

審査の結果の要旨

氏名 駒谷 秀也

抗癌剤に対する耐性がんの出現という現象はがん化学療法に対する重大な障害であり、薬剤耐性を回避・克服することは化学療法の改善にとって極めて重要な課題である。本研究ではトポイソメラーゼIを標的とした抗がん剤であるNB-506 や J-107088といった新規の抗がん剤に関しての耐性メカニズムを明らかにするために、分子レベルでの検討を行ったものである。これらの化合物は、既存のトポイソメラーゼI阻害剤と異なるインドロカルバゾール骨格を持ちその耐性機構は不明であったが、本研究によって2つの耐性機構が分子レベルで明らかになった。

1. NB-506排出分子の同定

最初の研究では、HeLa細胞がNB-506に強い耐性を示したことから、この細胞の耐性のメカニズムを明らかにするために、この細胞に比較的近縁で、かつNB-506感受性であるHeLaS3細胞を比較に用いて解析が進められた。その結果、HeLa細胞ではHeLaS3細胞に比較して、著しい細胞内薬剤蓄積量の低下を示し、さらにHeLa細胞においてNB-506をATPに依存して細胞外へ排出する活性が認められ、このエネルギー依存性のNB-506排出がHeLa細胞の耐性であることが示唆された。また、このHeLa細胞の耐性が、インドロカルバゾール化合物選択的であることから、既存の薬剤排出分子とは異なるメカニズムが想定された。

そこで、このNB-506の細胞内蓄積量をコントロールする原因遺伝子を明らかにする目的で新たに耐性細胞が樹立され、それらの耐性細胞において発現が選択的に上昇している遺伝子をスクリーニングすることによって、この薬剤の耐性因子の同定が試みられた。まず、複数の培養がん細胞からNB-506を持続接触することによって新たに耐性細胞が樹立された。これらの耐性細胞株であるPC-13/NR13、HCT116/NR1、LY/NR1、LY/NR2はいずれもNB-506及びJ-107088に選択的に高度耐性を示し、またHeLa細胞と同様に、薬剤蓄積の低下と排出の上昇が示された。次に、これらの耐性細胞株の中から、マウス由来の高度耐性株であるLY/NR2株とその親株であるLY株を選び、耐性細胞株及び親株における約30000の遺伝子発現をオリゴヌクレオチド・マイクロアレイを用いて比較し、NR2株において選択的に発現が増加している遺伝子の検索が行われた。その結果、NR2株で最も選択的に発現が上昇している遺伝子としてBCRP遺伝子が同定された。またノーザンブロットによる解析から、ヒト及びマウス由来のすべての耐性株、さらにHeLa細胞において選択的にこの遺伝子が過剰発現して

いることが明らかとなり、この分子と耐性現象との強い関連性が示された。

最終的に、このBCRP遺伝子がインドロカルバゾール化合物の排出分子であり耐性因子であることを証明する目的で、肺癌細胞PC-13にBCRP cDNAをトランスフェクトし、得られた安定発現株を用いた解析が行われた。その結果、BCRPを導入発現させたクローンでは明らかなインドロカルバゾール化合物耐性が示され、また薬剤排出の上昇が認められた。このデータからBCRPがインドロカルバゾール化合物の排出分子であり、耐性因子であることが証明された。

BCRPは1998年に単離されたABCトランスポーターに属する分子であり、抗癌剤であるミトキサントロン、トポテカンの耐性に関与しているという報告がなされていた。一方、本研究で用いたBCRPを導入したPC-13細胞株では、ミトキサントロンやトポテカンに対する耐性は示されず過去の報告とは異なっていた。興味深いことに、本実験で得られたBCRPの配列は過去の報告と一アミノ酸異なることが判明しており、このアミノ酸の違いが基質特異性に影響を及ぼし、異なる結果が得られている可能性も示唆された。

2.NB-506耐性細胞におけるトポイソメラーゼIのリアレンジメント

一方、本研究では、BCRPによる薬剤排出とは別に、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も見い出され、そのメカニズムに関する詳細な解析も行われた。

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株は、NB-506などの薬剤に対する感受性の低下が認められ、細胞内に異常なサイズを示すトポイソメラーゼIの転写産物及びタンパクが認められた。このトポイソメラーゼI分子の詳細な解析から、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が明らかとなった。さらに、この変異型トポイソメラーゼIは酵素活性を有し、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、バキュロウイルスで発現されたタンパクの解析から明らかとなった。

以上より、トポイソメラーゼI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。

これら2つの研究結果より、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が分子レベルで明らかとなった。効果的なマイクロ・アレイの活用で同定されたBCRPの研究については、今後臨床における分子診断にもとづいた抗がん剤感受性の予測や、耐性の克服といった発展が考え

られるばかりではなく、過去の報告とは異なる新規なBCRPの性質も見い出され、重要な研究結果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。

以上、この研究は抗がん剤を用いた治療の発展に有用な情報を与える価値のある研究であると考えられ、博士（薬学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。