical

Magnetic parameters of the radical					
radical	hyperfine coupling constant (mT)				
	a ^{H7'}	a ^{H7OCH₃}	a ^{H7RING}	a ^{H8'}	a ^{H8}
SA		0.1230 (6)	0.0712 (2)		
DEPD	0.4650 (1)	0.1365 (6)	0.1365 (2)	0.0540 (1)	0.0200 (1)
VP-16	0.4320 (1)	0.1404 (6)	0.1404 (2)	0.0630 (1)	0.0200 (1)

Table 1 Hyperfine coupling constants (mT) of SA radical, DEP-D radical or VP-16 radical. Numbers in parentheses denote the number of equivalent protons.

2. DNA切断活性

ESR測定により、VP-16およびSAは濃度依存的に、それぞれの有機ラジカル種にもとづく信号強度が増大した。同条件で、DNAの切断実験をおこなったところ、VP-16およびSAの濃度に依存して切断活性が上昇した。これらの結果から、生成した有機ラジカル種が、DNAの切断に関与していることが示唆された。(Fig. 4)

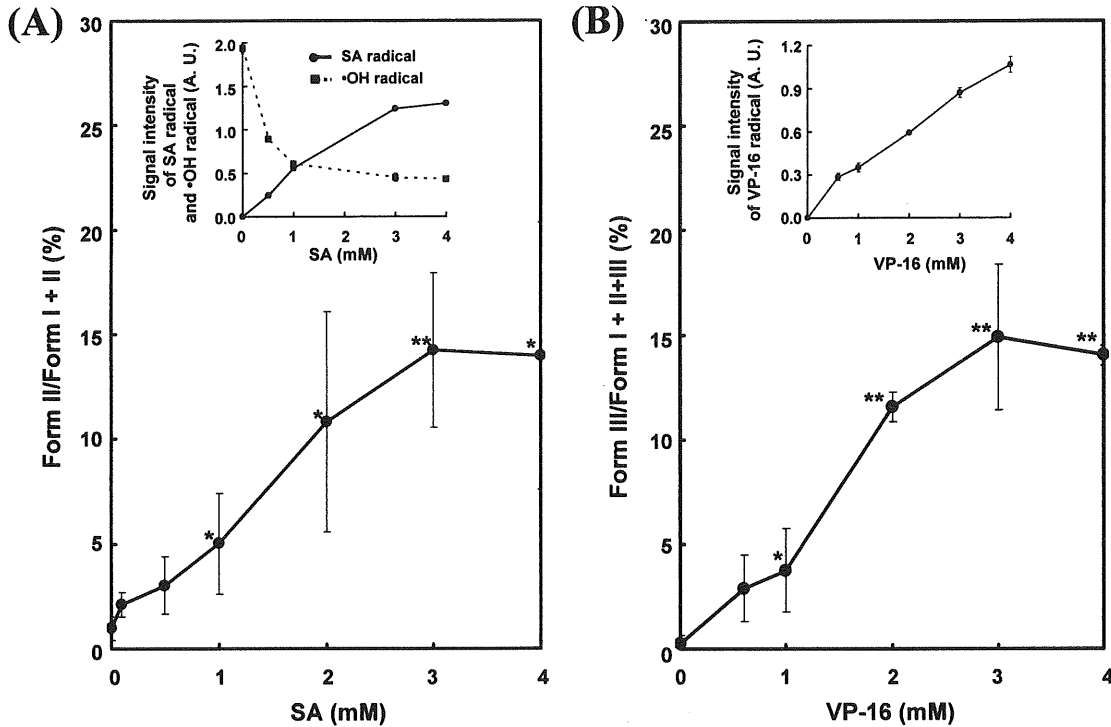


Fig. 4 (A) pUC19 DNA cleaving activity in SA/CuCl₂/H₂O₂ system
 Concentration; 25 μM CuCl₂, 2 mM H₂O₂, 0.3 μg pUC19 DNA
 (*: p < 0.05 vs 0 μM SA **: p < 0.01 vs 0 μM SA)
 Inset: ESR signal intensity changes of SA radical and hydroxyl radical in SA/CuCl₂/H₂O₂ system
 Concentration; 20 μM CuCl₂, 2 mM H₂O₂, 45 mM DMPO
 (B) ColE1 DNA cleaving activity in VP-16/CuCl₂ system
 Concentration; 50 μM CuCl₂, 0.3 μg ColE1 DNA
 (*: p < 0.05 vs 0 μM VP-16 **: p < 0.01 vs 0 μM VP-16)
 Inset: ESR signal intensity changes of VP-16 radical in VP-16/CuCl₂ system
 Concentration; 50 μM CuCl₂, 45 mM DMPO

3. ラジカル発生メカニズム

有機ラジカルの発生メカニズムを解明するため、ESRスピントラップ法を用いて検討した。・OHのスカベンジャーであるエタノール、安息香酸NaをSAラジカルおよびVP-16ラジカルが検出される条件下で添加すると、スカベンジャーの濃度依存的にそれぞれの有機ラジカルの強度が減少した。このことから、これらの有機ラジカルの発生過程において、・OHが関与していることが予想された。また、銅との反応性を比較するために、SA、DEPDおよびVP-16の酸化還元電位を検討したところ、フェニル基がプロトン解離して、フェノキシラジカルを生成していると考えられた。また、コリジン塩酸緩衝液 (pH 8) 中でCVを測定した結果、SAとDEPD、VP-16のボルタモグラムの形は、かなり違った形になったため、Cu(II)との反応性は、この酸化還元電位の違いによると推定された。

以上のことから、SA、DEPDおよびVP-16はCu(II)および・OHと反応し、共鳴構造をもつフェノキシラジカルとなり、DNA切断に関与していることが示唆された。

謝辞：本研究にご助言をいただいた広島国際大学薬学部 田和理市教授に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Sakurai H, Miki T, Imakura Y, Shibuya M, Lee K-H (1991) Metal- and photo-induced cleavage of DNA by podophyllotoxin, etoposide, and their related compounds, Mol. Pharmacol., 40, 965-973.

- 2) Yamashita A, Tawa R, Imakura Y, Lee K-H, Sakurai H (1994) Site-specific DNA cleavage by Cu(II) complexes of podophyllotoxin derivatives, *Biochem. Pharmacol.*, 47, 1920 - 1925.
- 3) Tawa R, Takami M, Imakura Y, Lee K-H, Sakurai H (1997) Effect of CpG methylation to double stranded DNA breaks by Cu(II) -podophyllotoxin derivative complexes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7, 489 - 494.
- 4) 高木和佳奈, 桜井 弘 (2003) SEST2003 要旨集 : pp.181 - 182.
- 5) Gao D, Kakuma M, Oka S, Sugino K, Sakurai H (2000) Reaction of β -alkannin (Shikonin) with reactive oxygen species: detection of β -alkannin free radicals *Bioorg. Med. Chem.*, 8, 2561 - 2569.