

論文の内容の要旨

論文題目 Tumor Selective Suppression of Apoptosis by IAP in Human NSCLC and the Antitumor Effect of the Targeting Peptide

和 訳 ヒト非小細胞肺癌における IAP による癌選択的アポトーシス抑制とその標的ペプチドを用いた抗腫瘍効果の解析

指導教官 鶴尾 隆 教授

東京大学大学院医科系研究科

平成11年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 楊 莉玲

序論

肺癌は現在最も死亡率の高い悪性新生物の一つであり特に非小細胞肺癌はその中でも進行癌中でしばしば共通に見られる肺癌である。Taxol 及び cisplatin による治療法は進行した非小細胞肺癌の standard 治療薬として用いられているが、化学療法剤耐性はその有効な治療効果を妨げる主要の原因となっている。抗癌剤耐性はしばしば癌細胞におけるアポトーシス誘導性の低下と深く結び付いていることから、癌細胞における細胞死決定因子変化が化学療法の効果を決定する要因となっている可能性がある。アポトーシスの実行において、ミトコンドリアからの cytochrome c 放出によって活性化される Apaf-1/ caspase-9 複合体 (apoptosome) が中心的な役割を果たす。最近、この apoptosome の活性欠損がある種の癌細胞においても生じていることが報告されている。しかし、癌細胞におけるその活性欠損の機構および生理的意義については十分に明らかでない。本研究では化学療法剤に耐性なヒト非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞においてその抗癌剤耐性に apoptosome 活性低下が関与することを見出した。さらに NSCLC の apoptosome 活性低下における XIAP 分子の役割及びこれを標的とした新規細胞透過性ペプチドの治療効果について解析した。

1. ヒト非小細胞肺癌における apoptosome の活性低下と XIAP 発現亢進の関与

ヒト非小細胞肺癌における抗癌剤耐性とアポトーシス機構欠損を調べるために、ヒト非小細胞肺癌細胞株を用いてアポトーシス誘導性及びアポトーシス実行系である apoptosome 活性について調べた。その結果、ヒト非小細胞肺癌細胞 NCI-H460 細胞において cisplatin などの抗癌

剤に対するアポトーシスの耐性がアポトーシス実行系である apoptosome 低下と関わっていることを見出した。NCI-H460 細胞では、ヒト正常肺細胞 TIG3 および他の肺癌細胞と比較して *in vitro* における cytochrome c 依存的なカスパーゼの活性化が著しく低下していることが明らかになっ

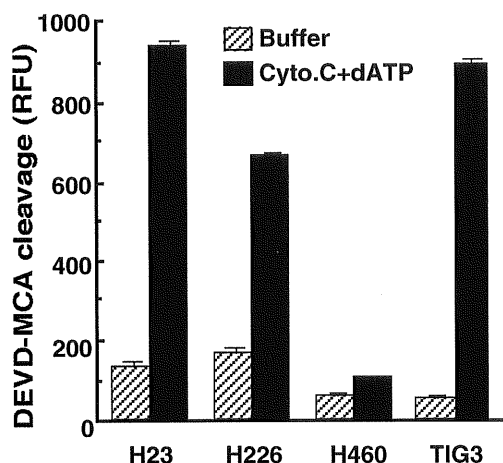


Figure 1. Chemoresistant H460 Cells Have a Diminished Apoptosome Activity.

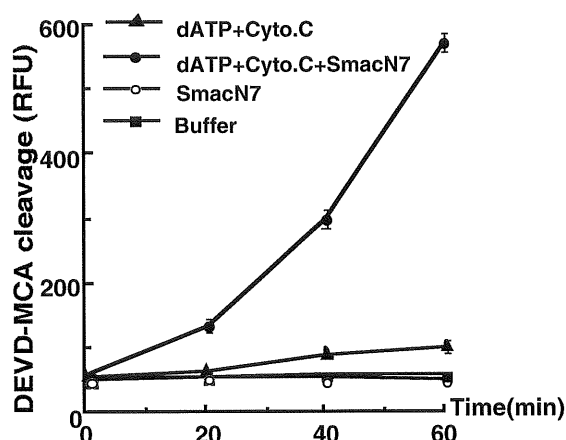


Figure 2. N-terminal Peptide of Smac Relieves XIAP Inhibition of Caspases and Reverses the Low Apoptosome Activity in H460 Cells.

た (Fig. 1)。この apoptosome 低下は apoptosome の構成因子である cytochrome c, Apaf-1, caspase-9 の発現低下によるものではなかった。細胞死制御因子の発現を網羅的に解析した結果、H460 細胞において IAP ファミリー分子の一つである XIAP が選択的に高発現にしていることを見出した。また H460 細胞においては、他の IAP 分子である c-IAP-1 の発現も認められたが、caspase-9 に対しては XIAP が選択的に結合していることがわかった。そこで IAP を特異的に阻害する SmacN7 ペプチドを用いて検討したところ、SmacN7 ペプチドは H460 細胞における apoptosome の活性の低下を強く回復させた (Fig. 2)。この際、XIAP と caspase-9 の H460 細胞における結合が阻害されることが分かった。他方、SmacN7 ペプチドは apoptosome 活性を保持している他のヒト非小細胞肺癌細胞やヒト肺正常細胞 TIG3 における apoptosome の活性には影響を与えなかった。以上の結果から H460 細胞において XIAP がアポトーシス実行系の低下に中心的な役割を果たしていると考えられた。H460 細胞株においては XIAP の過剰の発現を認められるが、他方、ヒト正常肺 TIG3 細胞においても低いレベルであるが XIAP 発現が認められる。そこでさらに Recombinant XIAP 蛋白を用いて apoptosome の阻害と XIAP の発現レベルとの関係について検討した。その結果、XIAP による apoptosome 阻害には量的閾値 (20 nM) が存在し、H460 細胞における XIAP の発現は apoptosome 阻害に十分である一方、ヒト正常肺 TIG3 細胞における XIAP の発現レベルは阻害の閾値以下であることが明らかになった。さらにヒト非小細胞肺癌における XIAP の発現レベルを調べるため、ヒト非小細胞肺癌 (扁平上皮癌および腺癌) 術後凍結材料 20 例における XIAP の発現を検討した。その結果、ヒト正常肺組織においては TIG3 細胞と同様に XIAP の発現レベルが低く閾値レベル以下であるのに対して、ヒト非小細胞肺癌 20 例中 13 例においては XIAP の発現レベルは H460 細胞株と同レベルでありこれらの

細胞において XIAP の過剰発現が apoptosis 阻害に関わっていることが示唆された (Fig. 3)。

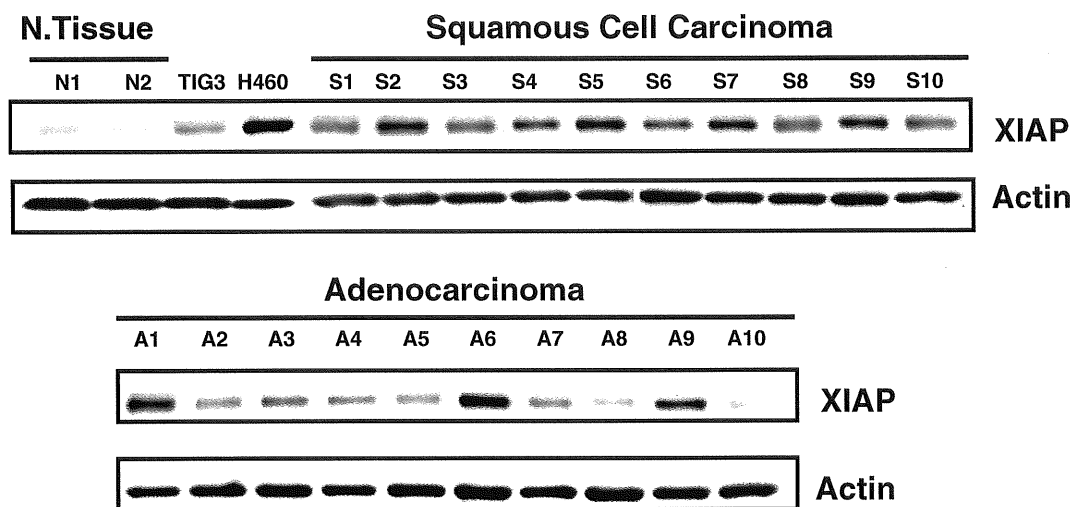


Figure 3. XIAP Expressions in Human NSCLC Patient Samples. N1 and N2 represent normal tissues from around the tumors. S1-10: squamous cell carcinomas; A1-10: adenocarcinomas.

以上の結果からヒト非小細胞肺癌において XIAP の発現がその化学療法剤耐性に重要な働きをしていることが明らかになった。また、XIAP による apoptosome 阻害には濃度的閾値が存在し、少なくともヒト正常肺組織においてはその発現レベルは阻害の閾値以下であることから、発現亢進のある癌細胞において XIAP が化学療法の選択的標的となりうるということが示唆された。

2. ヒト非小細胞肺癌における IAP を標的としたペプチドの抗腫瘍効果の検討

IAP を標的としたペプチドの抗腫瘍効果を検討するため細胞透過性のポリアルギニン結合型 SmacN7 ペプチドを合成した。FITC 標識ペプチドを合成して調べた結果、6 アルギニンおよび 8 アルギニン結合型の SmacN7 は共に複数の癌細胞に効率よく取り込まれ、特に 8 アルギニン結合型の SmacN7 (SmacN7 (R)8) がより効果的な細胞内蓄積を認めた (Fig. 4)。他方、ポリアルギニンを持たない SmacN7 については有意な細胞

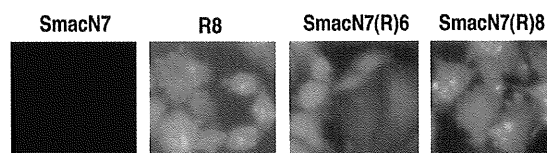


Figure 4. Fluorescence Microscopy Observation of the Polyarginine-conjugated SmacN7 Cellular Accumulation.

内蓄積は認められなかった。そこでさらに SmacN7 (R)8 の抗癌剤との併用効果を検討した。H460 細胞において cisplatin 及び taxol と併用した結果、これらの薬剤による細胞死誘導効果が SmacN7 (R)8 併用によって強く増強されることが分かった。この作用は XIAP による apoptosome 阻害が起きている H460 細胞に選択的であり、ヒト正常肺 TIG3 細胞に対しては認められなかった。また SmacN7 (R)8 単独及び細胞非透過性の SmacN7 ではその効果を認めなかった。さらにその

際のアポトーシス実行系の活性化を調べるため caspase の活性化を検討した。その結果、cisplatin と taxol 処理後の caspase-3 の活性が SmacN7(R)8 の併用によって強く上昇した。この際 caspase-3 の活性化型への processing が起こった。さらに H460 細胞をヌードマウスに移植した xenograft を作成し *in vivo* での SmacN7 (R)8 の抗腫瘍効果を検討した。その結果、cisplatin による腫瘍増殖抑制効果は SmacN7 (R)8 との併用によって強く増強された (Fig. 5A)。この際、コントロール群と比較して SmacN7 (R)8 と cisplatin を併用投与した群ではマウスに対して有意な体重減少は認められなかった (Fig. 5B)

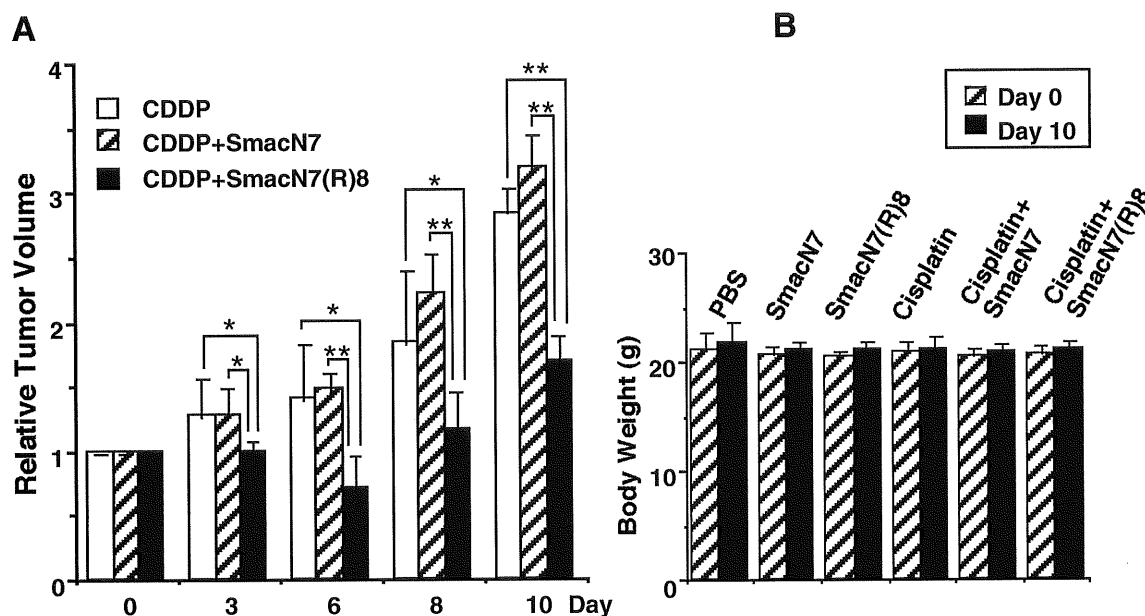


Figure 5. Effect of SmacN7(R)8 in combination with Chemotherapeutic Agent on Tumor Growth and Body Weight Change in Nude Mice Bearing Human Cancer Xenografts.

以上のことから IAP を標的とする細胞透過性の SmacN7(R)8 ペプチドが *in vitro* 及び *in vivo* において副作用を起こすことなくヒト非小細胞肺癌に対して抗癌剤との併用により腫瘍増殖抑制増強効果を示すことが明らかとなった。

結論

本研究においてはヒト非小細胞肺癌の化学療法剤耐性に XIAP の発現亢進とそれによる apoptosome 活性の阻害が関わっていることを明らかにした。Recombinant XIAP 蛋白を用いた検討の結果から XIAP によるアポトーシス実行系の阻害には濃度的な閾値が存在すること及びヒト正常肺組織では XIAP の発現レベルは閾値以下であることから XIAP が癌選択的な化学療法の標的分子として有効であるものと考えられる。さらに IAP を標的とする新しい細胞透過性ペプチド SmacN7 (R)8 を合成しそれが *in vitro* 及び *in vivo* においてヒト非小細胞肺癌の腫瘍増殖を抗癌剤との併用で有効に抑制することを見出した。今後さらに SmacN7 (R)8 ペプチドの構造および活性を mimic する低分子化合物を検索することにより、ヒト非小細胞肺癌に対する有効な化学療法剤の開発が期待される。