

## 論文の内容の要旨

論文題目 解糖系代謝酵素グリオキサラーゼ I を標的とした癌のアポトーシス誘導療法に関する研究

指導教官 鶴尾 隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 坂本 洋

### 序論

臨床で使用されている多くの抗癌剤はアポトーシスを誘導することがその作用機序として知られている。有効性の高い抗癌剤の開発は、アポトーシスという現象をうまく利用していかに治療に結び付けられるかがキーとなってくる。しかしながら、実際癌細胞の多くは抗癌剤が誘導するアポトーシスに対して抵抗性を示すことがあり、癌の特性を理解したうえで新たな治療薬の分子標的を見極めていく必要がある。

本研究において、抗癌剤によるアポトーシス誘導を制御する因子として、グリオキサラーゼ I (GLO1)を見い出した。そこで、その機能およびこれを標的とした薬剤である GLO1 阻害剤の有効性を検討した。

### 1、抗癌剤誘導によるアポトーシス耐性細胞株で高発現している GLO1 の解析

癌細胞におけるアポトーシスシグナル伝達の異常は癌化学療法による耐性化と密接な関係があると考えられる。抗癌剤誘導によるアポトーシス誘導機序およびそれを抑制的に制御する耐性機構を解明するために、当研究室ではこれまでに、ヒト白血病細胞 U937 から種々のアポトーシス誘導刺激に対して抵抗性を示す複数の変異細胞株を樹立してきた。これらのうち UK711 細胞は、エトポシド (VP-16) やアドリアマイ

シン (ADM) など複数の抗癌剤に対してアポトーシス耐性を示す (Fig. 1A)。

UK711 細胞は、今までに報告されてきた *MDR* や *MRP* のような薬剤耐性遺伝子の発現や抗癌剤標的分子となる topoisomerase I、II の発現、あるいはアポトーシス関連遺伝子 (*p53*、*bcl-2*、*c-myc*) の発現の変化は認められなかった。そこで、U937、UK711

の両細胞から mRNA を調製し、cDNA subtraction 法に従い、UK711 細胞で発現変化が認められる遺伝子の同定を行った。その結果、アポトーシス耐性細胞 UK711 で過剰発現している遺伝子として、解糖系における副生成物メチルグリオキサールを消去する酵素 *GLO1* 遺伝子を同定した (Fig. 1B)。GLO1 酵素活性の亢進は UK711 細胞だけでなく、その他の薬剤耐性を示す細胞株においても認められた。GLO1 の亢進が認められる変異細胞株は抗癌剤処理後に生き残ってきた細胞集団であるということから、GLO1 は抗癌剤耐性化に関わる遺伝子の一つであることが示唆された。

次に、GLO1 の機能を直接示すために、GLO1 をコードする cDNA をベクターに組み込み、これを Jurkat 細胞に導入し、過剰発現による影響を検討した。その結果、GLO1 遺伝子を一過性に過剰発現させた細胞集団は空ベクターを導入したコントロールと比較して、ADM や VP-16 によって誘導されるアポトーシスに対して、有意に耐性を示し (Fig. 2A)、薬剤処理後の caspase の活性化を抑制した (Fig. 2B)。

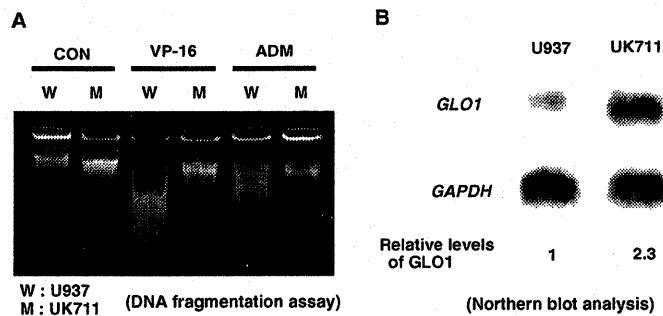


Fig. 1 Overexpression of GLO1 in apoptosis resistant UK711 cells.

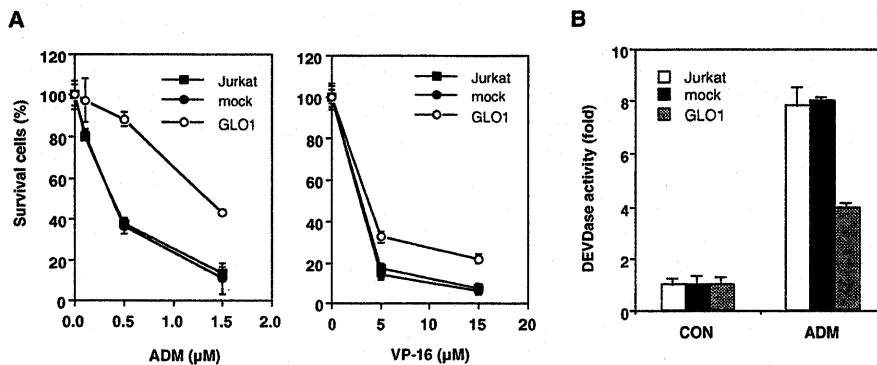


Fig. 2 Effect of overexpression of GLO1 on antitumor agent-induced apoptosis.

さらに GLO1 の阻害剤を用いて、抗癌剤に対して抵抗性を示す細胞で認められる GLO1 の活性亢進を抑えることでその耐性を克服できるかを検討した。細胞浸透性の GLO1 阻害剤として、最近報告された *S-p*-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester (BBGC) を使用した。BBGC による抗癌剤 VP-16 との併用は、BBGC の濃度依存的に抗腫瘍効果を高めた (Fig. 3)。

特に、これらの効果は親株 U937 細胞に比べ、GLO1 の過剰発現しているアポトーシス耐性変異細胞株 UK711 細胞で顕著に認められた。

以上の結果から、GLO1 は抗癌剤によるアポトーシス耐性因子の一つであり、GLO1 阻害剤 BBGC は抗癌剤耐性を克服する効果的な化合物であることが示唆された。

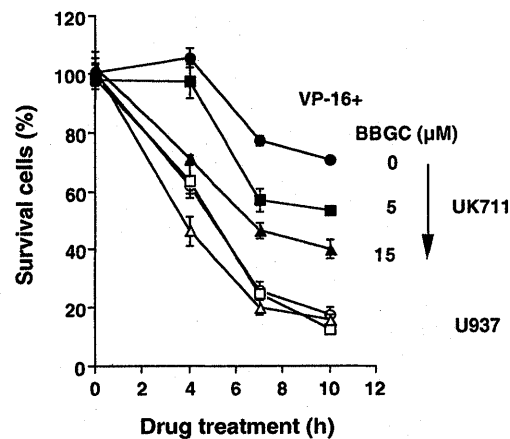


Fig. 3 Effect of BBGC on sensitivity of U937 and UK711 cells to VP-16.

## 2、ヒト肺癌細胞株における GLO1 阻害剤 BBGC の選択的アポトーシス誘導

上記の結果より、GLO1 阻害剤 BBGC が抗癌剤に対してアポトーシス耐性な白血病細胞の感受性を増強する薬剤として有効であることを明らかにした。GLO1 阻害剤はヒト白血病細胞株で、単独処理においてもアポトーシスを誘導し、抗腫瘍作用をもつことが報告されているが、一般的に薬剤感受性の低い固形癌細胞での効果、またそのメカニズムに関しては不明である。38 種のヒト固形癌細胞株において GLO1 の酵素活性を測定したところ、肺癌細胞で高頻度に高い GLO1 活性を示した (Fig. 4)。

GLO1 阻害剤 BBGC による抗腫瘍効果をヒト肺癌細胞株で検討したところ、GLO1 活性の高い細胞株ほど感受性が高く、アポトーシスを誘導しやすいことを明らかにした。また、BBGC の誘導す

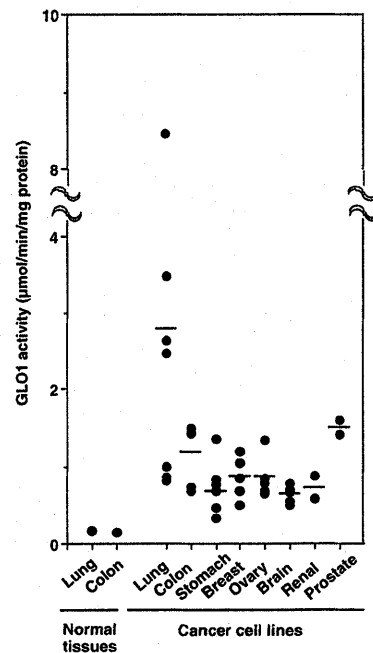


Fig. 4 GLO1 enzyme activity.

るアポトーシスは c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) や p38 MAPK といった

stress-activated protein kinase や caspase の活性化に依存していることが明らかとなった。

次に、GLO1 の高発現しているヒト肺癌細胞 DMS-114 やヒト前立腺癌細胞 DU145 をヌードマウスに移植した Xenograft を作成し、*in vivo* での BBGC の抗腫瘍効果を検討した。その結果、コントロール群と比較して、BBGC (100 mg/kg/d) を 9 日間連続投与した群ではマウスに対してほとんど毒性（体重減少）を与えずに、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた (Fig. 5)。

以上のことから、GLO1 阻害剤は肺癌細胞株のように GLO1 の活性亢進が認められる癌細胞を標的とした効果的な治療薬剤となりうることが示唆された。

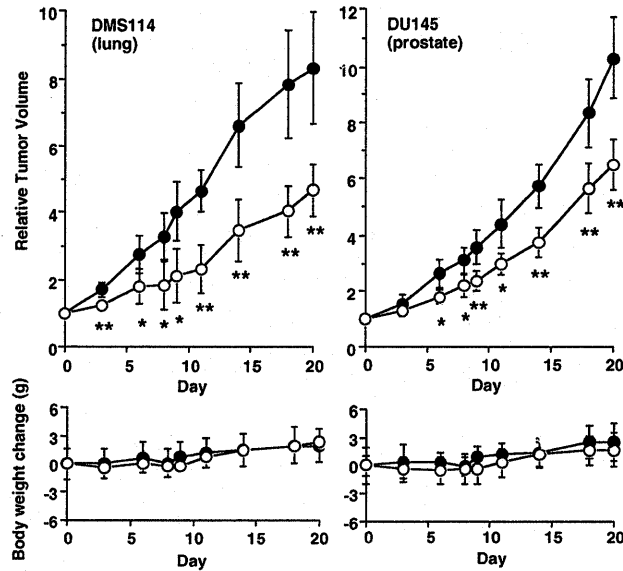


Fig. 5 Effect of BBGC on tumor growth and body weight change in nude mice bearing human cancer xenografts.

\*;  $P < 0.05$ , \*\*;  $P < 0.01$

## 総括

本研究において、GLO1 が抗癌剤によるアポトーシスシグナルのモジュレーターであり、また新規抗癌剤のターゲット分子であることを見出した。GLO1 阻害剤の薬剤感受性パターンは既存の抗癌剤のものとは異なっており、ユニークな作用機序をもった抗癌剤となりうるかもしれない。GLO1 は大腸や前立腺などの臨床組織サンプルにおいても、正常組織に比べて腫瘍組織で高い酵素活性を示すことが報告されていることから、癌治療における標的分子として適しており、今後、さらなる特異性の高い GLO1 阻害剤の開発が期待される。

## 文献

- (1) Sakamoto, H. *et al. Blood* 95, 3214-3218 (2000)
- (2) Sakamoto, H. *et al. Clin. Cancer Res.* 7, 2513-2518 (2001)