

## 論文の内容の要旨

論文題目                Reversal of Stress-induced Drug Resistance in Solid  
                                  Tumor by Proteasome Inhibition

和訳                         プロテアソーム阻害による固形癌のストレス誘導性抗癌剤耐性の克服

指導教官    鶴尾 隆 教授

東京大学医学系研究科

平成10年4月 進学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名            雷書紅

### 序

胃癌、大腸癌などの固形癌は、一般に抗癌剤による治療に抵抗性を示す。そのため耐性克服法の開発は、がん治療成績の向上において重要な課題となっている。固形癌の薬剤抵抗性の大きな原因として、異常な血管形成による低酸素状態やグルコース飢餓状態などの特殊な内部環境がある。実際癌細胞は、こうしたストレス環境下でトポイソメラーゼ (トポ) II を標的とするエトポシドなど、種々の抗癌剤に耐性を示す。トポ II 標的抗癌剤の殺細胞作用にはトポ II $\alpha$ の高レベルでの発現が重要であるが、ストレス下ではトポ II $\alpha$ の発現量が低下し、耐性が誘導されることが示されている。さらに、このトポ II $\alpha$ の発現低下は、分解の亢進によるものであり、蛋白分解酵素プロテアソームの阻害剤によって抑制され、また耐性誘導も抑制されることが明らかになってきた。こうした研究などから、プロテアソームは固形癌治療の新たな標的として考えられてきており、耐性克服のための新たな阻害剤の開発が期待されている。そこで本研究において私は、新規プロテアソーム阻害剤についてストレス誘導耐性の克服作用を中心に検討した。また新たな耐性克服の標的としてヘムオキシゲナーゼ1についても検討を加えた。

### 方法と結果

無細胞系での新規プロテアソーム阻害剤の評価                新規プロテアソーム阻害剤として Belactosin A (分子量 369.42) とその誘導体 KF33955 (分子量 459.55)、KF64586 (分子量 608.74) を用いた。まず、これらの化合物の精製 20S プロテアソームに対する阻害活性を比較した。プロテアソーム活性は蛍光基質 Suc-LLVY-MCA を用い測定した。その結果、Belactosin A が最も阻害活性が弱く、KF33955、KF64586 の順に阻害活性が強くなることが明らかになった (図 1)。また、HT-29 細胞の核抽出液中プロテアソーム活性に対しても、同様に Belactosin A < KF33955 <

KF64586 の順に阻害活性が強かった。

#### 新規プロテアソーム阻害剤によるストレス誘導性耐性の抑制

新規プロテ

アソーム阻害剤 Belactosin A、KF33955、KF64586 について、ヒト大腸癌細胞株 HT-29 細胞を用い、ストレス下でのトポ II 標的抗癌剤耐性の誘導に対する影響を比較した。なお、細胞毒性については、コロニー形成法にて測定した。グルコース飢餓環境下では、通常培養条件下と比較して、エトポシドに対して耐性を示した (図 2)。10  $\mu$ M の KF33955 存在下では、この耐性誘導は顕著に抑制され、グルコース飢餓環境下においてもエトポシドに感受性を示すようになった (図 2-a)。同様にトポ II 標的抗癌剤のドキソルピシンの耐性も顕著に抑制された (図 2-b)。KF64586 も同様の耐性誘導の抑制効果を示したが、KF33955 と比較してむしろ弱かった。また、Belactosin A についてはほとんど抑制効果を示さなかった。また他の癌細胞株 A2780 (卵巣癌) を用いても同様であった。

次に、トポ II  $\alpha$  の発現に及ぼす効果を比較した (図 3)。グルコース飢餓環境下にある HT-29 細胞では、トポ II  $\alpha$  の発現低下が認められるが、10  $\mu$ M の KF33955 存在下では、プロテアソームの選択的阻害剤ラクタシスチンと同様に、この分解がほぼ完全に抑制された。上記の耐性誘導の抑制効果とよく合致して、KF64586 によるトポ II  $\alpha$  分解の抑制は KF33955 に比べ弱く、Belactosin A は分解抑制効果をほとんど示さなかった。また、低酸素によって誘導されるトポ II  $\alpha$  の分解に対しても、やはり KF33955 が最も強く抑制した。さらに、他の癌細胞株 A2780 を用いても、やはり KF33955 による阻害活性が最も強力であった。以上より、無細胞系での結果と異なり、細胞レベルでのプロテアソーム阻害活性は KF33955 が最も強く、以下 KF64586、Belactosin A の順となることが明らかになった。

細胞レベルでのプロテアソーム阻害活性の違いをさらに確認するため、TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B の活性化に及ぼす影響について検討した。通常、細胞内では NF- $\kappa$ B は阻害蛋白 I $\kappa$ B によって抑制されているが、TNF- $\alpha$  刺激によって I $\kappa$ B のプロテアソーム依存的な分解が誘導され、その結果 NF- $\kappa$ B の活性化が起こることが知られている。レポーターアッセイにより検討したところ、KF33955 は TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B の活性化を濃度依存的に阻害したが、KF64586 による阻害はそれに比べて弱く、また Belactosin A はほとんど阻害しなかった。

以上の検討の結果、細胞レベルでのプロテアソーム阻害活性においては、KF33955 が最も優れていることが明らかになった。KF64586 の細胞に対する活性が弱い理由については、現在のところ不明であるが、細胞内への取り込みが低いこと、培地中での安定性が低いことなどが考えられる。今後こうした点を改良することによって、より強力な阻害剤が開発されることを期待したい。

ストレス誘導性耐性のヘムオキシゲナーゼ 1 阻害剤による抑制      プロテアソーム阻害剤 KF33955 による耐性誘導の阻害について、トポ II  $\alpha$  の分解抑制以外のメカニズムが関与しているかを明らかにするため、種々のタンパク質の発現変化を指標に検討した。その結果、耐性誘導の阻害と一致してプロテアソーム阻害剤 KF33955 はヘム分解酵素として知られているヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) の発現を誘導することが明らかになった。そこで、HO-1 の活性阻害作用を有し強力な HO-1 誘導剤として知られる ZnPP を用い検討した。ZnPP は、非ストレス下においてもまたグルコース飢餓ストレス下においても HO-1 の誘導活性を示したが、ストレス下では 20  $\mu$ M 以上で顕著な HO-1 誘導活性を示した (図 4a)。次にストレス誘導のエトポシド耐性に対する影響を調べたところ、ZnPP (20  $\mu$ M) は耐性誘導を顕著に阻害することが明らかになった (図 4b)。以上より、HO-1 の誘導を促すことにより、ストレス誘導耐性を抑制できる可能性が示唆された。しかし、そのメカニズムについては全く未知であり、さらなる研究が必要と考える。

#### まとめ

本研究において私は、ストレス誘導性耐性に対する新規プロテアソーム阻害剤の評価を行い、細胞レベルにおいて効果的に耐性誘導を抑制する化合物として KF33955 を見出した。また、プロテアソーム依存的なトポ II  $\alpha$  の分解以外の耐性メカニズムについて検討し、HO-1 阻害剤 ZnPP がストレスによる耐性誘導を顕著に抑制することを見出した。今後、これらの阻害剤の動物レベルでの評価や新たな阻害剤の開発、メカニズムの詳細の解明を通じ、プロテアソーム、HO-1 を標的とした固形癌の薬剤耐性克服法の応用につながることを期待される。

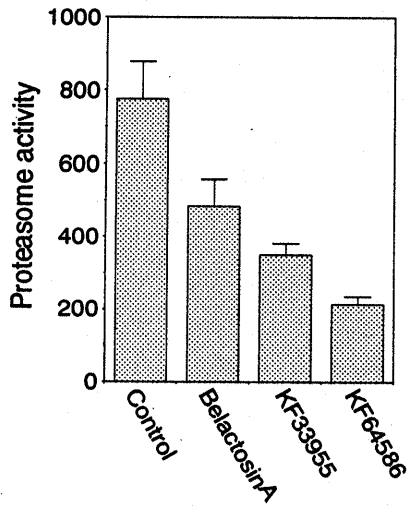


Fig.1 プロテアソームの活性阻害

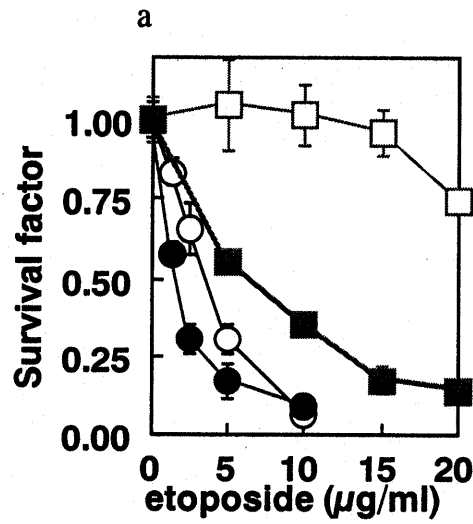
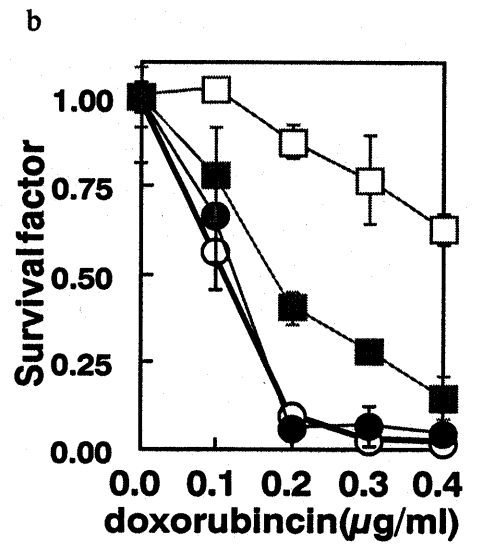


Fig.2 KF33955(KF2)によるストレス誘導耐性の抑制



○ Con.  
● Con.+KF33955  
□ Stress  
■ stress+KF33955

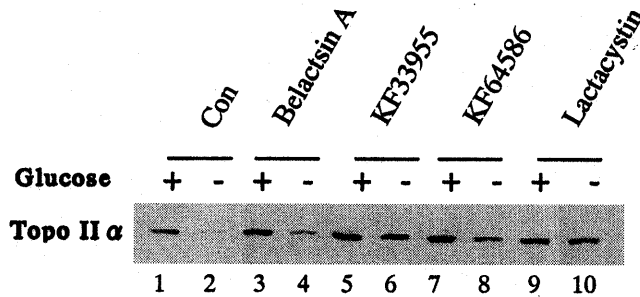


Fig.3 プロテアソーム阻害剤によるtopo II分解の抑制

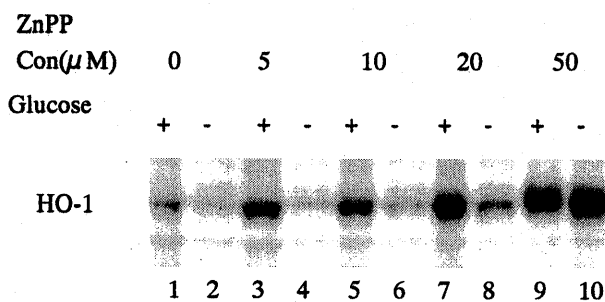


Fig.4a ZnPPによるHO-1の発現誘導

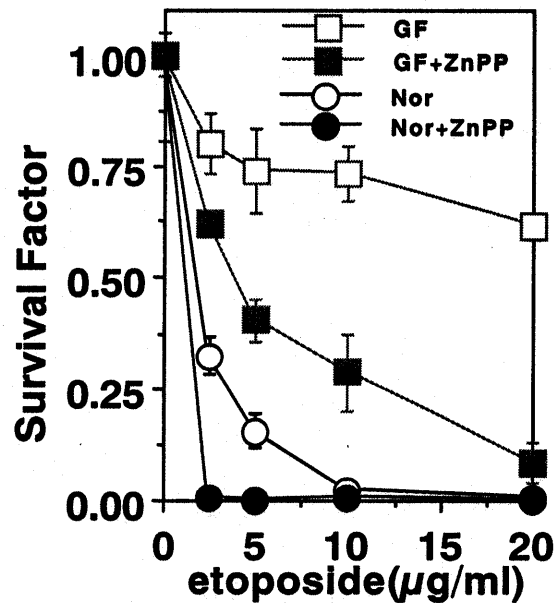


Fig.4b ZnPPによるストレス誘導耐性の抑制