

転写因子 NF-Y に作用して腫瘍細胞の多剤耐性遺伝子の発現を抑制する indirubin 誘導体

生化学研究室 小林俊亮、大橋祥世、田中融

有機化学研究室 齋藤弘明

【要旨】

腫瘍細胞の多剤耐性獲得は、がん治療を困難にする重大な要因のひとつである。代表的な多剤耐性遺伝子 MDR1 の発現は主に転写因子 NF-Y により行われている。したがって、NF-Y の機能を阻害することにより MDR1 の発現を抑制することは、多剤耐性に対する有効な対抗手段と成り得る。我々は、MDR1 遺伝子プロモーター配列への NF-Y の結合性に影響を与える化合物をスクリーニングし、3 種の indirubin 誘導体を見出した。そのうちの 2 種は NF-Y の DNA 結合性を活性化し、1 種は抑制するものであったが、興味深いことに MDR1 遺伝子のプロモーター活性に対しては 3 種とも阻害的に作用した。NF-Y は 3 個のサブユニットからなる複合体であるが、これらの indirubin 誘導体はその発現量には影響を及ぼすことなく内在性の MDR1 遺伝子の発現を抑制することがわかった。さらに、これらの化合物を抗がん剤と併用することの効果についても検討した。

【序論】

がんの化学療法を困難にする原因のひとつとなる多剤耐性遺伝子 MDR1 の転写活性化は、その遺伝子の近位プロモーター領域にある逆向き CCAAT 配列を認識する転写因子 NF-Y によって行われる[1-5]。そのプロモーター領域には転写因子 Sp1 が結合する配列 GC-box も存在し、NF-Y と共に MDR1 の転写に関与している[6]。我々は、これまでにこの逆向き CCAAT と GC-box を含む近位プロモーター領域を EGFP cDNA に結合させたレポーター遺伝子を作成し、NF-Y と逆向き CCAAT の結合が低分子核内 RNA のひとつ U7 snRNA によって制御されていることを示している[7]。本研究では、そのレポーター遺伝子を用いて NF-Y 活性に影響を及ぼし、MDR1 遺伝子の転写を阻害する化合物を探索した。スクリーニングを行うに当たり、indirubin 誘導体ライブラリーを選択した。Indirubin は植物から抽出される色素のひとつであるが、多くの誘導体を合成することができ、それらの中には cyclin-dependent kinase (CDKs)を阻害するものや[8-11]、glycogen synthase

kinase 3 β を阻害するものがある[12-15]。それゆえ indirubin 誘導体は、がんや神経系の疾患の治療薬として利用できる可能性がある。さらに、近年、indirubin が生体内にも存在しており、Aryl hydrocarbon receptor (AhR)の生体内リガンドとして作用して薬の代謝や細胞ストレス、細胞分裂などに影響することが報告されている[16-18]。しかし、MDR1の発現に対する indirubin 誘導体の影響は調べられていない。

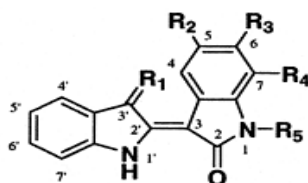
逆向き CCAAT への NF-Y の結合性に変化を及ぼす indirubin 誘導体を探すため、70 種以上の誘導体の中から様々な置換基を持つ 17 種類についてゲルシフトアッセイを行った。その結果、indirubin 3'-oxime (No. 2)、5-methoxyindirubin (No. 6)、7-methoxyindirubin 3'-oxime の 3 種が大きな影響を与えることがわかった。NG108-15、SK-N-SH、HepG2、MCF7、C2C12 の 5 種の腫瘍細胞を用いて 3 つの indirubin 誘導体の MDR1 遺伝子プロモーターへの影響を解析した。各々の細胞障害性を調べ、生存率に大きく影響しない濃度を用いて上述したレポーター遺伝子からの EGFP の発現を指標としてアッセイした。興味深いことに、それぞれの化合物は NF-Y の発現には影響を与えることなく MDR1 遺伝子のプロモーターを阻害して発現を抑制するが、その効果には腫瘍細胞特異性があることがわかった。さらに、3 種の化合物の全てが有効であった MCF7 細胞を用いて抗がん剤 doxorubicin との併用効果を調べたところ、これらの indirubin 誘導体の共存によって doxorubicin の使用量を軽減できることがわかった。本研究により、MDR1 発現阻害活性という indirubin 誘導体の新たな作用が示された。このような化合物は抗がん剤に対するがん細胞の感受性を高めるものとして期待される。

【結果と考察】

(1) MDR1 遺伝子プロモーターの逆向き CCAAT 配列への NF-Y の DNA 結合性に対する indirubin 誘導体の影響

本研究でスクリーニングに用いた indirubin 誘導体の構造リストを Fig. 1 に示した。NF-Y の DNA 結合性に対する影響は MDR1 遺伝子プロモーターの逆向き CCAAT を含む配列をプローブとし、NG108-15 細胞の核抽出液を用いたゲルシフトアッセイにより調べた (Fig. 2)。我々はこれまでに NG108-15 細胞が MDR1 を発現しており、このプローブが NF-Y 特異的に結合することを確認している[7]。17 種類の indirubin 誘導体のうち indirubin 3'-oxime (No. 2)と 7-methoxyindirubin 3'-oxime (No.12) は、NF-Y の DNA 結合性を大きく増加させ、5-methoxyindirubin (No. 6) は逆にその結合性を強く抑制した。

これらの化合物は、Sp1 の GC-box への結合には影響しなかった。その他の indirubin 誘導体には特に作用は観察されなかった。これら 3 種の化合物は、他の異なる 4 種類の腫瘍細胞（MCF7、HepG2、C2C12、SK-N-SH）に対しても NG108-15 で見られたものと同様の作用を示した（Fig. 2B）。この結果から、これらの化合物は用いた腫瘍細胞の MDR1 遺伝子プロモーター活性に対して何らかの影響を及ぼす可能性が考えられた。



indirubin 誘導体の基本骨格

Indirubin derivatives

Number	Name	R1	R2	R3	R4	R5	R6
1	Indirubin	H	O	H	H	H	H
2	Indirubin-3'-oxime	H	N-OH	H	H	H	H
3	5-Methoxyindirubin 3'-oxime	H	N-OH	OCH3	H	H	H
4	5-Bromoindirubin 3'-oxime	H	N-OH	Br	H	H	H
5	6-Bromo-1-methylindirubin 3'-oxime	H	N-OH	H	Br	H	CH3
6	5-Methoxyindirubin	H	O	OCH3	H	H	H
7	5-Hydroxyindirubin	H	O	OH	H	H	H
8	6-Methoxyindirubin	H	O	H	OCH3	H	H
9	6-Methoxyindirubin 3'-oxime	H	N-OH	H	OCH3	H	H
10	6-Hydroxyindirubin	H	O	H	OH	H	H
11	7-Methoxyindirubin	H	O	H	H	OCH3	H
12	7-Methoxyindirubin 3'-oxime	H	N-OH	H	H	OCH3	H
13	7-Hydroxyindirubin	H	O	H	H	OH	H
14	5,6-Dimethoxyindirubin 3'-oxime	H	N-OH	OCH3	OCH3	H	H
15	6-Bromoindirubin	H	O	H	Br	H	H
16	6-Bromoindirubin 3'-oxime	H	N-OH	H	Br	H	H
17	5'-Bromoindirubin 3'-oxime	Br	N-OH	H	H	H	H

Fig. 1 スクリーニングに用いた indirubin 誘導体。

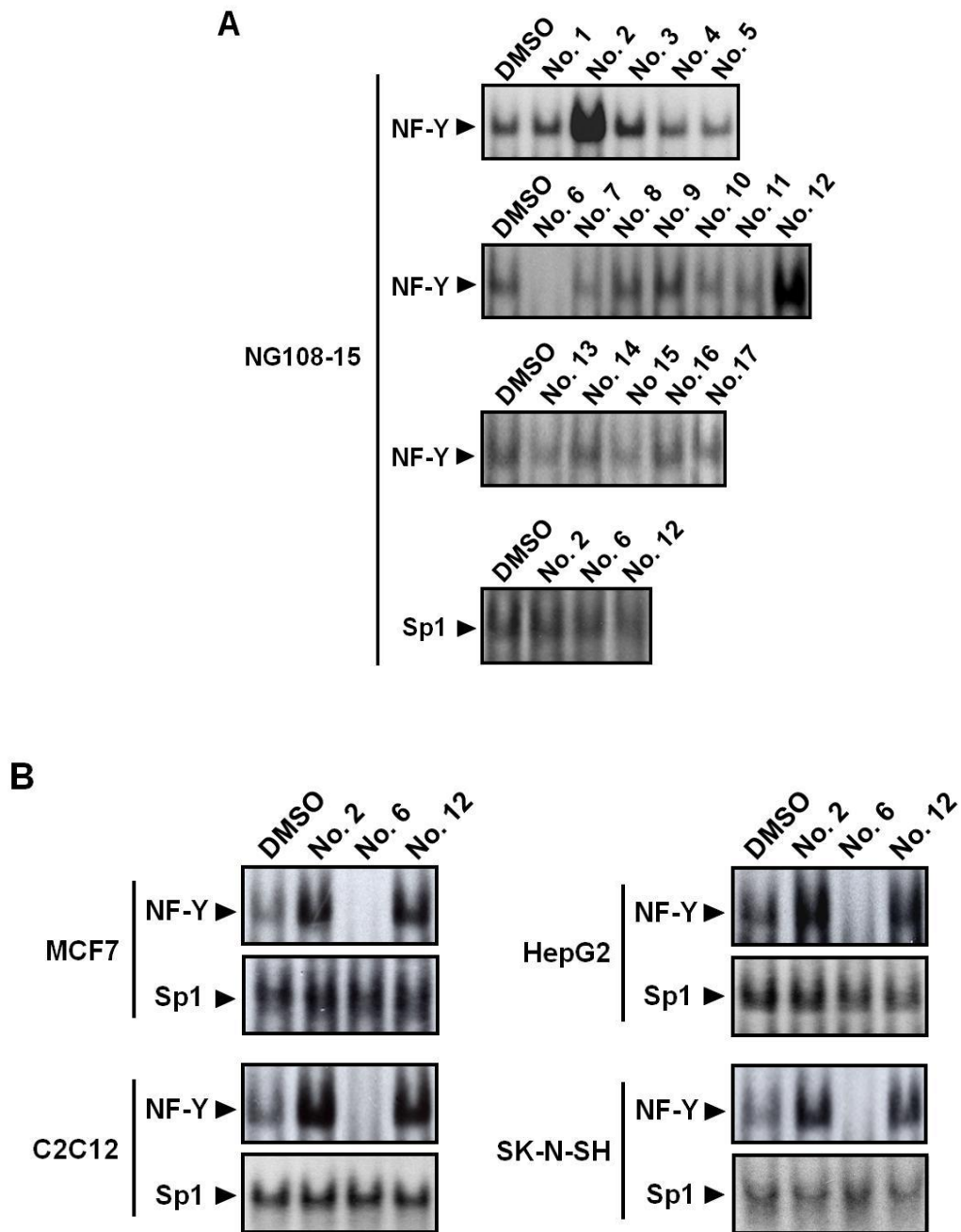


Fig. 2 NF-Y の DNA 結合性に対する indirubin 誘導体の影響

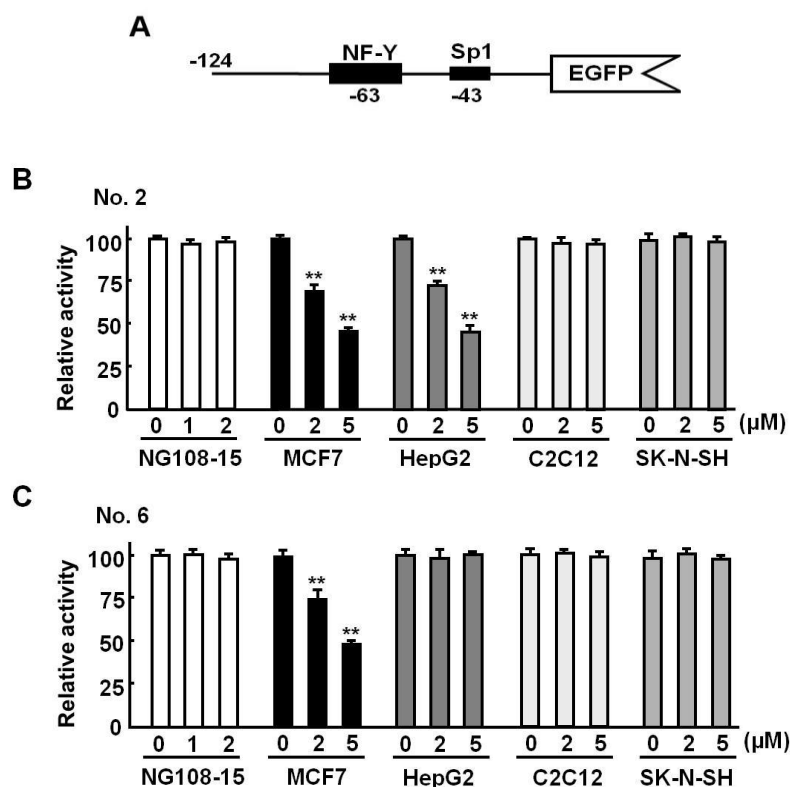
(A) 化合物 No.1~17 存在下において、NG108-15 細胞の核抽出液と MDR1 遺伝子プロモーター領域の逆向き CCAAT 配列を含むプローブを用いてゲルシフトアッセイを行った。また、No. 2、No. 6、No. 12 が Sp1 タンパク質と GC-box プローブとの結合に及ぼす影響も調べた。

(B) No. 2、No. 6、No. 12 が各 cell line の NF-Y と Sp1 の DNA 結合性に及ぼす影響。

(2) NF-Y の DNA 結合性を变化させる indirubin 誘導体の MDR1 遺伝子プロモーターへの影響。

多くの indirubin 誘導体は、それぞれに程度の差はあるが細胞障害性を示す。そこで、生存している腫瘍細胞中で MDR1 遺伝子プロモーター活性に対する効果を解析するための条件を検討した。上述の様々な腫瘍細胞に対して 3 種の化合物の濃度依存的な細胞障害性を調べ、その結果を基に細胞生存率に変化を与えない濃度を決定した。48 時間処理で生存率に影響を与えない濃度として、3 化合物とも NG108-15 に対しては $2 \mu\text{M}$ 、MCF7、HepG2、C2C12、SK-N-SH に対しては $5 \mu\text{M}$ を用いた。

MDR1 遺伝子の近位プロモーターの下流に EGFP 遺伝子をつないだレポーター遺伝子 (Fig. 3A) を導入したそれぞれの腫瘍細胞を 3 種の indirubin 誘導体で処理し、蛍光強度を指標にしてプロモーター活性への影響を調べた (Fig. 3B-D)。No. 2 は MCF7 と HepG2 において MDR1 プロモーター活性を抑制したが (Fig. 3B)、それ以外の細胞では効果を示さなかった。興味深いことに、No. 6 は MCF7 にのみ有効で (Fig. 3C)、No. 12 は用いた腫瘍細胞全てで MDR1 プロモーター活性の抑制が観察された。(Fig. 3D)。これらの結果は、それぞれの indirubin 誘導体は、腫瘍細胞のタイプに選択性をもって MDR1 遺伝子プロモーターを阻害することを示唆している。



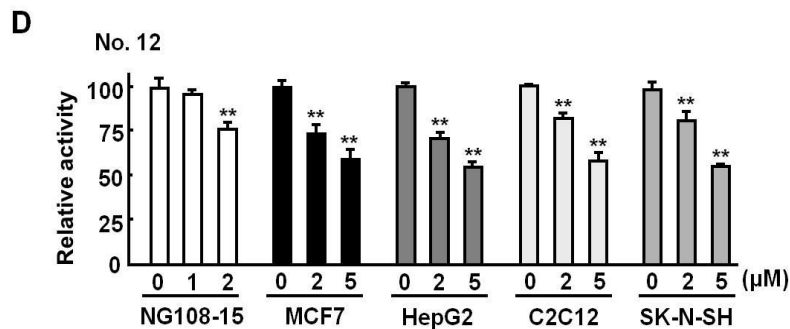


Fig. 3 indirubin 誘導体 (No. 2、No. 6、No. 12) が種々の腫瘍細胞中で MDR1 遺伝子プロモーター活性に及ぼす影響。

(A) MDR1 遺伝子の近位プロモーター下流に EGFP 遺伝子をつないだレポーター遺伝子。

(B-D) レポーター遺伝子から発現した EGFP の蛍光強度の定量的解析。蛍光強度は co-transfect した β -galactosidase 遺伝子由来の酵素活性の値で normalize し、独立した 3 回の実験の平均値と標準誤差を示した。** $P < 0.01$ (Student's t-test)

(3) 3 種の indirubin 誘導体は、NF-Y 発現に影響せずに内在性の MDR1 遺伝子の転写を抑制する。

No. 2、No. 6、No. 12 が MDR1 遺伝子プロモーター活性を抑制する腫瘍細胞内で、内在性の MDR1 遺伝子の転写に対しても阻害効果を示すことを確かめるために、indirubin 誘導体で処理したそれぞれの細胞における MDR1 mRNA の発現量を RT-PCR で比較した。また、そのときの NF-Y の発現量について 3 つのサブユニットの各々に特異的な抗体を用いて Western blot で解析した (Fig. 4)。それぞれの誘導体は、特異性を示す細胞において内在性 MDR1 遺伝子の転写に対して抑制的に働くことが示された。また、このとき NF-Y の各サブユニットには発現量に大きな変化は見られなかった。したがって、これらの indirubin 誘導体は、転写因子である NF-Y の発現には影響せず、NF-Y と相互作用してその DNA 結合性を変化させることによって、内在性の MDR1 遺伝子プロモーターの活性を阻害すると考えられる。

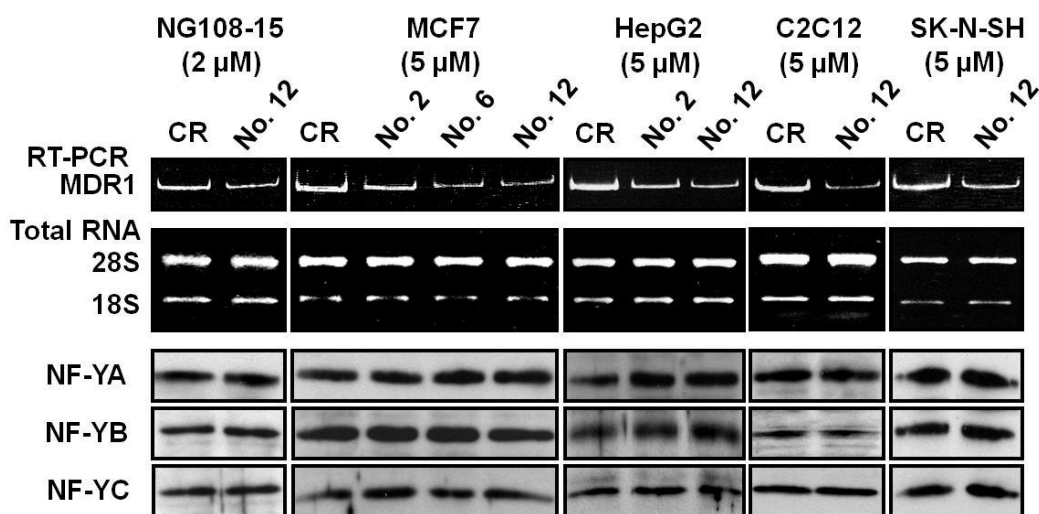


Fig. 4 内在性 MDR1 遺伝子の転写と NF-Y サブユニットの発現における indirubin 誘導体の影響。それぞれの化合物が逆向き CCAAT を含むプロモーター活性を抑制した細胞 (Fig. 4 参照) について解析した。細胞を各濃度の indirubin 誘導体で処理した後、MDR1 mRNA と NF-Y サブユニットの量を調べた。RT-PCR に用いた RNA サンプルには差がないことも示した。

(4) MCF7 細胞のドキソルビシン感受性に対する indirubin 誘導体の効果

MDR1 の発現量が減少すれば、抗がん剤に対する感受性が高くなることが期待される。そこで、3 種の誘導体の全てが MDR1 遺伝子の転写抑制活性を示した MCF7 細胞を用いて、インディルビンとドキソルビシンの併用効果を調べてみた。まず、MCF7 細胞に対するドキソルビシンの細胞障害性を測定した (Fig. 5A)。この細胞は $10 \mu\text{M}$ のドキソルビシンに対して約 50% の生存率を示し、 $1 \mu\text{M}$ 以下ではほとんど影響を受けないことがわかった。この結果から、細胞障害性をもたない濃度としてさらに低い $0.5 \mu\text{M}$ のドキソルビシンを用いることにした。MCF7 細胞を生存率に影響のない $2 \mu\text{M}$ と $5 \mu\text{M}$ の濃度の各 indirubin 誘導体で一晩処理した後、ドキソルビシンを加えて併用効果を MTT アッセイで調べた (Fig. 6B)。対象として、Fig. 1 のゲルシフトアッセイで NF-Y の DNA 結合性に大きな変化が見られなかった No. 1 (Indirubin) と No. 15 (6-Bromoindirubin) を用いた。効果のない低濃度のドキソルビシンでも No. 2、6、12 の存在下では、濃度依存的に細胞障害性が観察された。これらの結果から、indirubin 誘導体による MDR1 遺伝子の発現抑

制が起きている状態では低濃度のドキソルビシンでも活性を示すことがわかった。

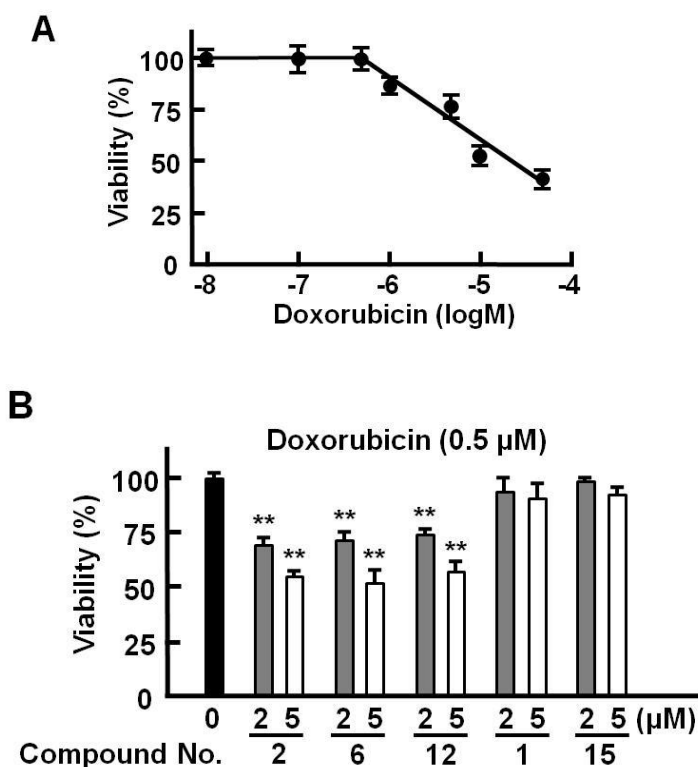


Fig. 5 indirubin 誘導体 (No. 2、No. 6、No. 12) の存在下における MCF7 細胞のドキソルビシン感受性の増加。

(A) MCF7 細胞に対する non-toxic なドキソルビシン濃度を MTT アッセイで調べた。

(B) MCF7 細胞を表記の濃度の indirubin 誘導体で前処理した後、0.5 μM のドキソルビシンを加え、MTT アッセイにより細胞生存率を調べた。

本研究で示した 3 種の indirubin 誘導体は Sp1 活性には影響せず、NF-Y のサブユニットの発現量にも変化を及ぼさないことから、これらの化合物は NF-Y 分子を介して MDR1 プロモーターの阻害を行うと考えられる。ただし、No. 6 は NF-Y の DNA 結合性を減少させることで阻害活性を示したと考えられるが、No. 2 と No. 12 は結合を増大させた。これは、NF-Y の DNA 結合部位を活性化するような立体構造の変化が、RNA polymerase II を含む他の転写関連因子との相互作用部位の構造へも影響を与えたことを示唆している。詳細な分子メカニズムの解明には 3 量体である NF-Y の立体構造を明らかにしたうえで、

NF-Y と indirubin 誘導体との相互作用を調べることが必要である。また、化合物間で、MDR1 プロモーターの阻害に腫瘍細胞特異性が見られたことは興味深い。それぞれの誘導体の化学構造により、細胞膜の透過性や核内への移行性が細胞毎に異なっていることが考えられる。このような特性を持つことを利用して、今後、さらに異なる種類の腫瘍細胞について様々な抗がん剤との併用効果を検討し、がんの種類に応じて効果的な抗がん剤と indirubin 誘導体の組み合わせを知ることができれば、多剤耐性を抑制しつつ抗がん剤を用いるという治療への応用につながる可能性がある。

【謝辞】本研究の一部は、平成 25 年度日本大学薬学部共同研究助成金により行われた。

参考文献

1. Sundseth, R., MacDonald, G., Ting, J., King, A.C., 1997. DNA elements recognizing NF-Y and Sp1 regulate the human multidrug-resistance gene promoter. *Mol. Pharmacol.* 51, 963-971.
2. Jin, S., Scotto, K.W., 1998. Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4377-4384.
3. Hu, Z., Jin, S., Scotto, K.W., 2000. Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1. *J. Biol. Chem.* 275, 2979-2985.
4. Okamura, H., Yoshida, K., Sasaki, E., Morimoto, H., Haneji, T., 2004. Transcription factor NF-Y regulates *mdr1* expression through binding to inverted CCAAT sequence in drug-resistant human squamous carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 25, 1031-1037.
5. Huo, H., Magro, P.G., Pietsch, E.C., Patel, B.B., Scotto, K.W., 2010. Histone methyltransferase MLL1 regulates MDR1 transcription and chemoresistance. *Cancer Res.* 70, 8726-8735.
6. Cornwell, M.M., Smith, D.E., 1993. SP1 activates the MDR1 promoter through one of two distinct G-rich regions that modulate promoter activity. *J. Biol. Chem.* 268, 19505-19511.
7. Higuchi, T., Anzai, K., Kobayashi, S., 2008. U7 snRNA acts as a transcriptional

- regulator interacting with an inverted CCAAT sequence-binding transcription factor NF-Y. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 274-281.
8. Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J.A., Nobel, M.E., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G., Meijer, L., 1999. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.* 1, 60-67.
 9. Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J.A., Snyder, G.L., Greengard, P., Biernat, J., Wu, Y.Z., Mandelkow, E.M., Eisenbrand, G., Meijer, L., 2001. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J. Biol. Chem.* 276, 251-260.
 10. Eisenbrand, G., Hippe, F., Jakobs, S., Muehlbeyer, S., 2004. Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytomedicine. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130, 627-635.
 11. Choi, S.J., Lee, J.E., Jeong, S.Y., Im, I., Lee, S.D., Lee, E.J., Lee, S.K., Kwon, S.M., Ahn, S.G., Yoon, J.H., Han, S.Y., Kim, J.I., Kim, Y. C., 2010. 5,5'-substituted indirubin-3'-oxime derivatives as potent cyclin-dependent kinase inhibitors with anticancer activity. *J. Med. Chem.* 53, 3696-3706.
 12. Ding, Y., Qiao, A., Fan, G.H., 2010. Indirubin-3'-monoxime rescues spatial memory deficits and attenuates beta-amyloid-associated neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 39, 156-168.
 13. Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J.A., Snyder, G.L., Greengard, P., Biernat, J., Wu, Y.Z., Mandelkow, E.M., Eisenbrand, G., Meijer, L., 2001. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J. Biol. Chem.* 276, 251-260.
 14. Schnitzer, S.E., Schmid, T., Zhou, J., Eisenbrand, G., Brüne, B., 2007. Inhibition

- of GSK3beta by indirubins restores HIF-1alpha accumulation under prolonged periods of hypoxia/anoxia. *FEBS Lett.* 579, 529-533.
15. Wang, W., Yang, Y., Ying, C., Li, W., Ruan, H., Zhu, X., You, Y., Han, Y., Chen, R., Wang, Y., Li, M., 2007. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta protects dopaminergic neurons from MPTP toxicity. *Neuropharmacology* 52, 1678-1684.
 16. Peter Guengerich, F., Martin, M.V., McCormick, W.A., Nguyen, L.P., Glover, E., Bradfield, C.A., 2004. Aryl hydrocarbon receptor response to indigoids in vitro and in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 423, 309-316.
 17. Sugihara, K., Kitamura, S., Yamada, T., Okayama, T., Ohta, S., K. Yamashita, K., Yasuda, M., Fujii-Kuriyama, Y., Saeki, K., Matsui, S., Matsuda, T., 2004. Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of microsomal drug-metabolizing enzyme activity by indirubin and indigo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 571-578.
 18. Procházková, J., Kozubík, A., Machala, M., Vondráček, J., 2011. Differential effects of indirubin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the aryl hydrocarbon receptor (AhR) signalling in liver progenitor cells. *Toxicology* 279, 146-154.