

Indirubin の生物学的親和性を利用した新規抗腫瘍剤開発の経緯と展望
Epoxy/Ind の細胞傷害活性と生物学的安定性

市丸 嘉, 宮入 伸一*

日本大学薬学部大学院薬学研究科

274-8555 千葉県船橋市習志野台 7-7-1

miyairi.shinichi@nihon-u.ac.jp

Abstract

Imatinib や gefitinib のような Tyr kinase 阻害剤が開発されて以来、分子標的型抗腫瘍剤の開発はますます盛んになっている。Indirubin は従来標的とされてきた Tyr kinase よりも細胞周期回転を直接的に制御している Ser/Thr kinase である CDKs (cyclin-dependent kinases) や GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β) に親和性をもつ化合物であり、抗腫瘍剤開発の seed 化合物となることが期待されている。本稿では、著者らが開発した新規ハイブリッド型 indirubin 誘導体 Epoxy/Ind を中心に、抗腫瘍剤としての indirubin 誘導体について概説する。

Keyword

anti-cancer, bromoindirubin, kinase inhibitor, GSK-3 β , CDK

Introduction

近年、ライフスタイルの変遷とともに増加の一途をたどっている悪性新生物による疾患は、数十年にわたって日本人の主要な死因の一つであり続けている。腫瘍細胞の異常な増殖能は、関連タンパク質の機能亢進によって支えられており、この機能は多くの場合リン酸化酵素 (kinase) によって制御されている。そのため、特に腫瘍細胞内で盛んに機能する kinases を標的とした inhibitor は抗腫瘍剤としての作用が期待され、実際に imatinib や gefitinib に代表される低分子量分子標的薬が臨床上大きな成果を上げている (Zhang et al, 2009)。Kinase は ATP を補酵素として標的タンパク質をリン酸化するため、構造中に ATP-binding site が存在する。中医学において慢性骨髄性白血病に処方されてきた青黛の活性成分として見出された indirubin (**1**) は、kinase の ATP-binding site に親和性をもつ化合物で、多くの低分子量分子標的薬と同様に含窒素芳香環構造をもつ化合物である (Figure 1)。Indirubin は、細胞周期を制御する glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) や cyclin-dependent kinases (CDKs) に対して強い親和性を有し、ATP-binding site への結合を介したタンパク機能の阻害によって抗腫瘍活性を発揮していると考えられている。更に indirubin の生物活性は、置換基の導入や部分構造の変換によって大きく影響を受ける、すなわち kinase に対する特異性や腫瘍細胞選択性が変化する。本稿では、著者らが開発した新規ハイブリッド型 indirubin 誘導体を中心に、抗腫瘍剤の seed 化合物としての indirubin 誘導体について概説する。

Indirubin 3'-oxime derivatives

1. 6-Bromoindirubin 3'-oxime (6-Br-Indox)

天然物由来成分として単離された indirubin は、培養細胞を用いた検討において細胞傷害活性を示す濃度は非常に高く、そのため、これまでに indirubin の生物活性について検討してきた研究のほぼすべてが、3'位 carbonyl 基を oxime 基に変換した indirubin 3'-oxime (Indox) (**2**) を母化合物とする indirubin 誘導体に関するものである。Indox は更に、indole 骨格の水素を halogen 原子や methoxy 基などに置換すると細胞傷害活性や kinase 選択性が劇的に変換することが知られている。特に、1 つないしは 2 つの Br 原子が indole 骨格に置換した indirubin 誘導体については、構造活性相関がよく検討されている。6-Bromoindirubin 3'-oxime (6-Br-Indox) (**3**) は、indirubin 誘導体の中でも特に GSK-3 β 選択性が高いことが知られている (Meijer et al, 2003)。Meijer らは、Indox の GSK-3 β 阻害における IC₅₀ 値が 22 nM、CDK1/cyclin B 阻害における IC₅₀ 値が 180 nM であるのに対して、6-Br-Indox の GSK-3 β 阻害における IC₅₀ 値が 5 nM、CDK1/cyclin B 阻害における IC₅₀ 値が 320 nM であり、Indox の 6 位に Br を導入する事で GSK-3 β 選択性が向上するとしている。更に Meijer らは後年、6-Br-Indox の oxime 部位に様々な側鎖を導入する事で、GSK-3 β に対する選択性を維持しつ

つ、細胞傷害活性を向上させる可能性について報告している (Vougianniopoulou et al, 2008)。著者らは、GSK-3 β のみを阻害することが抗腫瘍作用の増強に寄与するかについては、議論の余地があると考えているが (Ichimaru et al, 2016)、6-Br-Indox は GSK-3 β の選択的阻害剤として生化学分野で広く用いられている試薬である。

2. 7-Bromoindirubin 3'-oxime (7-Br-Indox)

Indox や Indox 誘導体の細胞傷害活性は、多くの場合 apoptosis 誘導に由来することが示されている (Kameswaran and Ramanibai, 2009)。著者らも 5'-methoxyindirubin (5'-CH₃O-Ind) (4) がヒト正常細胞 (normal human dermal fibroblast, NHDF) の生育に影響を与えない濃度で神経芽腫細胞の生育を阻害することを見出し、細胞死は apoptosis の誘発によるものだと結論付けた (Saito et al, 2011)。一方で、7-bromoindirubin 3'-oxime (7-Br-Indox) (5) は、Indox や 6-Br-Indox と比較して kinase 阻害活性が極端に低いことが知られている (Ribas et al, 2006)。しかし、7-Br-Indox は例えば神経芽腫細胞 SH-SY5Y に対して Indox や 6-Br-Indox よりも強力な細胞増殖抑制効果を示し、加えてその機序は caspase 非依存的経路によるものであることが明らかにされている (Ribas et al, 2006)。また、6-Br-Indox と同様に oxime 部位に様々な側鎖を導入する事で、7-Br-Indox の細胞傷害活性が増強されることが示されており (Ferandin et al, 2006)、有望な抗腫瘍剤であると考えられている。

Indirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime derivatives

1. Epox/Ind の設計と細胞傷害活性

著者らは Indox の oxime 部位を足場として、タンパク質や核酸などの生理活性分子と強力に反応する原子団を導入したハイブリッド型 indirubin 誘導体の開発を企て、indirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (Epox/Ind) (6) を合成した (Ichimaru et al. 2015)。Br 原子や CH₃O 基の導入は indirubin の kinase 親和性に影響を及ぼすことは間違いないが、特定の標的分子があるわけではない。Epox/Ind は、腫瘍細胞内で盛んに機能する protein kinases に対して親和性を有する indirubin 部分と、強力なアルキル化活性を有する oxirane 基を結合させた indirubin 誘導体で、非特異的な oxirane 基の反応性を indirubin 結合性 protein kinases に特化させたものである。実際に Epox/Ind の細胞傷害活性を HepG2 細胞 (hepatoma) を用いた alamarBlue[®] assay によって 50%生育阻害濃度 (IC₅₀ 値) を評価したところ、母化合物とした indox の IC₅₀ 値は 15 μ M であったのに対して、Epox/Ind のそれは 1.7 μ M であった。強力な抗腫瘍効果を示す *cis*-platin の IC₅₀ 値が 4.0 μ M であることから、Epox/Ind は *cis*-platin と同等以上の強力な抗腫瘍活性を有していることがわかっている。また、indirubin の前駆体である isatin に対して、oxirane 基を導入した Epox/Isatin (7) は 10 μ M でも HepG2 細胞の増殖を阻害しなかった。また、Epox/Ind は IMR-32 細胞 (neuroblastoma) および SK-N-SH 細胞

(neuroblastoma) に対しても IC₅₀ 値が 0.16 μM および 0.07 μM と非常に低値である。Neuroblastoma に対する細胞死誘発は caspase 非依存的な apoptosis の誘導であることが明らかになっている (Kurita et al. 2016)。以上のことから Epox/Ind は、indirubin 分子の構造に基づく腫瘍細胞指向性と、oxirane の導入による細胞傷害活性の向上を達成した新規 indirubin 誘導体であると言える。

2. Epox/Ind の生物学的性質

著者らが indirubin に導入する原子団として oxirane 基を選択した理由の一つに、アルキル化反応の標的として ATP-binding site 周辺に存在する Cys 残基の利用がある。とりわけ GSK-3β における Cys199 は、酵素活性発現において最も重要なアミノ酸残基とされている (Domínguez et al. 2012)。実際、生体内に近い液性条件下 (pH ~8) で、*N*-acetylcysteine (*N*-Ac-Cys) (**8**) と Epox/Ind を反応させたところ、*N*-Ac-Cys の SH 基と Epox/Ind の oxirane 部分が反応し、共有結合形成体 (**9**) が生成することが確認された (未発表 data)。このことから Epox/Ind は GSK-3β の Cys199 や、CDK5 の Cys83 のような ATP-binding site 近傍の Cys 残基と共有結合を形成して強力に kinase 機能を阻害しているのではないかと想定している。

一方で、Epox/Ind の高い細胞傷害活性を担う oxirane は、高度にひずんだ環状構造のため化学的にも安定性が低く、Epox/Ind の抗腫瘍活性が代謝物あるいは分解物に基づく可能性も考慮する必要がある。そこで、著者らは代謝酵素に富む HepG2 細胞の高濃度細胞溶解液 (cell lysate) 中で incubate したときの Epox/Ind の生物学的安定性を検討した。反応液の有機溶媒抽出画分を HPLC に付したところ、Epox/Ind の peak が一部消失して、新たな peak が出現することを見出した。更に UPLC/MS を用いて、新たに現れた peak は indirubin 3'-(2,3-dihydroxypropyl)oxime (E804) (**10**) であることを確認した (Ichimaru et al, 2015)。E804 は Epox/Ind の oxirane 部分が加水分解を受けて diol 構造に変化した構造の化合物で、Nam らによって apoptosis の誘導による抗腫瘍活性が報告されている (Nam et al, 2005)。そこで Epox/Ind と E804 の細胞傷害活性を alamarBlue[®] assay によって比較したところ、E804 の HepG2 細胞に対する IC₅₀ 値は 2.1 μM であり、Epox/Ind (1.7 μM) として添加した方が、IC₅₀ 値が低くなることが示された。また両者の細胞傷害活性の差は、HepG2 細胞への曝露時間を通常 24 時間から 72 時間に延長すると更に顕在化し、Epox/Ind は E804 よりも作用の持続時間に優れていることが示されている。残存する Epox/Ind は、次第に E804 に変換されて細胞毒性が減弱化することから、Epox/Ind は低蓄積毒性の抗腫瘍剤である可能性がある。

3. Epox/5-Br-Ind

Epox/Ind (**6**) に関して得られた知見は、Indox (**2**) の細胞傷害活性を向上させるために oxirane の導入が有効であることを示したものである。著者らは Indox よりも細胞傷害活性の優れているとされる bromoidnriubin 誘導体に対して oxirane 基を導入する事による抗腫瘍

活性の増強を検討した。そこで、indirubin 骨格の 5, 6, 7, 5', 6'-位に Br を 1 つないしは 2 つ置換した Br-Indox および Epox/Br-Ind を調製し、HepG2 細胞に対する細胞傷害活性を比較検討した (Table 1)。結果、5 位を Br に置換した Epox/5-Br-Ind (11) の IC₅₀ 値が 0.62 μM と最も低い値を示した。Epox/5-Br-Ind は HepG2 細胞に対して Epox/Ind と同様に持続的な細胞傷害活性を示し、加えて Epox/Ind と同程度の持続的な細胞傷害活性を示すのに要する曝露濃度は 3 分の 1 であった。

更に HepG2 cell lysate を用いて Epox/5-Br-Ind の安定性を検討したところ、Epox/Ind と同様に oxirane 基が加水分解した誘導体由来する peak の出現が認められた。Epox/Ind を同様の条件で incubate すると peak 面積の約 80% が消失したが、Epox/5-Br-Ind では peak 減少は約 60% にとどまった (Figure 2)。なお、Epox/5-Br-Ind においても HepG2 cell lysate への曝露によって生じる分解物は、oxirane 部位の加水分解体である 5-bromoindirubin 3'-(O-2,3-dihydroxypropyl)oxime (12) のみであった。加えて、Epox/5-Br-Ind は oxirane の加水分解を触媒する epoxide hydrolase (EH) を阻害することも見出されている (Figure 3)。EH の阻害は Epox/Ind には認められず、Epox/5-Br-Ind は EH の阻害によって oxirane 部分の加水分解による細胞傷害活性の低下が起きにくく、結果的に Epox/Ind よりも強い細胞傷害活性を示していると考えられる。著者らは EH の阻害は Epox/5-Br-Ind によるもので、加水分解産物の compound 12 が寄与しないことまで明らかにしている (Ichimaru et al, Submitted)。

Summary

本稿では、新規抗腫瘍剤の seed 化合物としての indirubin 誘導体について、特に著者らが開発したハイブリッド型 indirubin 誘導体 Epox/Ind とその誘導体を中心に概説した。Indirubin のように細胞周期関連 kinase の ATP-binding site への親和性を利用した阻害剤は数多く存在するが、Epox/Ind のようにタンパク質中の特定構造を標的とした阻害剤はほとんどない。これまでに、α-enone 構造をもつ側鎖を Michael 付加受容体とした Cys の SH 基に親和性をもつ阻害剤も開発されているが (Solca et al, 2012)、Epox/Ind は細胞中で oxirane 基が加水分解されることで蓄積毒性の少ない阻害剤である。また本稿で紹介したように Epox/Ind の indirubin 骨格に置換基を導入する事で oxirane 基の加水分解率は制御が可能であることが示唆されている。以上のことから著者らは indirubin 誘導体が新規抗腫瘍剤の優れた seed 化合物であると考えている。一方で、indirubin は極めて平面性の高い構造であることから、水溶性が極端に低いという難点がある。将来的に、更なる細胞傷害活性の向上と水溶性の改善が達成されることを期待する。

Reference

- Domínguez, J. M., Fuertes, A., Orozco, L., del Monte-Millán, M., Delgado, E., Medina, M. (2012): Evidence for irreversible inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by tideglusib. *J. Biol. Chem.*, 287, 893-904.
- Ferandin, Y., Bettayeb, K., Kritsanida, M., Lozach, O., Polychronopoulos, P., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Meijer, L. (2006): 3'-Substituted 7-halogenoindirubins, a new class of cell death inducing agents. *J. Med. Chem.*, 49, 4638-49.
- Ichimaru, Y., Saito, H., Uchiyama, T., Metori, K., Tabata, K., Suzuki, T., Miyairi, S. (2015): Indirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime: A novel anticancer agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25, 1403-1406.
- Ichimaru, Y., Saito, H., Miyairi, S. (2016): Is an inhibitor or blocker of inactivation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) a reliable agent for cancer chemotherapy? *Int. J. Clin. Pharmacol. Pharmacother.*, 1, IJCPP-102.
- Kameswaran, T. R., Ramanibai, R. (2009): Indirubin-3-monooxime induced cell cycle arrest and apoptosis in Hep-2 human laryngeal carcinoma cells. *Biomed Pharmacother.*, 63, 146-154.
- Kurita, M., Hanada, S., Ichimaru, Y., Saito, H., Tabata, K., Asami, S., Miyairi, S., Suzuki, T. (2016): Indirubin 3'-epoxide induces caspase-independent cell death in human neuroblastoma. *Biol. Pharm. Bull.*, 39, 993-999.
- Meijer, L., Skaltsounis, A. L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X. P., Vonica, C. A., Brivanlou, A., Dajani, R., Crovace, C., Tarricone, C., Musacchio, A., Roe, S. M., Pearl, L., Greengard, P. (2003): GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem. Biol.*, 10, 1255-1266.
- Nam, S., Buettner, R., Turkson, J., Kim, D., Cheng, J. Q., Muehlbeyer, S., Hippe, F., Vatter, S., Merz, K. H., Eisenbrand, G., Jove, R. (2005): Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 5998-6003.
- Ribas, J., Bettayeb, K., Ferandin, Y., Knockaert, M., Garrofé-Ochoa, X., Totzke, F., Schächtele, C., Mester, J., Polychronopoulos, P., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Boix, J., Meijer, L. (2006): 7-Bromoindirubin-3'-oxime induces caspase-independent cell death. *Oncogene*, 25, 6304-6318.
- Saito, H., Tabata, K., Hanada, S., Kanda, Y., Suzuki, T., Miyairi, S. (2011): Synthesis of methoxyl- and bromo-substituted indirubins and their activities on apoptosis induction in human neuroblastoma cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 5370-5373.
- Solca, F., Dahl, G., Zoephel, A., Bader, G., Sanderson, M., Klein, C., Kraemer, O., Himmelsbach, F., Haaksma, E., Adolf, G. R. (2012): Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 343, 342-350.

- Tanaka, T., Ohashi, S., Saito, H., Higuch, T., Tabata, K., Kosuge, Y., Suzuki, T., Miyairi, S., Kobayashi, S. (2014): Indirubin derivatives alter DNA binding activity of the transcription factor NF-Y and inhibit MDR1 gene promoter. *Eur. J. Pharmacol.*, 741, 83-89.
- Vougogiannopoulou, K., Ferandin, Y., Bettayeb, K., Myriantopoulos, V., Lozach, O., Fan, Y., Johnson, C. H., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Mikros, E., Meijer, L. (2008): Soluble 3',6-substituted indirubins with enhanced selectivity toward glycogen synthase kinase-3 alter circadian period. *J. Med. Chem.*, 51, 6421-6431.
- Zhang, J., Yang, P.L., Gray, N.S. (2009): Targeting cancer with small molecule kinase inhibitor. *Nat. Rev. Cancer.*, 9, 29-39.

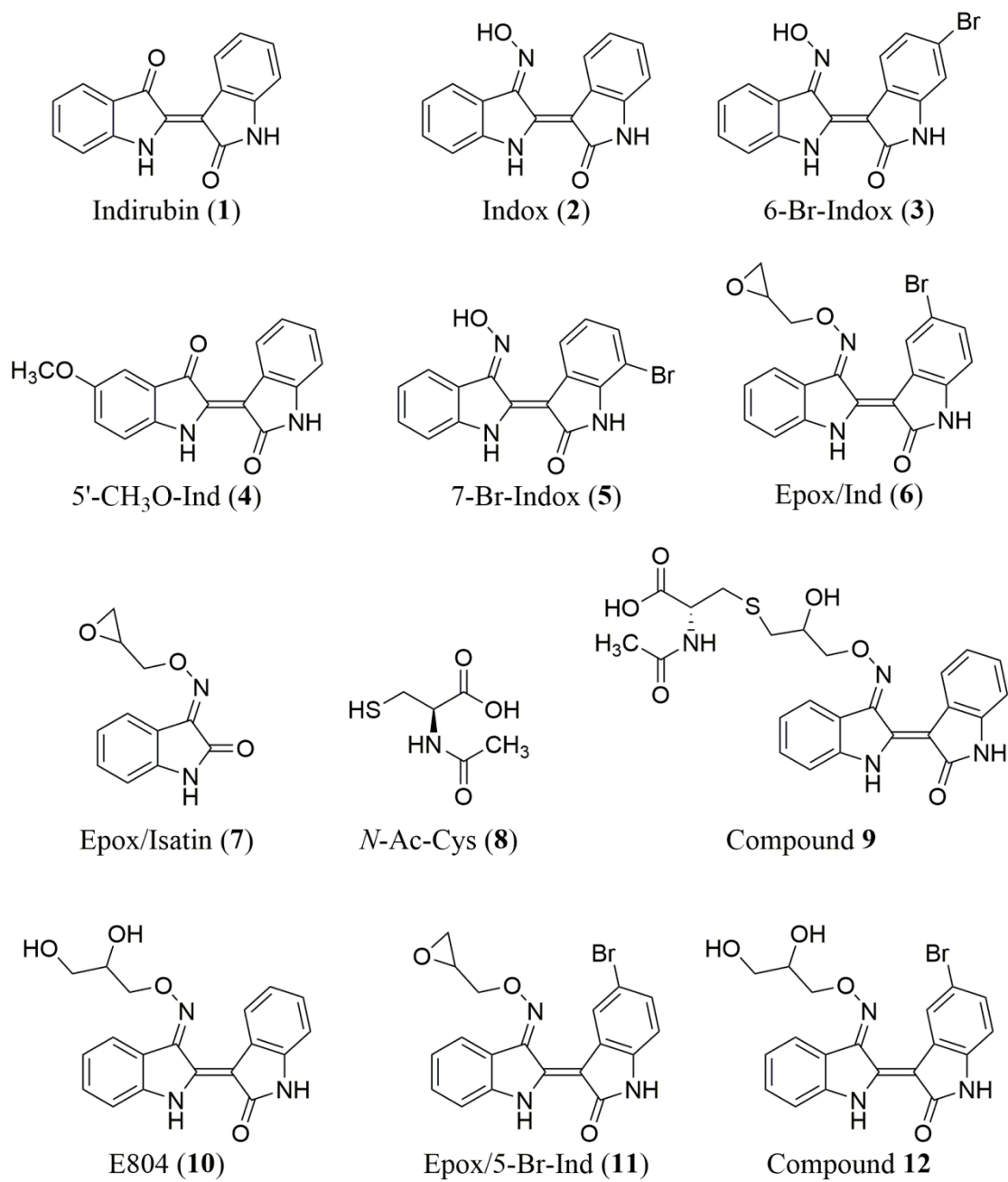


Figure 1

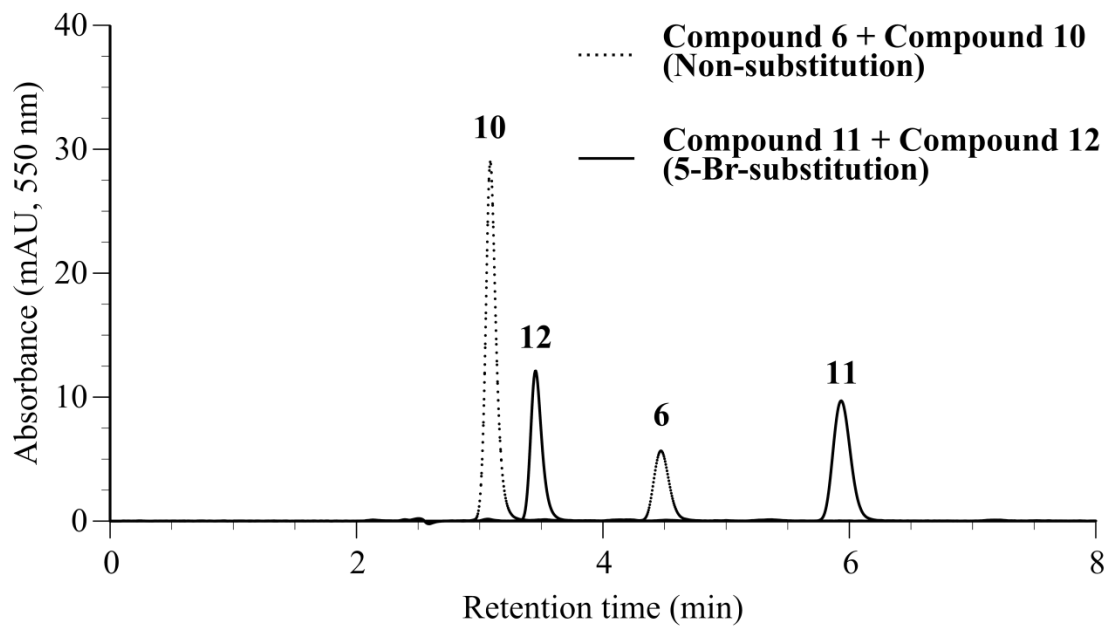


Figure 2

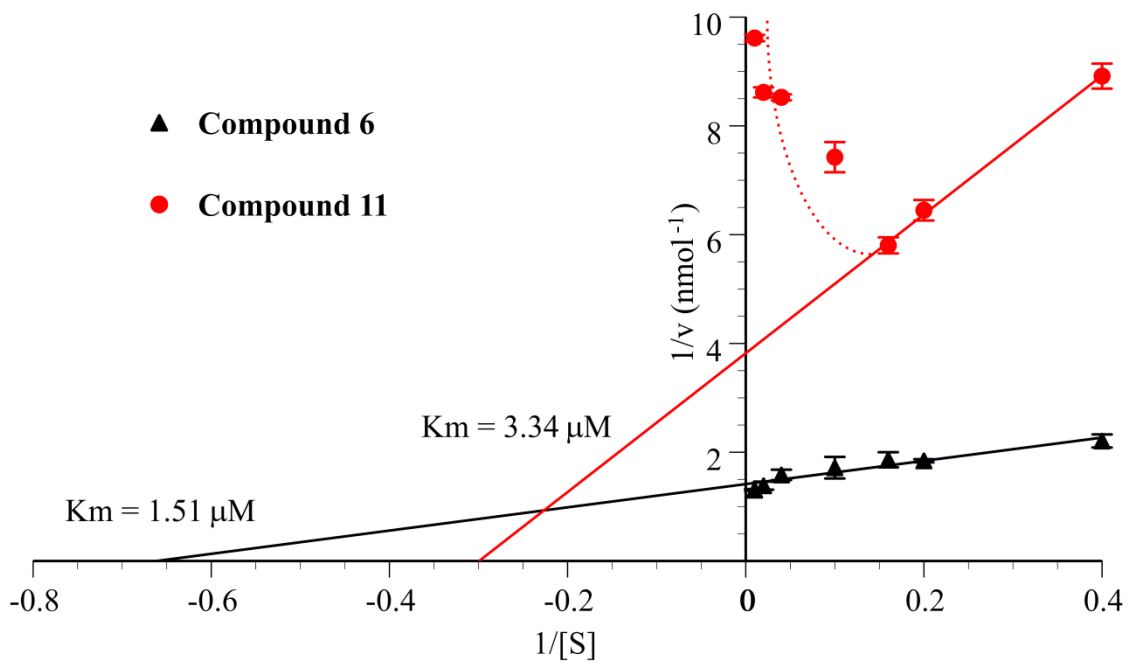
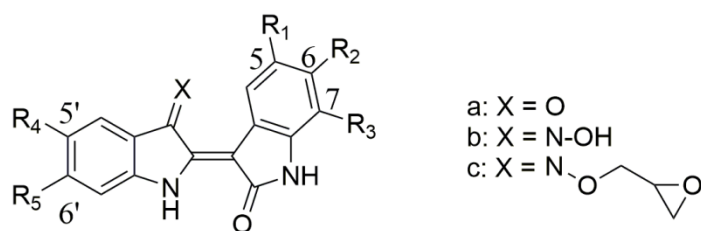


Figure 3

Table 1



	Substitution					IC ₅₀ values (μM)		
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X = a	X = b	X = c
No-Substituted	H	H	H	H	H	>100	15	1.7
5-Br	Br	H	H	H	H	>100	6.9	0.62
6-Br	H	Br	H	H	H	>100	5.3	>100
7-Br	H	H	Br	H	H	>100	4.8	37
5'-Br	H	H	H	Br	H	>100	11	3.3
6'-Br	H	H	H	H	Br	>100	14	4.5
5,6-Br ₂	Br	Br	H	H	H	>100	4.4	1.9
5,7-Br ₂	Br	H	Br	H	H	no data	6.6	8.8
5,5'-Br ₂	Br	H	H	Br	H	>100	7.0	2.5
5,6'-Br ₂	Br	H	H	H	Br	>100	>100	>100
5',6-Br ₂	H	Br	H	Br	H	>100	3.7	>100
5',7-Br ₂	H	H	Br	Br	H	>100	4.9	10
6,6'-Br ₂	H	Br	H	H	Br	>100	16	>100
6',7-Br ₂	H	H	Br	H	H	>100	17	>100

Figure Legends

Figure 1. Chemical structures.

Figure 2. Profiles of Epox/5-Br-Ind (**11**) and Epox/Ind (**6**) metabolism in HepG2 cell lysates.

Compound **11** (solid line) or **6** (dotted line) (10 nmol) was incubated at 37 °C for 30 min with the cell lysate of HepG2 cells and then treated with a mixture of EtOAc and MeOH (10:1, [v/v]). An aliquot of the organic extract was subjected to HPLC analysis after replacing the solvent with CH₃CN. The separation column was a Capcell Pak C18 MG III (250 mm × 4.6 mm, i.d.; Shiseido, Tokyo, Japan). Mobile phase, CH₃CN:H₂O (containing 0.1% TFA [v/v]) = 8:2 (v/v); flow rate, 1.0 mL/min; column oven, 40 °C; detection wavelength, 550 nm. Molecular weights of the compounds in the peaks were determined by UPLC/MS.

Figure 3. Determination of apparent Michaelis constants of Epox/Ind (**6**) and Epox/5-Br-Ind (**11**) with respect to epoxide hydrolase in HepG2 cell lysates, determined by Lineweaver-Burk analysis.

The Epox/Ind derivatives (2.5-100 μM) were incubated at 37 °C for 5 min in the cell lysate of HepG2 cells, and the amount of hydrolyzed product (**10** and **12**) was determined by HPLC. The results of experiments with **6** and **11** are indicated by the symbols ▲ and ●, respectively. Each point shows the mean ± SEM (n = 3).

Table 1. Antiproliferative activity of brominated indirubin derivatives.