

## 論文の内容の要旨

論文題目     プロテアソームを標的とした固形がんの抗がん剤耐性克服法の開発

氏名     小木曾 泰成

固形がんの薬剤抵抗性の克服は、がん化学療法の治療成績向上に極めて重要な課題である。固形がんの薬剤抵抗性の原因として、異常な血管形成によって生ずるグルコース飢餓や低酸素状態といった固形がん特有の内部環境があり、がん細胞はこうした環境に対してストレス応答することによって抗がん剤耐性形質を獲得している。これまでに、ストレス応答したヒトがん細胞が種々の抗がん剤に耐性を示すことが知られており、なかでも DNA topoisomerase II (Topo II) 標的抗がん剤の耐性機序として、標的分子である Topo II $\alpha$  の発現低下が示唆されている。本研究では、ストレスによる Topo II $\alpha$  発現低下のメカニズムを解明し、抗がん剤耐性克服法を開発することを目的とし、以下の成果を得た。

注) 本研究における「ストレス」とは、グルコース飢餓、低酸素をはじめとする固形がん内部で認められる細胞環境をさす。

### プロテアソーム阻害剤ラクタシスチンによる Topo II $\alpha$ 発現低下の抑制と抗がん剤耐性克服

ストレスによって誘導される Topo II $\alpha$  の発現低下に及ぼす各種阻害剤の影響を検討した。その結果、プロテアソーム特異的阻害剤ラクタシスチンによって、グルコース飢餓による Topo II $\alpha$  の発現低下が濃度依存的に抑制されることを見いだした。一方、ラクタシスチンを添加しても mRNA レベルの Topo II $\alpha$  の発現上昇は認められなかった。このことから、ストレス環境下における Topo II $\alpha$  の発現低下は、タンパク質レベルでの分解の亢進によることが示唆された。Topo II 標的抗がん剤の細胞毒性は、Topo II $\alpha$  の発現量に依存することが知

られている。ラクタシスチンがストレスによる Topo II $\alpha$ の発現低下を抑制することから、ストレスによって誘導される Topo II 標的抗がん剤耐性がラクタシスチンによって克服できるかを検討した。その結果、ラクタシスチンによる Topo II $\alpha$ の発現回復と相関して、ストレスによるエトポシド耐性誘導が阻害されることが明らかになった。さらに、エトポシドとならんで Topo II 標的抗がん剤として知られているドキソルビシンのストレス誘導性耐性も阻害した。また、ヒト卵巣がん A2780 細胞においてもラクタシスチンはストレスによるエトポシド耐性誘導を阻害した。以上の結果から、ストレスによって誘導される Topo II 標的抗がん剤耐性は、Topo II $\alpha$ のタンパク質レベルでの分解の亢進によって起こり、この分解にプロテアソームが関与することが示された。

#### ラクタシスチンによる抗腫瘍効果の増強

ストレスによって誘導される抗がん剤耐性にプロテアソームが関与していることが培養細胞系において示された。特に、プロテアソームの特異的阻害剤ラクタシスチンが、ストレスによる Topo II $\alpha$ の発現低下及び Topo II 標的抗がん剤の耐性誘導を抑制することから、動物レベルでのラクタシスチンの有用性を検討した。HT-29 細胞をヌードマウスに皮下移植し、エトポシドとラクタシスチンの併用による抗腫瘍効果を調べたところ、単独投与群と比較してより高い抗腫瘍効果が得られ、副作用による体重減少も単独投与群より有意に少なかった。以上より、エトポシドの抗腫瘍効果の増強にプロテアソームの阻害が有効であることが動物実験レベルでも明らかになった。

#### ストレスによって誘導される Topo II $\alpha$ 発現低下とプロテアソームの核内蓄積

Topo II $\alpha$ は核局在タンパク質であり、核内で分解されることが示唆されていることから、核内のプロテアソームについて検討した。その結果、グルコース飢餓ストレス環境下では核内のプロテアソームサブユニットの発現量が約 3 倍に上昇しており、発現と相関して核内のプロテアソーム活性も上昇していることを見いだした。一方、全細胞抽出液のプロテアソームサブユニットの発現量はストレスの有無に関わらず変化は認められなかった。また、低酸素状態においても、約 2 倍のプロテアソームサブユニットの発現及び活性上昇が観察された。これらは、ストレス環境下でのプロテアソームの核内蓄積が、核内でのプロテアソーム活性の上昇に直接結びついていることを示している。以上の結果から、ストレス環境下ではプロテアソームが核内に蓄積し、核内における Topo II $\alpha$ の効率的な分解に寄与している可能性が示唆された。

#### ストレスによるプロテアソームの核内蓄積と耐性誘導の発現

プロテアソームを構成する 17 種類のサブユニットのうち、4 種類に NLS (nuclear localization signal ; 核移行シグナル) が存在し、この NLS がプロテアソームの核内移行に重要な働きをしていることが示唆されている。そこで、ストレスによって誘導されるプロ

テアソームの核内蓄積における NLS の関与を検討した。プロテアソームのサブユニットの一つである XAPC7 の全長 (XAPC7/WT) 及び NLS 配列を含む C 末端を欠損させた変異体 (XAPC7/dNLS) を安定に発現するヒト大腸がん HT-29 細胞株、HXAWT 及び HXAdNLS 細胞を樹立した。両細胞株のプロテアソームサブユニットの発現量は、内因性、外因性サブユニットともに、同程度であった。通常培養条件における増殖速度や各種抗がん剤による増殖抑制及びストレス環境下における細胞周期停止の点においても、親株であるヒト大腸がん HT-29 細胞株とほとんど差は認められなかった。さらに、外因性サブユニット XAPC7/WT 及び XAPC7/dNLS が 20S プロテアソームに取り込まれていることを確認した。HXAdNLS 細胞のグルコース飢餓環境下における核内のプロテアソームを検討したところ、HT-29 細胞や HXAWT 細胞と比較して発現量及び活性が低下しており、ストレスによるプロテアソームの核内蓄積が抑制されていることを見いだした。興味深いことに、外因性のサブユニットだけでなく、内因性のプロテアソームサブユニットの核内蓄積も抑制されていた。一方、全細胞抽出液のプロテアソームサブユニットの発現量に変化は認められなかった。また、HXAdNLS 細胞の通常培養条件下における核内プロテアソームの発現量や活性を調べたところ、HT-29 細胞や HXAWT 細胞とほとんど差は認められなかった。これらのことは、プロテアソームサブユニットの NLS 依存的核移行がストレスによって亢進していること、プロテアソームサブユニットが核外で複合体を形成し核内に運ばれる可能性を示唆している。次に、HXAdNLS 細胞のストレス環境下における Topo II $\alpha$  の発現レベルを検討したところ、ストレスによる発現低下が抑制され、エトポシド及びドキシソルビシン耐性誘導も減弱した。以上の結果から、ストレスによるプロテアソームの核内蓄積が Topo II 標的抗がん剤耐性の一つの原因になっていることが示された。

## まとめ

本研究において私は、固形がん内部のグルコース飢餓や低酸素ストレスによって誘導される Topo II 標的抗がん剤の耐性機序として、標的分子である Topo II $\alpha$  の分解が重要な働きをしており、この分解にプロテアソームが関与していることを明らかにした。さらに、ストレスによる Topo II $\alpha$  の分解がプロテアソーム特異的阻害剤ラクタシチンによって阻害されること、それにともなって Topo II 標的抗がん剤耐性誘導が抑制されることを培養細胞及び動物実験レベルで示し、プロテアソームが抗がん剤耐性克服の新しい分子標的となることを示した。さらに、ストレス環境下でプロテアソームが核内に蓄積することを明らかにし、このプロテアソームの核内蓄積を抑制することによって、Topo II 標的抗がん剤の耐性誘導が抑制されることを示した。本研究の成果は、固形がん耐性機構の解明に新たな知見を与えるものであり、固形がんの耐性克服法の開発につながるものと考えられる。