

審査の結果の要旨

氏名 中 塩 文 子

アポトーシスは、多細胞生物が持っているホメオスタシス（恒常性）維持機構のひとつであり、不要になった細胞や有害となる細胞を除去する細胞消去の役割を果たしている。近年、多くの癌遺伝子や癌抑制遺伝子がアポトーシスシグナル伝達に関与していること、癌細胞はこのアポトーシスのシグナル伝達に何らかの異常をきたしていることが証明されつつある。抗がん剤による DNA 損傷は、癌細胞のアポトーシスシグナル伝達機構を活性化して細胞死を起こすことが明らかとなってきたが、抗がん剤によるアポトーシス誘導の分子機構の全容については、未だ明らかにされていない。抗がん剤の誘導するアポトーシスの感受性を規定する分子を同定し、その作用機構を分子レベルで明らかにすることは、より効果的な癌化学療法を考える上で重要である。

細胞の生死は拮抗するアポトーシス誘導シグナル量と生存シグナル量の相対的なバランスによって決定されており、アポトーシスにおける生存シグナルの重要性が最近明らかにされつつある。増殖因子刺激に伴い活性化される phosphatidylinositol-3' kinase (PI3K) の下流のエフェクターであるセリン/スレオニンキナーゼ Akt は、アポトーシス促進能をもつ Bad や caspase-9 などのリン酸化を介した不活性化によりアポトーシスを抑制し、生存シグナルの主要なメディエータとして近年注目されている。そこで、本研究では、topoisomerase I 阻害剤 topotecan の抗腫瘍効果における生存シグナルの役割について、PI3K-Akt 生存シグナル伝達経路を中心に検討した。

1. Topotecan によるヒト肺癌 A549 細胞におけるアポトーシスの誘導

1-1. ヒト肺癌 A549 細胞におけるアポトーシスの誘導

ヒト肺癌 A549 細胞を topotecan 処理したところ、topotecan の用量増加に伴い、cell viability の減少及び sub-G1 fraction の増加が認められ、アポトーシス誘導がみられた。また、様々な刺激によるアポトーシス誘導時に活性化され、アポトーシス実行過程の中心的な役割を果たすシステインプロテアーゼ caspase-3 の topotecan 処理による活性変化について検討した結果、topotecan 処理により A549 細胞では caspase-3 の活性化が認められた。一方、A549 細胞のカンプトテシン耐性株 A549/CPT 細胞は、topotecan に低感受性を示し、topotecan 処理による caspase-3 の活性化はみられなかった。

1-2. Topotecan による Akt 活性抑制作用

生存シグナルの主要メディエータである Akt に対する topotecan の作用について検討したところ、A549 細胞では、topotecan 処理により Akt の活性化体である phospho-Akt 量の減少及び Akt kinase 活性の抑制が認められた。一方、topotecan に低感受性を示す A549/CPT 細胞では、Akt 活性に変化はみられず、Akt は topotecan 感受性規定因子の一つである可能性が示唆された。さらに、Akt は I κ B kinase (IKK) のリン酸化を介した活性化により I κ B のリン酸化レベルを上昇させるこ

とから、topotecan 処理後の A549 細胞の phospho-I κ B 及び I κ B 量について調べたところ、topotecan 処理により phospho-I κ B 量の減少及び I κ B 量の増加がみられ、topotecan は細胞内においても Akt 活性を抑制していることが示唆された。

Topotecan による Akt 活性の抑制作用が topotecan で誘導される細胞死に寄与している可能性を検討するために、Akt の活性化型遺伝子を A549 細胞に遺伝子導入し、topotecan に対する感受性変化を検討した。その結果、constitutively active Akt (E40K, T308D/S473D) を過剰発現させることで、topotecan 処理後の cell viability が有意に上昇し、topotecan 感受性が低下していることが示唆された。このことから、topotecan で誘導される細胞死の一部は PI3K-Akt 生存シグナルの抑制を介していることが示唆された。

1-3. Topotecan による Akt 活性抑制メカニズム

Topotecan による Akt 抑制がアポトーシス誘導のどの時点で起こっているか検討するために、経時的解析を行ったところ、phospho-Akt 量の減少は topotecan 処理後 12 時間頃より、caspase-3 活性化は 24 時間頃よりみられ、Akt 抑制が caspase-3 活性化より時間的に先に起こることが示唆された。Topotecan による Akt 抑制が caspase 活性化の上流であることを確認するために、caspase 阻害剤を用いて検討した。その結果、caspase 阻害剤により、topotecan による caspase-3 活性化は抑制されたのに対し、Akt 抑制作用は影響を受けなかったことから、topotecan による Akt 活性抑制は caspase-3 活性化の上流に位置することが示唆された。

さらに、topotecan の Akt 抑制メカニズムについて検討を加えた。Akt の活性化には膜への移行及び膜近傍でのリン酸化が重要であることから、これらに関与している上流のキナーゼ PI3K 及び PDK1 について topotecan の作用を検討した。Topotecan 処理した A549 細胞の cell lysate より PDK1 及び PI3K を免疫沈降し、PDK1 活性及び PI3K 活性をそれぞれ調べた結果、topotecan は PDK1 及び PI3K の活性を用量依存的に抑制することが示された。以上のことから、topotecan は PI3K 及び PDK1 の活性を抑制することで Akt の膜移行及びリン酸化の両者を阻害し、Akt の活性化を抑制することが示唆された。

2. ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) における bFGF-, VEGF-induced migration に対する topotecan の抑制作用

Topotecan が in vivo ラット血管新生モデル (rat disc angiogenesis model) において血管新生阻害剤 TNP470 と同程度の血管新生阻害作用を示すことが報告され、topotecan の抗腫瘍効果の一部には、癌細胞に対する直接的な細胞毒性効果の他に血管新生阻害を介した間接的な作用も寄与している可能性が示唆された。血管新生は、腫瘍の増殖や転移に重要な役割を果たしており、VEGF など様々な因子により制御されている。また、VEGF 等により Akt が活性化することが知られている。

Topotecan は前述のとおり PI3K-Akt 経路の抑制作用を有することから、この経路の遮断と血管新生阻害作用との関わりについて検討した。

2-1. bFGF-及び VEGF-induced migration に対する作用

VEGF または bFGF 刺激によるヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC) の migration に対する topotecan の

効果を *in vitro* invasion assay にて評価した。

その結果、VEGF または bFGF 刺激により HUVEC migration の亢進がみられたが、topotecan を同時添加することで VEGF 及び bFGF 刺激による HUVEC migration はいずれも抑制された。

また、PI3K の特異的阻害剤 LY294002 処理でも bFGF 刺激による HUVEC migration の抑制がみられたが、シスプラチン処理では bFGF-induced migration に対する影響は認められなかった。

2-2. Topotecan による Akt 活性抑制作用

PI3K 阻害剤 LY294002 により HUVEC の migration 抑制作用が認められたことから、bFGF-induced migration に PI3K-Akt 経路が関与していることが示唆された。そこで、topotecan 処置後の Akt に対する作用について検討したところ、HUVEC においても、A549 細胞と同様に topotecan 処理により Akt 活性の抑制が認められた。

次に Akt の活性化体である Myr-Akt を遺伝子導入した HUVEC を用いて、topotecan の migration 抑制に対する影響を検討した。その結果、Akt の活性化体を導入した細胞では topotecan による migration 抑制作用はみられなかったことから、topotecan は PI3K-Akt 経路の抑制を介して血管新生を抑制している可能性が示唆された。

以上、本研究により、topo I 阻害剤 topotecan の PI3K-Akt 生存シグナル伝達の抑制を介したアポトーシス誘導及び血管新生阻害作用が、topotecan の抗腫瘍効果の一端を担っていることを明らかにすることができた。このような抗がん剤による Akt 不活性化を通じた癌細胞のアポトーシス誘導は、近年様々な抗がん剤においても認められることが報告されつつあり、今後 PI3K-Akt シグナル伝達系を標的にした抗がん剤開発がさらに進むものと考えられる。この成果は、生命薬学における興味ある知見を明らかにしたものであり、博士（薬学）の学位を受けるに充分値するものと判断した。