

七員環イミダゾロン化合物による肝がん細胞および肝細胞の DNA 合成阻害

福田 富 弥

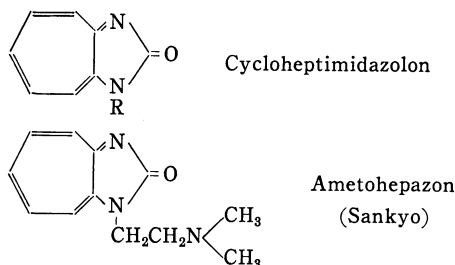
千葉大学医学部口腔外科教室

(昭和 45 年 7 月 4 日受付)

I. はじめに

Cycloheptimidazole はベンツイミダゾールのベンゼン核の代りに七員環が入った化合物である。東北大の野副の合成の成功以来、化学的性質については多くの報告があるが、生物に対する影響などについての研究は比較的少ない。最近この化合物の誘導体である 1-(2-Dimethylaminoethyl) cycloheptimidazole-2(IH)-one, (アメトヘパゾン・三共) は口腔がんの治療に放射線療法と併用して卓効を示したという報告¹⁾もあり、この化合物ならびにその誘導体のがん細胞の増殖におよぼす影響は注目されている。

図 1 サイクロヘプチイミダゾロン構造式



一般に細胞の増殖にあつてはその直前に DNA の合成がおこるもので、この DNA 合成を阻害すると、次に来るべき細胞分裂もまた阻害される。多くの DNA 合成阻害剤は細胞分裂の阻害をおこすため、がんの化学療法に利用されている。アクチノマイシン、マイトマイシンなどはこの例である。

しかしこの類の薬剤の中には DNA 合成の阻害をおこすより低い濃度で細胞分裂の阻害をおこすものも知られている。プレオマイシンなどはこの好例である。七員環化合物である Colchicine もまたこの類の薬剤で、微量では細胞分裂を抑制し、それより少し高い濃度で DNA 合成を阻害する^{2,3)}。七員環化合物の中には他にも細胞分裂の異常をひきおこす物質が知られている。たとえばアズレノイド誘導体のなかにはダイコクネズミの肝の RNA 代謝⁴⁾の促進やウ=卵の細胞分裂の促進⁵⁾をひきおこすものも報告されている。これらの化合物は濃度を増し、あるいは作用時間を延長すると抑制的に作用することもまた知られている。

アメトヘパゾンが放射線療法と併用して、制がん効果

を挙げたという報告¹⁾はこの化合物が核酸代謝に変化を与えたことを示唆するものであるから、あるいは DNA 合成の阻害ではなからうかと考えられる。

著者はかねてから制がん剤の作用機転に興味をもち、研究を続けて来ていたので、Cycloheptimidazole 誘導体の DNA 合成に対する効果を調べるために次のような実験を行なった。

II. 実験材料と方法

実験動物：呑竜系ダイコクネズミの雌で体重 120~150 g のものを使用した。がん細胞についての実験は腹水肝がん AH 130 を接種後 5 日ないし 7 日の腹水を数頭から採取してプールし、遠心沈でんによりがん細胞を腹水から分離、混在する赤血球は水を加えて溶血させて除き、がん細胞のみを集めた。再生肝を用いる実験は HIGGINS & ANDERSON⁶⁾の方法によつて肝葉の約 2/3 を切除した後、18 時間ないし 26 時間経過したものを用いて *in vivo* で実験に用いた。この場合の 1 群は 3 頭以上とした。またクロマチン DNA と核仁の DNA を分画して用いた時は 3~4 頭を 1 群として肝臓をプールして用いた。

試薬類：DNA 合成をみるための実験には ³H チミジン(比放射能 5.0 Ci/mM, 5 mCi を 5 ml に溶かしたもの)を第一化学から購入し、1 頭あたり 100 μ Ci を腹腔内に動物を犠牲に供する 1 時間前に注射した。*In vitro* でがん細胞の DNA 合成をみる実験の時は反応液 50 ml につき 500 μ Ci を入れた。

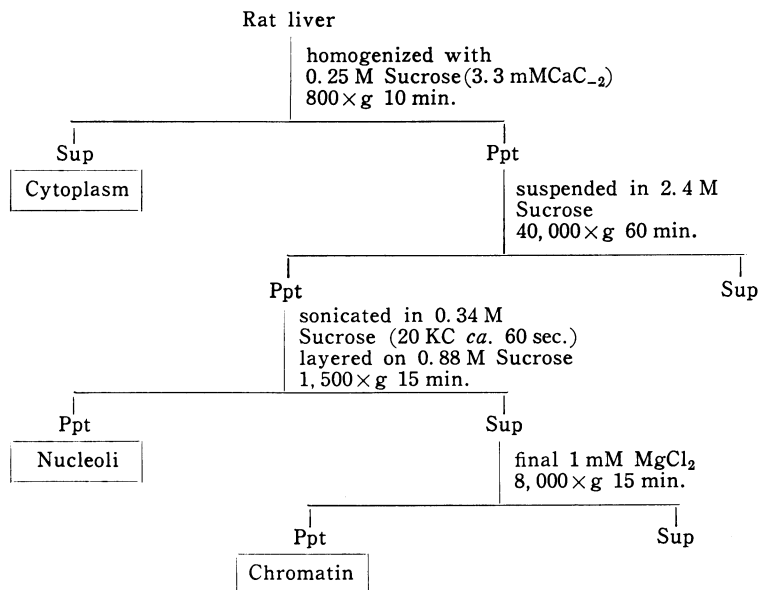
チミジンキナーゼの活性をみる実験には ¹⁴C チミジン(比放射能 50 mCi/mM)を第一化学から購入し、使用時比放射能 1 μ Ci/0.1 μ moles にうすめたものを用いた。

七員環化合物はすべて三共株式会社中央研究所から入手した。

クロマチンおよび核仁の分離法：大略、村松⁷⁾の方法に従った。すなわち再生肝ホモジェネートから遠心分離により粗核分画をとり、これをさらに遠心沈でんして核分画を得る。この分画を音波処理によつて核膜を破壊し、核小体を遠心沈でんにより集める。上清部分の Mg⁺⁺濃度を調整してクロマチンを沈でんさせた。図 2 にこの方法を表示した。

がん細胞による DNA 合成の反応液：がん細胞と同量

図 2 Fractionation of cells



の反応液を混じたが、反応液は原則として EAGLE 培地とコウシ血清を等量に混じたものである。時に 1/10 量の Tris-HCl 緩衝液 (pH 8) を混じ、あるいは EAGLE 培地とコウシ血清を混じたものに等量の腹水を加えた。いずれも反応開始直前に pH を 7.6 附近に調整した。

DNA の抽出と放射能測定: *In vitro* でのがん細胞の DNA 合成実験では SCHMIDT-THANNHAUSER⁹⁾ の方法で DNA を抽出し、その量はジフェニルアミン法⁹⁾ によつて定量した。放射能はシンチレーションカウンタで測定した。

グロマチンおよび核小体からは DNA を COLTER¹⁰⁾ の方法により抽出した。定量法および放射能の測定法はおなじである。

チミジンキナーゼの測定法: 肝臓あるいはがん細胞を 0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を用いて 2% ホモジネートとし、これを 8,000 × g, 30 分間遠心、その上清を酵素液とした。チミジンキナーゼの活性は大略 EKER¹¹⁾ の方法に従がい、次の反応液中で 37°C, 30 分間保温した。反応液の組成は 5 mM, ATP, 5 mM, MgCl₂, 酵素液 0.1 ml, ¹⁴C チミジン 5 μCi を 0.1 ml に溶かした液を加え、総量を 0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で 4.5 ml とした。

反応終了後 3~5 分間 100°C に熱して反応をとめ、遠心後上清 25 μml を DEAE セルローズ濾紙上に吸着させ、乾燥後 1 mM ギ酸アンモニウムで 10 分間、2 回、水で 5 分間、1 回洗浄後、95% エチルアルコールに約 5 分間浸した後、乾燥し、濾紙上に残つたチミジンの

リン酸化された化合物の放射能を濾紙ごとシンチレーター中に浸して、シンチレーションカウンタで測定した。

チミジンキナーゼの *Cl. perfringens factor*¹²⁾ (C. P. factor) は藤井¹²⁾ が嫌気性細菌のホスホリパーゼ中に発見した因子で、正常肝チミジンキナーゼを急激に活性化させる性質がある。今回用いた C. P. factor は藤井の精製したもので、安定性があり、正常肝チミジンキナーゼ活性測定の場合 90 μg/0.1 ml だけ加えて 10 分間 37°C で前処置をすると活性が上昇するものである。

III. 実験成績

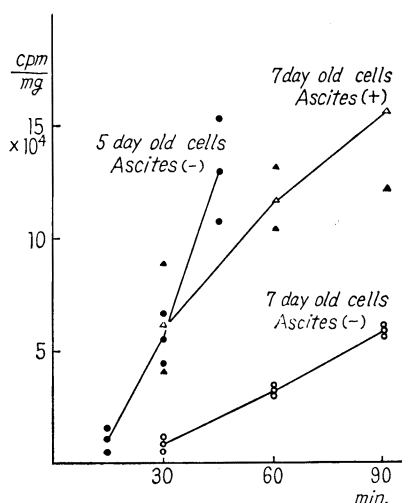
1. がん細胞の *in vitro* の DNA 合成

腹水肝がんを接種後 5 日目にネズミの腹腔内に ³H チミジンを注射し、1 時間後にはがん細胞をとり出して、その DNA 合成率をみる実験方法は予備実験の成績では個体差が大き過ぎて薬剤の効果をみるには適さないことが判明した。これは後述の腹水の影響かと思われる。また腹水中にはチミジンのプールがあるものかも知れない。

個体差を避けるために数頭の個体から採取したがん細胞を *in vitro* で保温し ³H チミジンの DNA へのとりこみを調べた成績を図 3 に示す。

すなわち AH 130 腹水肝がん接種後 7 日目のものを取り出し 2 群に分け、腹水を含む反応液と含まない反応液で保温したものを比較してみると、³H チミジンの DNA へのとりこみは腹水を加えた反応液のほうがずっと多い。しかし全く同一条件でおこなつた 2 個のサンプル間の価の開きは腹水を入れた場合に多く、時には 5,000 cpm/

図3. ³Hチミジンの肝がんDNAへのとりこみ
Incorporation of ³H-Thymidine into Hepatoma DNA



mg の差も生じる。これに対して腹水を入れない場合の2個のサンプルの開きはその 1/10 程度で信頼性が高い。

また接種後5日目のがん細胞を用いると腹水を入れないでも2個のサンプルの価の開きが多い。けれどもとりこみは接種後7日目のものよりはるかに大きい。

またいずれの場合も 90 分までは直線的にとりこみが増していることが確かめられたので、薬剤の効果をみる実験としては、なるべく接種後7日附近のがん細胞を用い、腹水を入れない反応液で60分間のとりこみを調べ、対照の価を 100% として薬剤をいれた場合の価を % であらわすのが適当であろうと考えられる。図4はこのような条件のもとでおこなった実験の成績である。

2. Cycloheptimidazolone 誘導体ががん細胞のDNA合成におよぼす影響

図4は Cycloheptimidazolone およびその誘導体の *in vitro* での DNA 合成に対する影響をみた成績である。化合物の濃度は予備実験により大部分の化合物が 50% 前後の阻害を示すような 8 mM の濃度を選んだ。

図4をみると Cycloheptimidazole-2 (1H)-one はおよそ 30% の阻害を示し、これが Na 塩になるとやや阻害が少なくなる。さらにイミダゾロン環のN原子のうち2の位置のNをSで置換すると阻害はわずかながら強くなる。さらにアメトヘパゾンのように2のN原子に種々の可溶性にするための基を結合させても効果はあまり変わらないから、Cycloheptimidazolone 核そのものが DNA 合成に対して阻害的に働くものと考えられる。

3. がん細胞チミジンキナーゼ活性に対する Cycloheptimidazolone 誘導体の効果

チミジンを前駆体として DNA 合成をみるときはチミ

図4. サイクロヘブチミダゾロンのDNA合成に対する効果
Inhibition of DNA Synthesis by Cycloheptimidazolone

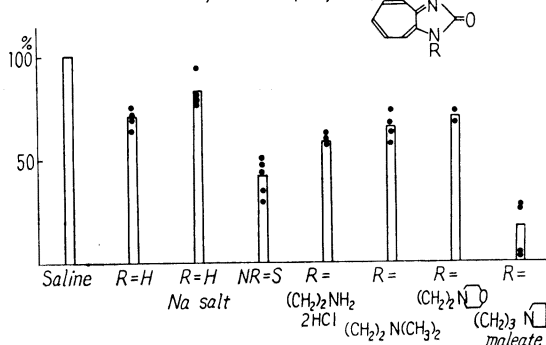
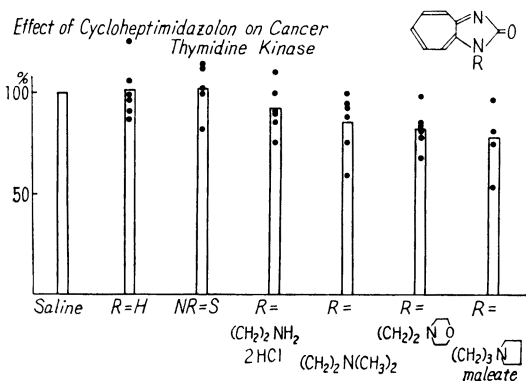


図5. チミジンキナーゼ活性に対するサイクロヘブチミダゾロンの効果
Effect of Cycloheptimidazolone on Cancer Thymidine Kinase



ジンがまずチミジンキナーゼによつて磷酸化され、さらにチミジレートキナーゼが働き、チミジン三磷酸が生じ、さらに DNA ポリメラーゼが働いて DNA が合成される。この時、律速段階となるのはチミジンキナーゼであるといわれている。

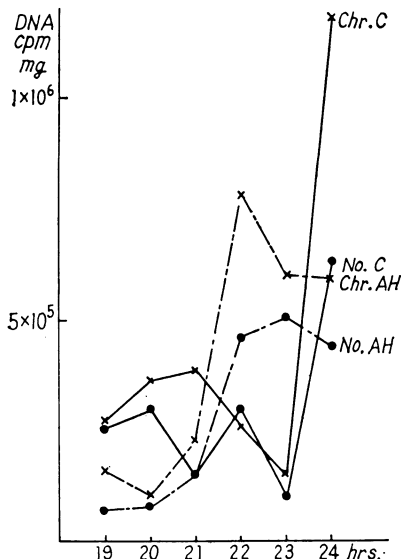
そこで Cycloheptimidazolone 誘導体の阻害作用ががん細胞のチミジンキナーゼあるいはチミジレートキナーゼの段階で作用するか否かを調べてみた。その成績は図5に示すように、ほとんど対照と異ならず、がん細胞のチミジンキナーゼに対しては Cycloheptimidazolone は阻害作用をあまり示さないことが明らかとなった。

4. 再生肝のDNA合成に対するアメトヘパゾンの作用

正常肝ではほとんど DNA は合成されないので、肝細胞での DNA 合成をみるためには再生肝を使うよりはかはない。再生肝の DNA 合成のうちミトコンドリア DNA の合成は肝の部分切除後かなり早く、12 時間頃からゆつくり始まるのが NASS¹³⁾ の実験によつて知られている。しかし細胞核の DNA 合成は肝の部分切除後 24 時間頃からおこるといわれている。

図6. 再生肝のクロマチンおよび核仁のDNA合成とアメトヘパゾン投与の影響

Chr: クロマチン C: コントロール
No: 核仁 AH: アメトヘパゾン投与群



細胞核にはクロマチンのDNAと核仁のDNAとあり、これが再生肝で同時に合成がおこなわれるか否かについてはまだ報告がない。そこでまずこれを確かめてみたところ、いずれのDNAも24時間頃からDNA合成の山が急激に始まることが確かめられた(図6)。

次にアメトヘパゾン10mgを0.2mlの生理的食塩水に溶解し、動物を犠牲にする2時間前に腹腔内に注射した。さらに1時間前に³Hチミジンを腹腔内に注射して、再生肝でのDNA合成に対するアメトヘパゾンの注射の影響をみた実験成績も図6に示した。

図でも明らかなようにアメトヘパゾン注射群は肝の部分切除後22時間ですでにかなりDNA合成率が上昇しているが、対照動物にくらべれば上昇の限度は低い。肝の部分切除後22時間でみるとアメトヘパゾンはDNA合成を促進するように見え、24時間では抑制するようにみえるのである。

すなわちアメトヘパゾンは再生肝でのDNA合成の立ち上りを早めているようにみえるのである。

一般に再生肝でのDNA合成の第1段階はチミジンキナーゼの活性化であつて、これは個体によっては肝の部分切除後22時間附近で始まり、24時間ではほとんどの個体のチミジンキナーゼ活性は上昇している。このような成績からアメトヘパゾンはチミジンキナーゼの活性化の段階に何らかの影響を及ぼすものではないかと考えられる。

実験3に示したようにCycloheptimidazolonはがん

図7. チミジンキナーゼ活性におよぼすサイクロヘプタチミダゾロンの影響

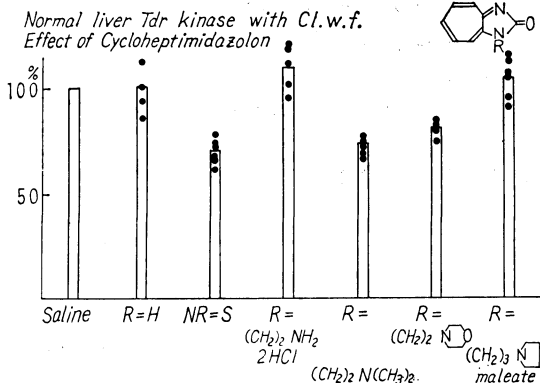
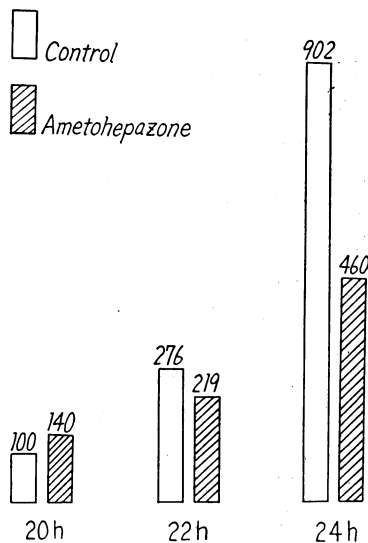


図8. 再生肝チミジンキナーゼに対するアメトヘパゾンの影響
Tdr-kinase in Regenerating Liver



細胞のチミジンキナーゼ活性には何等の影響を及ぼさない。これはがん細胞ではチミジンキナーゼがすでに活性化されているからであろうと考え、正常肝にC.P. factorを加えた時のチミジンのリン酸化の段階と、再生肝に於けるチミジンキナーゼが活性化される時期にCycloheptimidazolon誘導体がどのような影響を及ぼすか調べてみた。

5. 正常肝にC.P. factorを加えた時のチミジンのリン酸化とCycloheptimidazolon誘導体による阻害

正常肝チミジンキナーゼの酵素液を嫌気性細菌由来のC.P. factorとともに37°C10分間保温するとその活性は2倍以上に増す。この過程にCycloheptimidazolon誘

導体を加えると阻害を示すものと軽度の促進を示すものがある(図7)。しかしアメトヘパゾンには明らかに阻害を示した。この成績は再生肝でのDNA合成のアメトヘパゾンによる早期促進を説明しないので、再生肝のチミジンキナーゼについてアメトヘパゾンの影響をしらべてみた。

6. 再生肝のチミジンキナーゼ活性に対するアメトヘパゾンの影響

再生肝をもつ動物に犠牲前2時間にアメトヘパゾン10mgを腹腔内に注射した成績を図8に示す。1群は3頭で図8にはその平均を示した。再生20時間目にアメトヘパゾン投与群のチミジンキナーゼは対照にくらべて40%も増加しており、これが再生肝22時間目のDNA合成を促進させた原因であると思われる。

その後、22時間、24時間と時間の経過がすすむとアメトヘパゾン投与群は明らかに対照にくらべてチミジンキナーゼの活性増加が少なくない。これがDNA合成の阻害となつて図6にあらわれているものと思われる。

IV. 考 察

哺乳類細胞のDNA合成は細菌のDNA合成とはかなり異なっているものと考えられるので、がん細胞の増殖抑制効果をDNA合成阻害の面からみる場合、細菌のDNA合成系を用いるのは適当でない。本研究に於いては多数の薬剤を用いてDNA合成の阻害のスクリーニング試験として、腹水型ヘパトマ細胞を*in vitro*で1時間³Hチミジンとともに培養する方法をとつた。

この方法は常に対照を置いてその値を100%として阻害度を求めるので図3に示すように数回の実験に於いても比較的一定した値を示すCycloheptimidazolon誘導体のうちで比較的強い阻害を示したのはmaleate誘導体であつて、他は大同小異であつた。このうちアメトヘパゾンについてさらに10倍濃度を強くするとほとんどDNA合成はみられず、1/10に濃度をうすめると阻害はほとんどみられなくなる。がん細胞のDNA合成がCycloheptimidazolonによつて阻害されるのは最初のチミジンの磷酸化するかわちチミジンキナーゼの反応段階ではないかと考えて、実験を試みたが、がん細胞の場合はほとんど、どの七員環化合物も大きな阻害はみせない。しかし正常肝のようにチミジンキナーゼが活性化していない場合は一部の化合物にチミジンキナーゼの活性化を妨げる現象がみられた。けれどもこの阻害とDNA合成の阻害とは平行関係を示していない。

それゆえCycloheptimidazolon誘導体のがん細胞DNAの合成阻害はむしろDNAポリメラーゼの阻害と考えられ、これも実際に証明された(表9)。

再生肝のDNA合成の場合はアメトヘパゾンによる阻

表1 アメトヘパゾンによるDNAポリメラーゼの阻害
Inhibition of DNA polymerase by ametohepazon

| Primer | Conc. of ametohepazon | |
|-------------------|-----------------------|---------|
| | 0.46 mM | 7.67 mM |
| Double strand DNA | 103% | 65% |
| Single strand DNA | 97% | 65% |

DNAポリメラーゼの活性の測定はY. IWAMURA, T. ONO & H. P. MORRIS: The heterogeneity of DNA polymerases in rat liver and hepatomas. *Cancer Res.* 28, 2466, 1968によつた。鑄型DNAのうち二重鎖DNAはコウシ胸腺DNA、一重鎖DNAはそれを熱処理したものである。

害がみられる。ただアメトヘパゾンを投与した場合DNA合成の時期がやや早まるのが特徴である。この早期のDNA合成はクロマチンにも核仁にも同様にみられる。これはチミジンキナーゼ活性が一時アメトヘパゾンによつて促進されるためであることが証明された。この促進は時間の経過とともに阻害になることも、DNA合成の阻害と一致する。

V. 結 論

Cycloheptimidazolon誘導体はがん細胞のDNA合成を阻害する。誘導体の化学構造と阻害度の関係はあまり明らかではない。この種の化合物のチミジンキナーゼに対する阻害作用はあまり強くないので、DNA合成の阻害作用はCycloheptimidazolon核そのものにあつて、これがPrimerとなるDNAと結合して、DNAポリメラーゼ作用を妨げるものと考えられる。

本研究に当つて終始御指導御鞭撻を賜つた千葉大学医学部 堀越達郎教授、おなじく三浦義彰教授に深甚の謝意を表す。また実験に協力された遠藤典子氏に感謝する。なおサイクロヘプチミダゾロン誘導体を供与された三共株式会社中央研究所ならびにC. P. factorを分与された徳島大学医学部 藤井節郎教授の御好意に感謝する。

参 考 文 献

- 1) 林一也: RCH-317投与と放射線療法との併用効果について。第4回日本癌治療学会総会, 昭和41年12月8日発表
- 2) J. ILAN & J. H. OUASTEL: Effects of colchicine on nucleic acid metabolism during metamorphosis of *Tenebrio molitor* L. and in some mammalian tissues. *Biochem. J.* 100, 448, 1966
- 3) L. WILSON & M. FRIEDKIN: The biochemical events of mitosis. II. The *in vivo* and *in vitro* binding of colchicine in grasshopper embryos and its possible relation to inhibition of mito-

- sis. *Biochemistry* 6, 3126, 1967
- 4) Y. MIURA, T. NOGUCHI & S. TAKEYAMA : Etude sur la biosynthèse de l'acide ribonucléique. *Pathologie-Biologie* 34, 1869, 1958
 - 5) Y. MIURA & A. SHIGEMATSU : Effets des azulénoïdes sur la division cellulaire chez les oursins. *C. r. Soc. biol.* 152, 221, 1958
 - 6) G. M. HIGGINS & R. M. ANDERSON : Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Amer. Med. Assoc. Arch. Pathol.* 12, 186, 1931
 - 7) M. MURAMATSU, J. L. HODNETT, W. J. STEELE & H. BUSCH : Synthesis of 28-s RNA in the nucleolus. *Biochim. Biophys. Acta* 123, 116, 1966
 - 8) G. SCHMIDT & S. J. THANNAUSER : A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem* 161, 83, 1945
 - 9) Z. DISCHE : Spectrophotometric method for the determination of free pentose and pentose in nucleotides. *J. Biol. Chem.* 181, 379, 1949
 - 10) J. S. COLTER, R. A. BROWN & K. A. O. ELLEN : Observations on the use of phenol for the isolation of deoxyribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 55, 31, 1962
 - 11) P. EKER : Properties and assay of thymine deoxyribonucleotide phosphatase of mammalian cell in tissue culture. *J. Biol. Chem.* 240, 419, 1965
 - 12) S. FUJII *et al* : *Biochim. Biophys. Acta* 204, 352, 1970
 - 13) S. NASS : Incorporation of ^{32}P i into mitochondrial and nuclear and in regenerating liver. *Biochim. Biophys. Acta* 145, 60, 1967

INHIBITION OF DNA SYNTHESIS IN LIVER AND HEPATOMA CELLS BY CYCLOHEPTIMIDAZOLON DERIVATIVES

TOMIYA FUKUDA

Department of Oral Surgery and Biochemistry, Chiba University School of Medicine

Cycloheptimidazolon is a compound similar to benzimidazolon but with seven-members ring instead of benzene ring. One of these compounds, 1(2-dimethylaminothyl) cycloheptimidazole-2(1 H)-one was injected intraperitoneally with ^{32}P to the rats bearing regenerating liver. In those rats, DNA synthesis was observed 2 hours earlier than the control rats. Thymidine kinase extracted from the same regenerating liver was found markedly enhanced. On the contrary, when rat ascitic hepatoma (AH 130) was incubated *in vitro* for 60 minutes with ^3H -thymidine and 8 mM of cycloheptimidazolon derivatives, remarkable inhibition was observed. In these cases, although an appreciable inhibition was not found in thymidine kinase activity by these compounds, DNA polymerase extracted from hepatoma cells was suppressed by *in vitro* addition of cycloheptimidazolon derivatives. Thus, these compounds showed a selective inhibition on DNA synthesis in cancer cells but not on DNA replication in regenerating liver.