

核 酸 関 連 化 合 物 の 抗 腫 瘍 性 の 研 究 (III)

プリン誘導体の核酸合成阻止における腫瘍特異性

戸根木尚子・永沼真理子・豊島 滋

慶応義塾大学医学部薬化学研究所化学療法部門

(昭和46年8月17日受付)

我々は前報^{1,2)}に於いて、6-Mercaptopurine ribonucleoside (6-MPR) の抗腫瘍性について報告したが、今回は 6-Mercaptopurine (6-MP) および 6-MPR を含む数種のプリン誘導体について、その核酸合成阻止の面から見た腫瘍特異性について検討を加えたので、その結果について記述する。

腫瘍に対して特異性が高く、そして正常組織に及ぼす影響の少ない抗腫瘍性薬剤を見出すことが抗がん剤研究の終局の目標であるが、今日なお、充分満足すべき成果がえられたとは言い難い。抗腫瘍性薬剤の腫瘍特異性を解明する研究方向は色々あると思われるが、我々はまず、腫瘍と正常組織の間には生体高分子物質の合成系路の間に差があり、それが1つの薬物に対する感受性の差、すなわち腫瘍特異性として発現されうるのであらうと考えて本実験を行なった。

実験材料および方法

薬物：実験に使用した薬物の構造式およびそれらの略号を図1に示す。

これらの薬物は森下製薬株式会社および味の素株式会社で合成され提供されたものである。

細胞：がん由来の細胞系として Hep No. 2 および HeLa 細胞を、正常細胞由来であるが永く継代され現在株化されているものとして、L および MDBK 細胞を、正常細胞としては、chick embryo fibroblast の初代培養を、また、mouse および rat の embryo fibroblast の2代目培養のものを使用した。

培地：細胞の合成培地には 10% 牛血清加 YLA 培地を用い、実験に当つての維持培地は EAGLE 培地を使用した。

Cover slip 法によるラベル・プレカーサーのとり込み阻止：生体高分子物質の合成阻止実験は SCHAEFFER の Cover slip 法³⁾を用いて行なった。すなわち、直径 3 cm のシャーレに cover slip を置いて細胞を培養する。単層の成立したのち、phosphate buffered saline (PBS) で3回洗い、EAGLE 培地 0.9 ml、被検薬物溶液を 0.1 ml 加え、37°C、5 hrs 反応する。DNA、RNA およびタンパク合成の測定

のためには、それぞれ ³H-thymidine, ³H-uridine および ³H-leucine を使用して、各シャーレに 1 μ c を加え、30 min. pulse label を行なう。PBS で2回洗滌後、酢酸：エタノール (3:1) で 4°C、15 min 固定する。さらに3回細胞を洗滌後、0.5 M perchloric acid で、核酸合成の実験の場合には 4°C、30 min. タンパク合成実験では 37°C、60 min. 処理して、酸可溶性部を除き、PBS で5回洗滌後、乾燥、液体シンチレーションカウンターで測定する。

DNA 合成およびタンパク合成の阻止標準物質としては Iododeoxyuridine (IUDR) と Cycloheximide (CHI) を使用した。RNA 合成の阻止物質としては Mitomycin C (MMC) を使用した。MMC は DNA 合成阻害剤のように分類されていることもあるが、核酸合成系の攪乱を

図1. 薬物およびその構造式

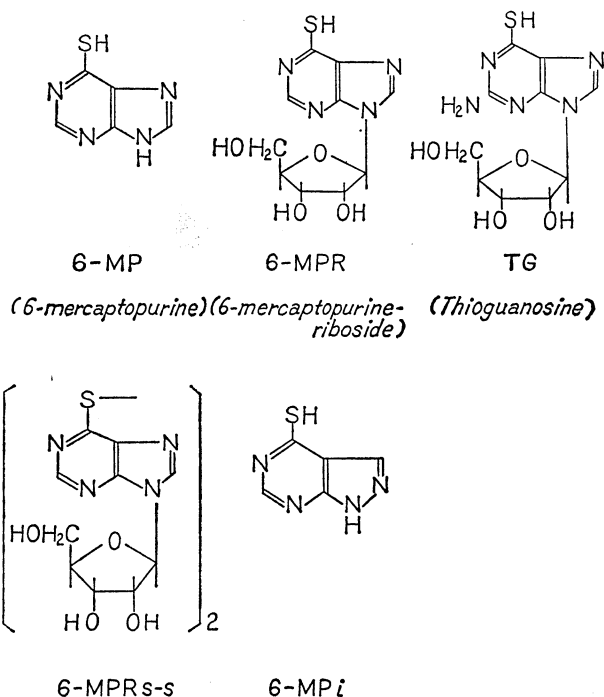


表1 プリン誘導体の各種 cell-lines

使用細胞		Hep #2			HeLa			L		
使用薬物	濃度 (M)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)
none		1,805.9	98.2	—	765.4	37.0	—	7,115.6	746.4	—
IUDR	10 ⁻⁴	128.2	7.9	92.9	71.2	4.3	90.7	356.7	62.5	95.0
6-MP	10 ⁻³	225.7	23.9	87.5	267.8	92.2	65.0	190.8	53.7	97.3
	10 ⁻⁴	123.1	5.3	93.2	229.7	55.8	70.0	225.1	24.7	96.8
	10 ⁻⁵	201.1	62.5	88.9	297.4	127.2	61.1	202.0	18.6	97.2
6-MPR	10 ⁻³	72.2	11.3	96.0	192.8	5.3	74.8	197.3	16.8	97.2
	10 ⁻⁴	108.4	22.0	94.0	460.6	25.1	39.8	199.5	21.8	97.2
	10 ⁻⁵	128.2	14.5	92.9	481.1	36.5	37.1	244.4	50.7	96.6
TG	10 ⁻³	193.2	46.8	89.3	307.3	33.8	59.9	1,580.6	291.6	77.8
	10 ⁻⁴	223.9	24.9	87.6	472.5	26.5	38.3	1,292.6	166.4	81.8
	10 ⁻⁵	247.4	17.1	86.3	513.1	65.5	33.0	1,743.4	217.6	75.5
6-MPR (s-s)	10 ⁻³	132.2	4.2	92.7	89.6	13.1	88.3	188.5	3.3	97.4
	10 ⁻⁴	200.4	13.9	88.9	87.3	8.1	88.6	221.7	25.3	96.9
	10 ⁻⁵	390.1	10.1	78.4	88.1	14.4	88.5	350.2	82.1	95.1
6-MPi	10 ⁻³	335.1	2.1	81.4	263.3	80.8	65.6	2,426.2	403.6	65.9
	10 ⁻⁴	345.2	24.3	80.9	308.5	187.2	59.7	5,701.5	251.7	19.9
	10 ⁻⁵	849.0	58.8	53.0	419.4	32.3	45.2	7,247.2	510.6	0

表2 プリン誘導体の各種 cell-lines

使用細胞		Hep #2			HeLa			L		
使用薬物	濃度 (M)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)
none		921.5	171.6	—	1,461.7	136.7	—	916.3	75.5	—
Mitomycin C	10 ⁻⁴	243.3	24.1	73.6	248.1	21.8	79.6	304.9	32.7	66.7
6-MP	10 ⁻³	185.2	36.3	79.9	675.3	28.4	53.8	165.6	18.5	81.9
	10 ⁻⁴	176.0	42.9	80.9	894.6	33.1	38.8	177.3	16.0	80.7
	10 ⁻⁵	456.1	42.0	50.5	1,208.8	83.4	17.3	259.4	31.6	71.7
6-MPR	10 ⁻³	92.2	27.1	90.0	418.0	59.8	71.4	173.9	19.0	81.0
	10 ⁻⁴	157.6	11.0	82.9	752.8	118.9	48.5	200.5	44.1	78.1
	10 ⁻⁵	207.3	3.1	77.5	1,080.2	90.7	26.1	236.0	28.7	74.2
TG	10 ⁻³	115.5	86.6	87.5	358.1	66.6	75.5	229.8	12.8	74.9
	10 ⁻⁴	256.9	17.3	72.1	901.9	55.0	38.3	270.1	17.2	70.5
	10 ⁻⁵	285.5	21.4	69.0	1,056.8	96.2	27.7	348.0	17.9	62.0
6-MPR (s-s)	10 ⁻³	102.6	9.6	88.9	343.5	46.7	76.5	90.2	10.5	90.2
	10 ⁻⁴	249.1	1.9	73.0	945.7	43.5	35.3	195.9	29.4	78.6
	10 ⁻⁵	210.5	15.4	77.2	1,087.5	51.1	25.6	231.3	30.3	74.8
6-MPi	10 ⁻³	144.7	11.3	84.3	650.5	71.6	55.5	201.6	14.0	78.0
	10 ⁻⁴	267.3	9.8	71.0	998.3	28.0	31.7	464.9	90.2	49.3
	10 ⁻⁵	489.7	34.4	46.9	1,185.4	29.6	18.9	579.2	42.6	36.8

の DNA 合成に対する影響

MDBK			CEF			MEF			REF		
平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)
2,993.8	199.0	—	461.2	28.9	—	1,318.3	126.5	—	1,814.5	72.9	—
167.2	26.4	94.4	81.2	11.7	82.4	106.1	11.6	92.0	161.0	15.1	91.1
1,153.5	77.2	61.5	242.6	13.9	47.4	588.8	65.9	55.3	974.9	19.8	46.3
2,568.6	130.6	14.2	438.1	12.1	5.0	697.8	58.2	47.1	1,449.5	92.3	20.1
2,787.6	124.5	6.9	485.6	38.8	0	978.3	76.8	25.8	N. D.*	—	—
630.8	72.4	78.9	189.5	7.3	58.9	252.4	17.3	80.9	460.3	60.9	74.6
2,104.0	146.4	29.7	314.3	10.6	31.9	717.3	14.5	45.6	1,267.7	27.0	30.1
2,375.6	181.5	20.6	315.0	2.3	31.7	908.2	106.0	31.1	N. D.	—	—
1,947.4	35.1	35.0	150.9	13.4	67.3	314.7	17.1	76.1	993.8	71.0	45.2
1,848.5	193.3	38.3	260.6	13.6	43.5	530.1	30.5	59.8	1,329.0	34.3	26.8
3,025.0	20.1	0	326.2	11.7	29.3	592.9	47.2	55.0	N. D.	—	—
207.8	21.5	93.1	118.3	13.1	74.3	177.1	14.8	86.6	745.9	54.7	58.9
1,321.0	48.7	55.9	224.7	24.5	51.3	514.3	48.1	61.0	1,352.7	85.3	25.5
2,356.0	144.6	21.3	310.1	15.4	32.8	785.9	69.7	40.4	N. D.	—	—
1,881.1	24.3	37.2	407.8	8.6	11.6	504.6	29.0	61.7	N. D.	—	—
2,651.3	354.4	11.4	359.8	15.4	22.0	887.4	49.2	32.7	N. D.	—	—
2,800.1	410.9	6.5	N. D.	—	—	950.5	61.8	27.9	N. D.	—	—

* not done

における RNA 合成に対する影響

MDBK			CEF			ME			REF		
平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)
1,300.5	99.0	—	613.8	118.2	—	172.3	32.8	—	191.4	15.3	—
742.3	119.8	42.9	170.3	16.6	72.3	90.7	12.0	47.4	113.1	17.7	40.9
544.6	43.6	58.1	295.4	17.2	51.9	133.2	1.4	22.7	166.0	13.6	13.3
954.1	85.3	26.6	N. D.	—	—	158.8	13.8	7.8	218.2	25.0	0
1,024.8	78.1	21.2	N. D.	—	—	169.0	16.9	1.9	N. D.*	—	—
262.8	26.4	79.8	158.8	7.2	74.1	82.8	3.7	51.9	120.0	14.7	37.3
829.6	54.3	36.2	291.9	11.5	52.4	142.6	12.4	17.2	143.0	8.3	25.3
965.8	12.5	25.7	351.9	26.3	42.7	165.1	7.4	4.2	N. D.	—	—
801.4	24.0	38.4	359.1	68.8	41.5	81.6	9.5	52.6	126.5	15.3	33.9
872.2	49.8	32.9	232.0	21.4	62.2	135.8	14.1	21.2	212.3	16.9	0
1,192.5	57.3	8.3	N. D.	—	—	152.3	24.4	11.6	N. D.	—	—
N. D.	—	—	116.2	5.3	81.1	120.3	24.1	30.2	118.4	4.5	38.1
723.6	59.1	44.4	270.0	29.1	56.0	126.9	6.5	26.3	146.5	27.7	23.5
1,053.5	113.0	19.0	N. D.	—	—	147.4	9.9	14.5	N. D.	—	—
534.6	85.1	58.9	351.3	40.6	42.8	130.5	5.3	24.3	N. D.	—	—
948.2	67.5	27.1	381.6	25.4	37.8	185.4	0.1	0	N. D.	—	—
1,090.9	85.5	16.1	N. D.	—	—	152.9	16.1	11.3	N. D.	—	—

* not done

表3 プリン誘導体の各種 cell-lines

使用薬物 名 称	使用細胞 濃 度 (M)	Hep # 2			HeLa			L		
		平 均 値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻 止 率 (%)	平 均 値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻 止 率 (%)	平 均 値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻 止 率 (%)
none		818.3	114.3	—	1,574.9	192.4	—	2,522.3	191.0	—
Cyclohexi- mide	10 ⁻⁴	105.4	10.1	87.1	182.3	21.6	88.4	164.3	2.8	93.5
6-MP	10 ⁻⁸	645.2	65.1	21.2	1,693.4	7.5	0	771.1	208.1	69.4
	10 ⁻⁴	1,018.4	107.3	0	1,803.4	91.7	0	2,188.1	261.8	13.2
	10 ⁻⁵	864.7	88.2	0	1,738.1	155.2	0	2,400.6	339.3	4.8
6-MPR	10 ⁻⁸	693.0	42.5	15.3	1,880.0	104.2	0	871.4	34.9	65.5
	10 ⁻⁴	710.3	154.9	13.2	1,418.1	4.2	10.0	1,896.6	14.0	24.8
	10 ⁻⁵	570.0	70.4	30.3	1,937.0	182.6	0	2,726.6	64.4	0
TG	10 ⁻⁸	552.3	24.0	32.5	1,026.0	198.1	34.9	833.3	58.2	67.0
	10 ⁻⁴	923.7	37.1	0	1,394.1	95.7	11.5	1,802.1	138.9	28.6
	10 ⁻⁵	694.9	44.8	15.1	1,344.7	82.1	14.6	2,699.3	213.8	0
6-MPR (s-s)	10 ⁻⁸	469.5	46.2	42.6	1,270.6	50.7	19.3	1,705.9	79.8	32.4
	10 ⁻⁴	580.6	40.0	29.0	1,614.3	53.0	0	2,011.0	178.3	20.3
	10 ⁻⁵	611.4	58.9	25.3	1,450.5	53.7	7.9	2,627.3	269.9	0
6-MPi	10 ⁻⁸	465.3	59.6	43.1	1,655.1	94.3	0	1,541.1	178.8	38.9
	10 ⁻⁴	904.1	186.8	0	1,591.2	123.6	0	2,036.6	105.4	19.3
	10 ⁻⁵	912.3	35.8	0	1,571.9	155.2	0.2	2,546.9	153.3	0

来し、RNA および DNA 合成の阻止を来すものであり、今回は作用点の広汎な RNA 合成阻害剤として MMC を用いた。

実験結果および考察

³H-thymidine の取り込みに対する影響を表 1 に、³H-Uridine の取り込みに対する影響を表 2 に、³H-leucine の取り込みに対する影響を表 3 に示した。

表 1 に示すとおり、6-MP は Hep No. 2 細胞においては 10⁻⁸ M で 87.5% の阻止があつたが、6-MPR の 10⁻⁸ M は 96.0% の阻止効果を示した。この 6-MP と 6-MPR の阻止効果は 5% の危険率で有意である。

同じような結果が HeLa 細胞においても見られた。6-MPR (s-s) は 6-MP および 6-MPR と同程度の阻止効果を示したが、6-MPi ではその阻止効果は減少した。L 細胞の RNA 合成に対するこれらプリン誘導体の阻止効果は、Hep No. 2 細胞に対する場合とはほぼ同じ程度のものではあつたが、MDBK 細胞ではこれらの薬物の阻止効果はかなり少なくなつた。MDBK 細胞での阻止効果と chick embryo fibroblast (CEF), mouse embryo fibroblast (MEF), rat embryo fibroblast (REF) における阻止効果とはほぼ同じ程度であつた。このことは L 細胞が株化継代歴が永く、MDBK 細胞のほうが少ないことと思えば、L 細胞のほうがより悪性腫瘍的性

格を有し、MDBK 細胞は正常細胞の性格を有しているといえるであろう。IUDR はこれら薬物に比し非腫瘍・腫瘍細胞のいずれを問わず著明な阻止効果を来していた。

RNA 合成阻止についての表 2 に示した実験結果でも、ほぼ表 1 と同じ傾向が示された。6-MPR (s-s) は 6-MP と 6-MPR とほぼ同じ程度の阻止効果を示したが、6-MPi の効果はこれらのプリン誘導体の中では弱いものであつた。表 1 に示した DNA 合成阻止効果と表 2 に示す RNA 合成阻止効果を比較すると、これらプリン誘導体は DNA 合成阻止のほうがより活発であつた。MMC は IUDR と同じように、非腫瘍・腫瘍細胞の別を問わず、著明な阻止効果を示した。

以上のとおり、今回検討したプリン誘導体は核酸合成阻止を来すが、表 3 に示すとおり、タンパク合成阻止はほとんど示さなかつた。

以上の結果から判断すると、今回使用したプリン誘導体は 6-MP、6-MPR、TG および 6-MPR (s-s) とともに核酸合成阻止を来し、その効果は非腫瘍細胞におけるより腫瘍細胞において著明であつた。IUDR、MMC および CHI ではこのような細胞の種類による阻止効果の差は認めなかつた。

IUDR および MMC は抗がん効果が優れており、人

における蛋白質合成に対する影響

MDBK			CEF			ME			REF		
平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)	平均値 (CPM)	標準偏差 (CPM)	阻止率 (%)
934.2	127.8	—	666.8	134.9	—	N. D.*	—	—	N. D.	—	—
133.7	14.0	85.7	102.3	21.7	84.7	N. D.	—	—	N. D.	—	—
412.7	22.9	55.8	666.1	184.0	0.1	N. D.	—	—	N. D.	—	—
853.6	31.4	8.6	536.8	90.3	19.5	—	—	—	—	—	—
939.9	43.7	0	662.3	84.0	0.7	—	—	—	—	—	—
517.4	4.0	44.6	762.1	45.8	0	N. D.	—	—	N. D.	—	—
898.1	103.1	3.9	749.1	43.3	0	—	—	—	—	—	—
1,063.9	59.4	0	739.0	20.8	0	—	—	—	—	—	—
436.2	50.4	53.3	434.9	19.3	34.8	N. D.	—	—	N. D.	—	—
971.5	151.5	0	445.4	56.4	33.2	—	—	—	—	—	—
1,000.8	60.6	0	796.3	62.7	0	—	—	—	—	—	—
536.9	58.1	42.5	589.9	24.2	11.5	N. D.	—	—	N. D.	—	—
646.2	43.4	30.8	834.7	53.2	0	—	—	—	—	—	—
1,078.1	53.2	0	746.0	56.3	0	—	—	—	—	—	—
574.5	20.1	38.5	562.9	25.7	15.6	N. D.	—	—	N. D.	—	—
904.7	62.6	3.2	966.2	52.1	0	—	—	—	—	—	—
873.3	27.9	6.5	844.0	34.2	0	—	—	—	—	—	—

* not done

体のがん治療にも応用されていることは周知のことであるが、MMC は副作用が多く、また IUDR も全身投与に踏み切り難いのが実際である。いつぼう、6-MP および 6-MPR は共に主として白血病治療に使用されているが、副作用がなおかなりの頻度で発現するのであるが、その発現する副作用は MMC の場合ほどには重篤なもの多くないようである。

これらの臨床結果と今回我々のえたプリン誘導体の核酸合成阻止における特異性の結果は、比較的に一致する点の多いものであつた。薬物の腫瘍特異性は必ずしも核酸合成阻止の面のみから論ずるべきものではないが、今回、我々のえた結果はこのようなスクリーニングを採用することにより副作用の少ない抗腫瘍剤検索の1つの方向を打出しえたものであろう。

要 約

副作用の少ない抗腫瘍性薬剤を見出すための検索方向の1つとして数種の細胞系でのプリン誘導体の核酸合成阻止効果を検討した。

6-MP, 6-MPR, 6-MPR (s-s) および TG は核酸合成阻止効果が強いが 6-MP の異性体である 6-MPi はそれより阻止効果が弱かつた。これらプリン誘導体の核酸合成阻止は DNA 合成のほうが RNA 合成においてより著明であつた。そして、MMC や IUDR が腫瘍細胞であろうと非腫瘍細胞であろうと強く核酸合成阻止を示すのに反し、プリン誘導体の効果は Hep No. 2, HeLa および L 細胞のような腫瘍細胞または強く株化した細胞において正常細胞に対するより著明であつた。これらの結果の進展は新しい *in vitro* 抗がん剤スクリーニング法の開発につながるものと考えられる。

文 献

- 1) 藤田晴久, 豊島 滋: Chemotherapy 18(4), 429 (1970)
- 2) 瀬戸淑子, 藤田晴久, 戸根木尚子, 豊島 滋: Chemotherapy 18(4), 434 (1970)
- 3) F. L. SCHAFFER: J. Bact. 91, 2309 (1966)

ANTITUMOR EFFECT OF NUCLEIC ACID ANALOGUES (III)

Tumor-specificity of Purine-analogues in the Inhibition
of Nucleic Acid Biosynthesis

HISAKO TONEGI, MARIKO NAGANUMA and SHIGESHI TOYOSHIMA

Division of Chemotherapy, Pharmaceutical Institute, School of Medicine, Keio University

To establish an advanced screening method to find less toxic antitumor agents, the effect of several purine analogues on the biosynthesis of protein and nucleic acids in various cell-lines was investigated. Mitomycin-C, Iododeoxyuridine and Cycloheximide inhibited either of malignant cells and non-malignant cells, while 6-Mercaptopurine, 6-Mercaptopurine riboside, Thioguanosine and Bis (6-Mercaptopurine riboside) compound inhibited remarkably the biosynthesis of nucleic acids in malignant cells, but fairly that of non-malignant cells. These findings suggest that such an *in vitro* screening system may be useful to find less toxic antitumor agents.