

論文の内容の要旨

論文題目 インドロカルバゾール系トポイソメラーゼ I 阻害剤に対する耐性メカニズムの研究

氏名 駒谷 秀也

抗がん剤治療を困難なものにしている大きな原因の一つとして、薬剤耐性という現象が知られており、薬剤耐性のメカニズムの究明と、それに基づいた薬剤耐性を克服するための新しい診断・治療法の開発が、強く望まれている。本研究は、抗がん剤として現在臨床開発中のインドロカルバゾール構造をもつトポイソメラーゼ I 阻害剤である、NB-506 及び J-107088 に対する耐性機構の解明を目的とし、これらの化合物に耐性を示す培養がん細胞や、薬剤接触によって樹立した耐性細胞株を用いた分子レベルでの解析を行った。

本研究では、まずインドロカルバゾール化合物に対する耐性機構として、細胞におけるこれらの化合物の蓄積量の違いに注目し、これらの薬物を細胞外に排出するメカニズムを明らかにし、その重要性を示唆した。この研究では 最初に、NB-506 に耐性を示す HeLa 細胞と NB-506 感受性の HeLaS3 細胞の比較から、HeLa 細胞において NB-506 蓄積量の低下と細胞外排出の上昇が起きていることを示し、薬剤の排出による NB-506 の耐性機構を示唆した。また HeLa 細胞は既存の抗がん剤には交差耐性を示さず NB-506 化合物に選択的耐性を示したことから、これらの排出機構が既存の多剤耐性因子と異なることが示唆された。さらに反転膜小胞を用いた実験から、HeLa 細胞膜上に NB-506 を ATP 依存に輸送する未知のトランスポーターの存在を示唆した。さらに、新たに樹立した耐性株における遺伝子発現の比較解析から、このインドロカルバゾール化合物の排出を行う分子の同定を試みる研究を行った。各種の培養がん細胞を NB-506 と持続接触することにより得られた NB-506 高度耐性細胞株は、インドロカルバゾール化合物に対して比較的選択的に耐性を示し、HeLa 細胞において観察されていたのと同様に薬剤蓄積の減少と強い排出

が示された。これらの細胞株の中から、マウス由来の LY/NR2 耐性株とその親株を選び、オリゴヌクレオチド・マイクロアレイを用いて耐性株選択的に発現上昇している遺伝子の探索を行った。その結果、耐性株 LY/NR2 株で最も選択的に発現が上昇している遺伝子として ABC トランスポーターである *BCRP/MXR/ABCP* (*BCRP*) 遺伝子が同定された。さらにこの遺伝子を肺がん細胞 PC-13 に導入した実験から、*BCRP* がインドロカルバゾール化合物を排出することにより細胞に耐性を付与することが証明された。この遺伝子は HeLa 細胞を含むすべての耐性株に過剰発現していることから、*BCRP* による排出がインドロカルバゾール耐性の重要なメカニズムであることが示唆された。

一方、本研究では排出とは異なるメカニズムによる耐性機構の解明を目的として、これら化合物の標的分子であるトポイソメラーゼ I に関連した変異を持つ耐性細胞の解析をも行った。ここでは、マウス白血病細胞である P388 より樹立した NB-506 耐性細胞である P388/F11 株の解析を行い、この細胞におけるトポイソメラーゼ I 活性の減少、NB-506 などの薬剤に対する感受性の低下を明らかにした。さらに、この細胞のトポイソメラーゼ I 遺伝子にリアレンジメントが生じ、その結果としてこの遺伝子の翻訳領域中の約 1.8kb の領域がタンデムに重複し、約 170kDa の変異型タンパクが発現していることを明らかにした。この変異型タンパクをバキュロウイルスを用いて発現させ精製タンパクの解析を行ったところ、この変異型トポイソメラーゼ I が酵素活性を有し、しかもこの変異型酵素の NB-506 やカンプトテシンに対する感受性が低下していることが明らかとなった。これらの結果から、遺伝子の重複によって生じた変異型トポイソメラーゼ I の耐性への関与が示され、遺伝子のリアレンジメントを伴う新しいトポイソメラーゼ I 阻害剤に対する耐性のメカニズムが示された。

以上より本研究では薬剤耐性細胞を用いた分子レベルの解析からインドロカルバゾール系トポイソメラーゼ I 阻害剤に対する二つの耐性機構を明らかにした。一つは ABC トランスポーターである *BCRP* による薬剤排出に基づいたメカニズム、もう一つは標的分子であるトポイソメラーゼ I のリアレンジメントを伴う変異による耐性現象である。

これらの2つの耐性メカニズムの解析結果は、将来的にインドロカルバゾール系抗がん剤を臨床の場において用いるにあたって、有用な情報を与えると思われる。まず、*BCRP* に関しては、今後臨床でのこの分子の発現を解析することにより、インドロカルバゾール系抗がん剤が有効であると思われるがん種の決定や、患者個人のレベルでこの遺伝子の発現にもとづいた診断に有用であると考えられる。また、トポイソメラーゼ I のリアレンジメントによる耐性機構のさらなる解析は、臨床におけるトポイソメラーゼ I 阻害剤投与による耐性獲得のメカニズムの理解にとって重要な知見を与える可能性があると考えられる。