

ИНГИБИРОВАНИЕ ИНВАЗИИ РАКОВЫХ КЛЕТОК И МЕТАСТАЗОВ ПРИ ПОМОЩИ ИНГИБИТОРОВ NF-КАППА-B

Т. Укаджи, Ш.Х. Ганцев, К. Умезава

Медицинский университет Аичи, факультет скрининга молекулярной таргетной медицины, Школа Медицины, Нагакутэ, Япония
ГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет
Научно-исследовательский институт онкологии, г. Уфа, Россия

Укаджи Тамами,

исследователь лаборатории таргетной медицины,
Отделение прикладной химии, Факультет Науки и технологии,
Университет Кейо, Йокохама,
Нагойя, 480-1195, Япония,
тел. 0561-62-3311

Ганцев Шамиль Ханафиевич, зав. кафедрой онкологии

с курсами онкологии и патологической анатомии ИПО БГМУ,
д-р мед.наук, профессор,
450079, Россия, Респ.Башкортостан, г.Уфа, Пр.Октября, д. 73/1,
тел. 8 (347) 248-40-58,
e-mail: prfg@mail.ru

Казуо Умезава, профессор факультет скрининга молекулярной

таргетной медицины Медицинского университета Аичи,
Нагакутэ, Нагойя 480-1195, Япония,
тел./факс 81-561-61-1959,
e-mail: umezawa@aichi-med-u.ac.jp

Разработан высокопотентный и специфичный ингибитор NF-каппа-B под названием дегидроксиметилэпоксихиномицин (DHMEQ), основанный на структуре эпоксихиномицинов, которые являются антибиотиками со слабой противовоспалительной активностью, полученными из *Amicolatopsis*. Можно полагать, что ингибирование активности NF-каппа-B может играть существенную роль в контроле процесса метастазирования.

Поэтому нами были синтезированы около 20 производных, среди которых - DTCM-глутаримид (DTCM-G). Нами была произведена оценка противометастатической активности этого препарата с использованием клеток мышиной меланомы B16-F10. Было обнаружено, что DTCM-G ингибирует клеточную инвазию и индуцирует аноикоз в клетках B16-F10. Данный препарат нетоксичен и прост в изготовлении. Таким образом, он может считаться новым кандидатом на роль противометастатического препарата.

Ключевые слова: NF-каппа-B, DHMEQ, метастазирование, противометастатическая активность, аноикоз, DTCM-глутаримид.

INHIBITION OF CANCER CELL INVASION AND METASTASIS BY NF-KAPPA-B INHIBITORS

T. Ukaji, Sh.Kh. Gantsev, K. Umezawa

Department of Molecular Target Medicine Screening,
Aichi Medical University School of Medicine, Nagakute, Japan
Scientific Research Institute of Oncology
Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

We designed a potent and specific NF-kappa-B inhibitor called dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), based on the structure of epoxyquinomicins, which are weak antibiotics isolated from *Amicolatopsis*. It is believed that inhibition of NF-kappa-B may play a significant role in controlling the process of metastasis. We have therefore synthesized derivatives of about 20, of which DTCM-glutarimide (DTCM-G). We have evaluated the antimetastatic activity of the preparation using murine melanoma B16-F10. It was found that DTCM-G inhibits cell invasion and induces anoikosis in cells B16-F10. This preparation is non-toxic and easy to manufacture. Thus, it can be considered as a new candidate for the antimetastatic drug.

Keywords: NF-kappa-B, DHMEQ, metastasis, antimetastatic activity, anoikosis, DTCM-glutarimide.

Введение

Процесс метастазирования регулируется множеством генов, связанных с отъединением, миграцией, проникновением, адгезией и ростом раковых клеток. Он также регулируется факторами микросреды, такими как ангиогенез, аноксия и воспалительные цитокины. В данном исследовании мы сосредоточили свое внимание на клеточном ядерном факторе каппа-В (NF-каппа-В). NF-каппа-В – это транскрипционный фактор, состоящий из белков семейства Rel, включая p65, cRel, RelB, p50 и p52. NF-каппа-В способствует экспрессии воспалительных цитокинов, противоопухолевых белков, связанных с метастазированием, в том числе матриксных металлопротеиназ (ММР), хемокинов и рецепторов хемокинов, каждый из которых усиливает злокачественность опухоли. Можно полагать, что ингибирование активности NF-каппа-В может играть существенную роль в контроле процесса метастазирования.

Ингибиторы NF-каппа-В

Нами (К. Умегава и соавт.) разработан высокопотентный и специфичный ингибитор NF-каппа-В под названием дегидроксиметилэпоксихиномицин (DHMEQ), основанный на структуре эпоксихиномицинов, которые являются антибиотиками со слабой противовоспалительной активностью, полученными из *Amiclatopsis* (5). DHMEQ синтезируется в виде рацемической формы из 2,5-диметоксианилина в 5 этапов [11]. Затем, после хирального разделения с использованием липазы [4], получается (-)-DHMEQ, который примерно в 10 раз сильнее ингибирует NF-каппа-В по сравнению с (+)-DHMEQ. В настоящее время (-)-DHMEQ используется в основном в лабораторных пробирочных экспериментах, в то время как рацемический DHMEQ – в экспериментах на животных. DHMEQ показал способность ингибировать ядерную транслокацию NF-каппа-В [2]. После этого было обнаружено, что (-)-DHMEQ ингибировал присоединение NF-каппа-В к ДНК [16]. Так как DHMEQ ковалентно связывается со специфическим цистеиновым остатком p65, p50, cRel и RelB, то его ингибирование NF-каппа-В является необратимым [9]. Являясь специфичным ингибитором, DHMEQ не влияет на деятельность других транскрипционных факторов, включая AP-1, NFAT и STAT1. (-)-DHMEQ ингибировал секрецию воспалительных цитокинов в культурах макрофагов и раковых клеток. Кроме того, DHMEQ продемонстрировал высокую противовоспалительную и противоопухолевую активность, не показав при этом токсичности в различных моделях заболеваний [14].

В ходе скрининга ингибиторов NF-каппа-В нами изолирован известный антибиотик – 9-метилстрептимидон – из фильтрата культуры микроорганизмов [15]. 9-метилстрептимидон ингибировал активность NF-каппа-В в анализе по гену-репортеру в течение 24 часов, и он показал селективную цитотоксичность на клетки ATL, в которых NF-каппа-В конститутивно активирован. Затем нами осуществлена попытка получить большее количество этого при-

Introduction

Cancer metastasis is regulated by a lot of genes related with detachment, migration, invasion, adhesion, and growth. It is also regulated by micro-environmental factors such as angiogenesis, anoxia, and inflammatory cytokines. Among them, we focused on cellular nuclear factor-kappa-B (NF-kappa-B), which is a transcription factor consisting of Rel family proteins including p65, cRel, RelB, p50, and p52. NF-kappa B promotes the expression of inflammatory cytokines, anti-apoptosis proteins, metastasis-related proteins including matrix metallo-proteases (MMP), chemokines, and chemokine receptors, all of which enhance cancer malignancy. Thus, inhibition of NF-kappa-B activity may be useful for the control of metastasis.

NF-kappa-B inhibitors

We designed a potent and specific NF-kappa-B inhibitor called dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), based on the structure of epoxyquinomicins (Fig. 1), which are weak antibiotics isolated from *Amiclatopsis* (5). DHMEQ is synthesized as a racemic form from 2,5-dimethoxy aniline in 5 steps (11). Then, after the chiral separation using lipase (4), (-)-DHMEQ is about 10 times stronger to inhibit NF-kappa-B than (+)-DHMEQ. Currently (-)-DHMEQ is mainly used for the cellular experiments, while racemic DHMEQ for the animal experiments. DHMEQ was shown to inhibit nuclear translocation of NF-kappa-B (2), thereafter, we showed that (-)-DHMEQ inhibited NF-kappa-B binding to DNA (16). Since it covalently binds to the specific cysteine residue of p65, p50, cRel, and RelB, its inhibition of NF-kappa-B is irreversible (9). Being a specific inhibitor, it does not affect activities of other transcription factors including AP-1, NFAT, and STAT1. (-)-DHMEQ inhibited secretion of inflammatory cytokines in cultured macrophages and cancer cells. Moreover, DHMEQ showed potent anti-inflammatory activity and anticancer activity in various disease models without any toxicity in mice (14).

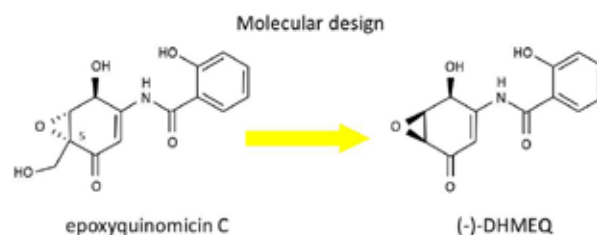


Рис. 1. Молекулярный дизайн: (-)-DHMEQ, получаемый из эпоксихиномицина С
Fig. 1. Molecular design of (-)-DHMEQ from эпохикуиномицин С

In the course of our screening of NF-kappa-B inhibitors, we isolated a known antibiotic, 9-methylstreptimidone, from the culture filtrate of microorganism (15). 9-methylstreptimidone inhibited the NF-kappa-B activity in the promoter reporter assay in 24 h, and it showed selective cytotoxicity on adult T-cell leukemia cells in which NF-kappa-B is constitutively activated.

родного соединения, но его производство микроорганизмами было скудным, а химический синтез был неэффективным. Поэтому, нами были синтезированы около 20 производных, среди которых DTCM-глутаримид (DTCM-G), который, как было установлено, ингибирует ЛПС-индуцированное производство NO в макрофагах линии RAW264.7 [3]. DTCM-глутаримид не ингибирует ЛПС-индуцированную активацию NF-каппа-B в течение 30 минут, однако недавно нами было обнаружено, что он ингибирует NF-каппа-B в течение 24 часов [12]. Его противовоспалительное действие было продемонстрировано *in vivo* при ингибировании отторжения трансплантата у мышей после операции по трансплантации сердца [13]. Недавно стало известно, что он ингибирует нисходящий сигнальный путь mTOR, проявляющий иммуносупрессивную активность [8].

Участие аутокринной системы CXCL12/CXCR4 в регуляции инвазии клеток при карциноме яичников

Рак яичников занимает первые места среди онкогинекологических заболеваний по частоте встречаемости и смертности. Как правило, основной причиной неэффективности лечения и смерти больных являются ранние метастазы. Рак яичников способен активно метастазировать, включая отдаленные метастазы, в печень и легкие. Кроме того, одной из характеристик рака яичников является то, что он быстро метастазирует по брюшине и органам брюшной полости. Таким образом, при лечении рака яичников внутрибрюшинное введение противораковых препаратов считается более эффективным, чем внутривенное, поэтому такой способ введения лекарства используется часто. При проведении экспериментов на животных DHMEQ в основном вводился внутрибрюшинно, и хотелось бы отметить, что данный способ дал успешные результаты [14].

Нами была изучена роль NF-каппа-B в инвазивности клеток RMG1 при раке яичников с помощью (-)-DHMEQ. (-)-DHMEQ ингибировал инвазию *in vitro* и экспрессию CXCL12 и CXCR4. Система CXCL12/CXCR4 считается важным фактором (как система хемокин/рецептор) для вторичного формирования опухоли. Однако в настоящем исследовании нами было обнаружено, что нейтрализация антителами CXCR4 или снижение CXCR4 подавляют клеточную инвазию. Протеомный анализ показал, что лечение CXCR4-siRNA снизило секрецию нескольких белков, связанных с инвазией, таких как MMP-9 и uPA. Из этих данных следует, что при помощи (-)-DHMEQ была подавлена инвазия клеток рака яичников путем ингибирования аутокринной системы CXCL12/CXCR4, которая регулируется NF-каппа-B [6].

Ингибирование (-)-DHMEQ клеточной адгезии рака молочной железы при медиации галектин-3-связывающего белка

Галектин-3-связывающий белок (G3BP) представляет собой секреторный гликопротеин 90К, который первоначально был идентифицирован как

Then, we tried to obtain larger amount of this natural compound, but its production by the microorganism was poor, and its chemical synthesis was not efficient. Therefore, we synthesized about 20 derivatives, among which DTCM-glutarimide (DTCM-G, Fig. 2) was found to inhibit the LPS-induced NO production in a macrophage cell line RAW264.7 (3). DTCM-glutarimide did not inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced NF-kappa-B activation in 30 min, but recently, we have found it inhibits NF-kappa-B in 24 h (12). It showed anti-inflammatory activity *in vivo* inhibiting the graft rejection in mouse heart transplantation (13). It was recently reported to inhibit the mTOR downstream signaling pathway to show immunosuppressive activity (8).

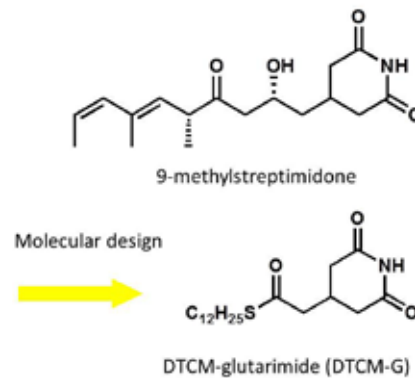


Рис. 2. Молекулярный дизайн: DTCM-G, полученный из 9-метилстрептимидона, и ингибирующий NF-каппа-B

Fig. 2. Molecular design of NF-kappa-B inhibitor DTCM-G from 9-methylstreptimidone

Involvement of autocrine CXCL12/CXCR4 system in the regulation of ovarian carcinoma cell invasion

Ovarian cancer is the second most common gynecological cancer. Generally, the main cause of treatment failure and death is metastasis. Ovarian cancer can metastasize to neighboring tissues including the liver and lungs. Moreover, one of the characteristics of ovarian cancer is that it easily metastasizes into the peritoneal cavity, as shown in Fig. 3. Therefore, in the case of ovarian cancer, the intraperitoneal (IP) administration of anticancer drugs is considered to be more effective than intravenous (IV) administration; and, therefore, this administration route is often employed clinically in this field. DHMEQ has been mainly administered by IP route in animal experiments with many successful results (14).

We studied the role of NF-kappa-B in the invasiveness of ovarian carcinoma RMG1 cells by using (-)-DHMEQ. (-)-DHMEQ inhibited invasion *in vitro* and the expression of CXCL12 and CXCR4. CXCL12/CXCR4 system is usually considered important as chemokine/receptor system for the secondary tumor formation. But in the present research, we found that neutralizing antibody against CXCR4 or knockdown of CXCR4 suppressed the cellular invasion. Proteomic analysis revealed that CXCR4-siRNA treatment lowered the secretion of several invasion-related proteins, such as MMP-9 and uPA.

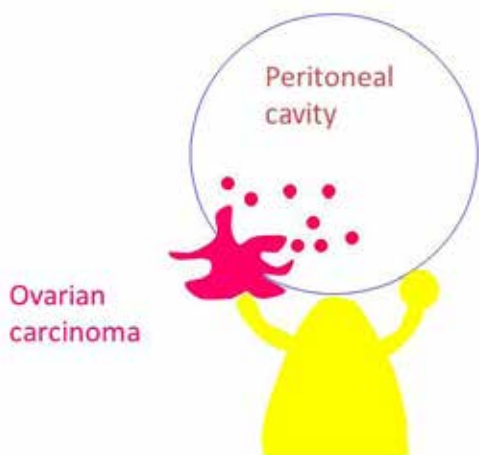


Рис. 3. Карцинома яичника «агрессивна», происходит вторжение в брюшную полость
Fig. 3. Ovarian carcinoma is aggressive and invades into the peritoneal cavity

антиген, ассоциированный с опухолью в клетках рака молочной железы. G3BP присутствует во внеклеточном матриксе нескольких тканей, в клеточной среде опухоли, в молоке и сыворотке. Было показано, что это олигомер с молекулярной массой > 1000 кДа G3BP. Как ранее указывалось, его экспрессия происходит при раке поджелудочной и молочной железы, а также при раке легких. Повышенный уровень G3BP связан с плохой выживаемостью и метастазированием в печень. Кроме того, при I стадии немелкоклеточного рака легких экспрессия G3BP составляет примерно 30%, и она означает значительно худший прогноз. Поэтому G3BP считается опухолевым маркером для данных видов рака, однако его функции еще до конца не изучены. G3BP высоко гликозилирован и взаимодействует с компонентами внеклеточного матрикса, такими как фибронектин и бета-1-интегрин, но не с коллагеном I. Соответственно, мы предположили, что G3BP является посредником клеточной фибронектин-адгезии, взаимодействуя с бета-1-интегрином и фибронектином.

(-)-DHMEQ ингибирует как TNF-альфа-индуцированную экспрессию G3BP, так и клеточную адгезию в линии T47D человеческих клеток рака молочной железы. Нами было обнаружено, что снижение G3BP подавляло адгезию, а его избыточная экспрессия адгезию увеличивала. Таким образом, NF-каппа-B увеличивает экспрессию G3BP, а G3BP увеличивает адгезию клеток карциномы молочной железы T47D с фибронектином [7]. Повышенная адгезия с фибронектином усиливает активность метастатических раковых клеток.

Ингибирование метастатических очагов при помощи DHMEQ in vivo

Недавно исследовательская группа Ю. Сузуки сообщила, что DHMEQ ингибирует метастазы у животных, при этом используется только DHMEQ или DHMEQ в комбинации с известным противораковым средством [10]. Известно, что активация

These data imply that (-)-DHMEQ suppressed ovarian cell invasion via inhibition of the NF-kappa B-regulated autocrine system of CXCL12/CXCR4 (6, Fig. 4).

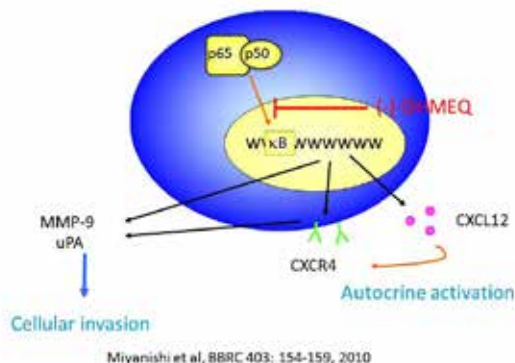


Рис. 4. Инвазия клеток карциномы яичника RMG1 (CXCL12/CXCR4 выступает в качестве медиатора) и ингибирование при помощи (-)-DHMEQ
Fig. 4. CXCL12/CXCR4-mediated ovarian carcinoma RMG1 cell invasion and inhibition by (-)-DHMEQ

Inhibition of breast cancer cell adhesion by (-)-DHMEQ mediated by galectin-3-binding protein

Galectin-3-binding protein (G3BP) is a secretory glycoprotein of 90K, which was originally identified as a tumor-associated antigen in breast cancer cells. G3BP is present in the extracellular matrix of several tissues, tumor cell medium, milk, and serum; and it was shown to be an oligomer with a molecular mass of >1000 kDa. G3BP was reported to be expressed in pancreatic, breast, and lung cancers. Elevated levels of G3BP are associated with a poor survival and metastatic spread to the liver. Also, G3BP is expressed in about 30% of stage 1 non-small cell lung cancers; and its expression is associated with a significantly worse outcome. Therefore, G3BP is considered to be a tumor marker for these cancers; but its functions are not yet well understood. G3BP is extensively glycosylated and interacts with extracellular matrix components such as fibronectin and beta 1-integrin, but not with collagen I. Accordingly, we hypothesized that G3BP mediates cell-fibronectin adhesion by interacting with beta 1-integrin and fibronectin.

(-)-DHMEQ inhibited both TNF-alpha-induced G3BP expression and cell adhesion in T47D human breast cancer cell line. We also found that knockdown of G3BP suppressed the adhesion and that overexpression of it increased the adhesion. In conclusion, NF-kappa-B increases the expression of G3BP and G3BP increases the adhesion of breast carcinoma T47D cells to fibronectin (7, Fig. 5). Increased adhesion to fibronectin should enhance the metastatic activity of cancer cells.

Inhibition of metastasis in vivo by DHMEQ

Recently, Suzuki and co-workers has reported that DHMEQ inhibits a metastasis model in animals, by DHMEQ alone or combination with a known anticancer agent (10, Fig. 6). Activation of NF-kappa-B is known to be implicated in metastasis of pancreatic cancer.

NF-каппа-B вовлечена в процесс метастазирования рака поджелудочной железы. Ученые группы Ю.Сузуки исследовали влияние DHMEQ на ингибирование метастазов в печень при раке поджелудочной железы в мышинной модели клинических метастазов печени. На «голых» мышах при помощи минилапаротомии была произведена ксенотрансплантация путем введения в воротную вену инъекции клеточной линии AsPC-1 аденокарциномы поджелудочной железы человека. Лечение мышей проводилось DHMEQ и гемцитабином, по отдельности или в комбинации. Комбинация гемцитабина и DHMEQ показала более сильное противоопухолевое действие, чем использование препаратов по отдельности. Индукция апоптоза в метастатических очагах была больше в группе DHMEQ + гемцитабин. Значительное сокращение численности новых сосудов было также отмечено в группе DHMEQ и/или гемцитабин. Анализы ингибирования клеточного роста не выявили синергетический эффект комбинированной терапии, хотя каждая монотерапия дала индивидуальный цитотоксический эффект. Как показал анализ, комбинированная терапия произвела наибольшее ингибирование инвазивности раковых клеток. Кроме того, комбинированная терапия значительно понизила и отрегулировала уровень экспрессии матриксных металлопротеиназ (MMP) -9 mRNA в AsPC-1 клетках. DHMEQ также заметно подавил IL-8 и ММП-9, в то время как гемцитабин вызвал умеренное снижение экспрессии фактора роста эндотелия сосудов в метастатических очагах, о чем свидетельствует проведенный количественный ПЦР с обратной транскрипцией. Эти результаты показывают, что DHMEQ может оказывать противоопухолевое действие как ингибируя ангиогенез и инвазию клеток опухоли, так и путем индукции апоптоза. Комбинированная терапия DHMEQ + гемцитабин также показала потенциальную эффективность. Таким образом, DHMEQ может являться перспективным препаратом для лечения рака поджелудочной железы.

Ингибирование клеточной инвазии и индукция апоптоза в мышинных клетках меланомы при помощи препарата DTCM-G

Метастатическая активность раковых клеток часто коррелирует с активностью клеточной инвазии. Меланома кожи является одной из наиболее злокачественных опухолей человека и обладает высокой метастатической способностью. Мышечные клетки меланомы B16 часто используются для анализа метастазирования и инвазии, так как обладают высокой инвазивной активностью *in vivo* и *in vitro*. Путем ряда последовательных экспериментов на животных нами была выбрана клеточная линия B16-F10 в качестве высоко метастатической клеточной линии. С одной стороны, апоптоз является одной из форм апоптоза, вызванного недостаточной или ненадлежащей связью клеточного матрикса. Апоптоз имеет важное значение для регулирования тканевого гомеостаза в ремоделировании ткани, развития, а также для процесса

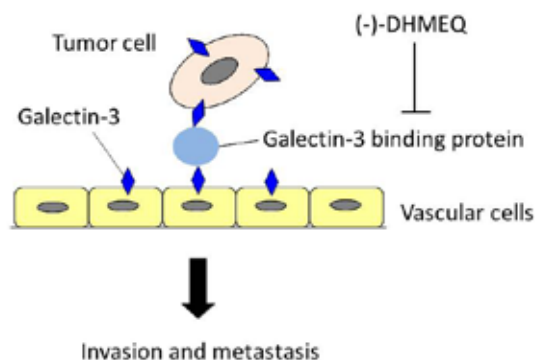


Рис. 5. Галектин-3 связывающий белок (G3BP) объединяет опухолевые клетки и клетки сосудов для повышения метастазирования опухоли. (-)-DHMEQ снижает экспрессию G3BP

Fig. 5. Galectin-3 binding protein (G3BP) combines tumor cells and vascular cells to enhance tumor metastasis. (-)-DHMEQ lowers G3BP expression

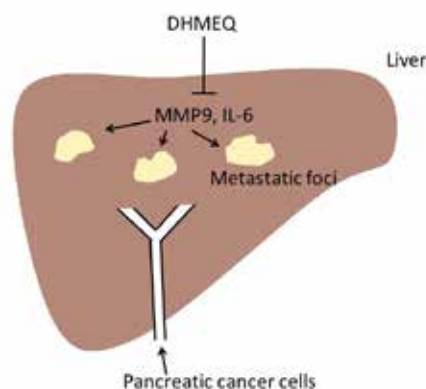


Рис. 6. Ингибирование метастазов в печень клеток AsPC-1 карциномы поджелудочной железы у крыс при помощи DHMEQ путем уменьшения экспрессий MMP-9 и IL-6

Fig. 6. Inhibition of liver metastasis of pancreatic carcinoma AsPC-1 cells by DHMEQ decreasing MMP-9 and IL-6 expressions in rats

They investigated the effects of DHMEQ on the inhibition of liver metastasis of pancreatic cancer in a mouse model of clinical liver metastasis. Nude mice were xenografted by intra-portal vein injection with the human pancreatic adenocarcinomas cell line AsPC-1 via small laparotomy. Mice were treated with DHMEQ and gemcitabine, alone or in combination. The combination of gemcitabine and DHMEQ showed a stronger antitumor effect than either monotherapy. Apoptosis induction in the metastatic foci was greatest in the DHMEQ + gemcitabine group. Significant reductions in the numbers of neovessels were also seen in the DHMEQ and/or gemcitabine groups. Cell growth inhibition assays revealed no synergistic effect of combination therapy, although each monotherapy had an individual cytotoxic effect. Combination therapy produced the greatest inhibition of tumor cell invasiveness in chemoinvasion assay. In addition, combination therapy significantly down-regulated the expression level of matrix metal-

метастазирования. Поэтому принято считать, что приобретение резистентности к апоптозу является важным фактором для «успешного» метастазирования раковых клеток. Поэтому препараты, индуцирующие апоптоз, могут стать новым противометастатическим средством. Как и при обычном апоптозе, апоптоз усиливается Bax, а тормозится Bcl-X L и другими белками, ингибирующими апоптоз. p53 особенно важен для индукции апоптоза. Деятельность p53 регулируется ингибирующим его белком MDM2. Нами была изучена антиметастатическая активность DTCM-G, при этом обнаружено, что он ингибирует инвазию клеток B16-F10 и индуцирует апоптоз в клетках B16-F10 [16].

Нами была произведена оценка противометастатической активности этого препарата с использованием клеток мышиной меланомы B16-F10. При анализе в камере Matrigel DTCM-G ингибировал клеточную инвазию путем снижения экспрессии матричной металлопротеиназы 9 (MMP9). Он также индуцировал апоптоз, а не апоптоз в пластинах с покрытием polyHEMA. Он увеличил Bax и снизил экспрессию Bcl-X L. DTCM-G также активировал p53, снизив экспрессию MDM2. Таким образом, нами было обнаружено, что DTCM-G ингибирует клеточную инвазию и индуцирует апоптоз в клетках B16-F10 [1]. Данный препарат нетоксичен и прост в изготовлении. Таким образом, он может считаться новым кандидатом на роль противометастатического препарата.

Благодарности

Работа, описанная выше, была частично поддержана грантами, полученными по программе «Grants-in-Aids in Scientific Research (B)» Министерства образования, культуры, спорта, науки и технологии Японии (MEXT), а также средствами из Фонда Стратегических Исследований в частных университетах при поддержке MEXT, которые были выделены Медицинским университетом города Аичи на 2011-2015 годы (S1101027).

Список литературы

1. Канада А., Ганцев Ш.Х., Умезава К.. Ингибирование клеточной инвазии и индуцирование апоптоза в клетках меланомы у мышей при помощи противовоспалительного препарата DTCM-глутарамида // Креативная хирургия и онкология. – 2012. – №3. – С. 4-9.
2. Ariga A., Namekawa J., Matsumoto N. et al. Inhibition of TNF-induced nuclear translocation and activation of NF- κ B by dehydroxymethyl-epoxyquinomicin // J. Biol. Chem. - 2002. – Vol. 277. – P. 27625-27630.
3. Ishikawa Y., Tachibana M., Matsui C., et al. Synthesis and biological evaluation on novel analogs of 9-methyl-streptimidone, an inhibitor of NF- κ B. Bioorg // Med. Chem. Lett. - 2009. – Vol. 19. – P. 1726-1728.
4. Hamada M., Niitsu Y., Hiraoka C., et al. Chemoenzymatic synthesis of (2S,3S,4S)-form, the physiologically active stereoisomer of dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a potent inhibitor on NF- κ B // Tetrahedron. - 2010. – Vol. 66. – P. 7083-7087.

loproteinase (MMP)-9 mRNA in AsPC-1 cells. DHMEQ also markedly down-regulated IL-8 and MMP-9, while gemcitabine caused moderate down-regulation of vascular endothelial growth factor in metastatic foci, demonstrated by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. These results demonstrate that DHMEQ can exert anti-tumor effects by inhibiting angiogenesis and tumor cell invasion, and by inducing apoptosis. Combination therapy with DHMEQ and gemcitabine also showed potential efficacy. Thus, DHMEQ may be a promising drug for the treatment of advanced pancreatic cancer.

Inhibition of cellular invasion and induction of anoikis in mouse melanoma cells by DTCM-G

Metastatic activity of cancer cells often correlates with the activity of cellular invasion. Melanoma, a common skin cancer, is one of the most malignant cancers with the high metastatic ability. Mouse melanoma B16 cells are often used for the metastasis and invasion analysis because of potent invasion activity in vitro and in vivo. The B16-F10 cell line has been selected as the highly metastatic cell line by successive animal experiments. In one hand, anoikis is the subset of apoptosis triggered by inadequate or inappropriate cell-matrix contacts. Anoikis is essential for the regulation of tissue homeostasis in tissue remodeling, development, and also tumor metastasis, so that the acquisition of anoikis resistance is considered to be important for achieving the successful metastasis for cancer cells. Therefore, anoikis inducing agents may become new anti-metastasis agents. Similar to common apoptosis, anoikis is enhanced by Bax and inhibited by Bcl-XL and other apoptosis inhibitory proteins. Especially, p53 was shown to be an important factor to induce anoikis. The p53 activity is regulated by its inhibitory protein MDM2. We studied the anti-metastatic activity of DTCM-G, and found that it inhibited B16-F10 cell invasion and induced anoikis in B16-F10 cells (1, Fig. 7).

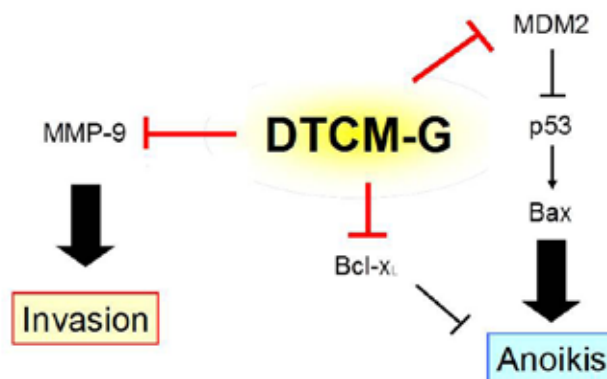


Рис. 7. Сигнальный путь для ингибирования клеточной инвазии и индукции апоптоза при помощи DTCM-G в клетках B16-F10 мышиной меланомы

Fig. 7. Signaling pathway for inhibition of cellular invasion and induction of anoikis by DTCM-G in mouse melanoma B16-F10 cells

5. Matsumoto N., Ariga A., To-e S., et al. Synthesis of NF-KB activation inhibitors derived from epoxyquinomicin C. *Bioorg // Med. Chem. Lett.* - 2000. - Vol. 10. - P. 865-869.

6. Miyanishi N., Suzuki Y., Simizu S., et al. Involvement of autocrine CXCL12/CXCR4 system in the regulation of ovarian carcinoma cell invasion // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2010. - Vol. 403. - P. 154-159.

7. Noma N., Simizu S., Kambayashi Y., et al. Involvement of NF-KB-mediated expression of galectin-3-binding protein in tumor necrosis factor-induced breast cancer cell adhesion // *Oncology Reports.* - 2012. - Vol. 27. - P. 2080-2084.

8. Shibasaki S., Yamashita K., Goto R., et al. Immunosuppressive effects of DTCM-G, a novel inhibitor of the mTOR downstream signaling pathway // *Transplantation.* - 2013. - Vol. 95. - P. 542-550.

9. Shimada C., Ninomiya Y., Suzuki E., Umezawa K. Efficient cellular uptake of the novel NF-KB inhibitor (-)-DHMEQ and irreversible inhibition of NF-KB in neoplastic cells // *Oncology Research.* - 2010. - Vol. 18. - P. 529-535.

10. Suzuki K., Aiura K., Matsuda S., et al. Combined effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin and gemcitabine in a mouse model of liver metastasis of pancreatic cancer // *Clinical & Experimental Metastasis.* - 2013. - Vol. 30. - P. 381-392.

11. Suzuki Y., Sugiyama C., Ohno O. and Umezawa K. Preparation and biological activities of optically active dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel NF-KB inhibitor // *Tetrahedron.* - 2004. - Vol. 60. - P. 7061-7066.

12. Takeiri M., Ota E., Nishiyama S., et al. Structure-activity relationship of 9-methylstreptimidone that induces selective apoptosis in adult T-cell leukemia cells // *Oncology Res.* - 2012. - Vol. 20. - P. 7-14.

13. Takeiri M., Tachibana M., Kaneda A., et al. Todo and K. Umezawa: Inhibition of macrophage activation and suppression of graft rejection by DTCM-glutarimide, a novel piperidine derived from the antibiotic 9-methylstreptimidone. // *Inflammation Research.* - 2011. - Vol. 60. - P. 879-888.

14. Umezawa K. Possible role of peritoneal NF-KB in peripheral inflammation and cancer: Lessons from the inhibitor DHMEQ // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* - 2011. - Vol. 65. - P. 252-259.

15. Wang Z., Igarashi M., Ikeda Y., et al. Inhibition of NF-kappaB activation by 9-methylstreptimidone isolated from *Streptomyces* // *Heterocycles.* - 2006. - Vol. 69. - P. 377-383.

16. Yamamoto M., Horie R., Takeiri M., et al. Inactivation of nuclear factor kappa B components by covalent binding of (-)-dehydroxymethylepoxyquinomicin to specific cysteine residues // *J. Med. Chem.* - 2008. - Vol. 51. - P. 5780-5788.

We evaluated the anti-metastatic activity of this agent using mouse melanoma B16-F10 cells. DTCM-G inhibited the cellular invasion in the Matrigel chamber assay, lowering the matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression. It also induced anoikis rather than apoptosis in polyHEMA-coated plates. It increased Bax and decreased Bcl-XL expressions, and activated p53 lowering the MDM2 expression. Thus, DTCM-G was found to inhibit cellular invasion and to induce anoikis in B16-F10 cells (1). It is non-toxic, and easily prepared, therefore, is considered to be a new candidate of anti-metastasis agent.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from the programs Grants-in-Aids in Scientific Research (B) of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) of Japan, and from the MEXT-supported Program for the Strategic Research Foundation at Private Universities, which is for Aichi Medical University 2011-2015 (S1101027).