

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 昆虫由来抗菌物質 5-S-GAD

(*N*-β-alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine) の抗腫瘍活性に関する研究

氏名 秋山伸子

昆虫は、進化の過程で独自の生体防御機構を発達させ、地球上に多数棲息している。この昆虫を新しい医薬資源として着目している。昆虫の生体防御機構である自然免疫は、全ての動物種が普遍的に持つ免疫システムの根幹である。昆虫の免疫機構で働く生理活性物質（生体防御分子）が、我々哺乳類の免疫機構に働きかけ、その潜在能力を引き出す可能性がある。また、昆虫の生体防御分子群の一部は発生の過程でも機能しており、複数の機能を持つ分子が少なからず存在している。このようなユニークな特徴を持つ昆虫の生理活性物質がこれまでに医薬資源として注目された例はほとんどない。

センチクバエ成虫から精製された 5-S-GAD は、感染によりその合成が誘導される低分子抗菌物質である。5-S-GAD は過酸化水素を産生して直接抗菌活性を発揮する他、NF-κB を活性化し抗菌タンパク遺伝子の転写を促進して間接的に生体防御に働くと考えられている。また、哺乳類細胞のチロシンリン酸化阻害活性やアポトーシス誘導活性が見出され、5-S-GAD が腫瘍細胞の増殖に対して抑制効果を持つ可能性が考察されてきた。そこで私は、この昆虫由来の新たな抗菌物質 5-S-GAD をがんの化学療法に応用できないかと考え、5-S-GAD の抗腫瘍活性の研究に着手した。

#### 1. 5-S-GAD の *in vitro* および *in vivo* 抗腫瘍活性

ヒト培養がん細胞 38 株（肺癌 7 株、胃癌 6 株、大腸癌 6 株、卵巣癌 5 株、脳腫瘍 6

株、乳癌 5 株、腎癌 2 株、メラノーマ 1 株) を用いて、5-S-GAD の増殖に対する影響を検討した。その結果、5-S-GAD はほとんどのがん細胞の増殖に対して全く影響しなかったが、使用した 5 株の乳がん細胞のうち 2 株の増殖が 5-S-GAD 処理により阻害されることが明らかとなった。次に、5-S-GAD 感受性、非感受性細胞の存在を明確にするため、いくつかの細胞株を用いて詳細な用量依存性を検討し、その効果を制癌剤マイトマイシン C と比較した。その結果、5-S-GAD はメラノーマ LOX-IMV1、乳がん MDA-MB-231、MDA-MB-435S に対して用量依存的な増殖阻害活性を示したが、メラノーマ G361、CRL1579、乳がん細胞 MDA-MB-468、T47D、MCF-7 に対しては 100 $\mu$ M の濃度までほとんど増殖に影響しなかった。感受性細胞に対する 5-S-GAD の IC<sub>50</sub> 値はマイトマイシン C とほぼ同程度であった。しかし、マイトマイシン C は非特異的に全ての細胞の増殖を抑制したのに対して、5-S-GAD は細胞選択性があった。また、5-S-GAD が有効な細胞は乳がんの中でもエストロゲンに反応しない、比較的悪性度の高い細胞であったことも注目すべき興味深い事実である。

次のがん細胞の *in vivo* 増殖に対する 5-S-GAD 投与の効果を検討した。まず *in vitro* 実験系で 5-S-GAD 感受性が見られたヒトメラノーマ LOX-IMV1 を、移植可能なヌードマウスの皮下に移植して 5-S-GAD の投与実験を試みた。腫瘍塊の成長が速いメラノーマでは、移植後 14 日目には直径約 2cm 程度の腫瘍塊が形成されるが、500mg/kg 5-S-GAD を移植後 4、8、11、14 日の 4 回腹腔内投与を行うと、腫瘍塊の肥大が有意に抑制された。腫瘍移植後 4 日目から 8 日目まで 5 回連続投与した場合は、さらに低用量の 100mg/kg で移植後 12 日目から有意な抑制効果が認められた。

さらに 5-S-GAD 感受性の乳がん MDA-MB-435S をヌードマウスの乳腺に移植して 5-S-GAD 投与の効果を検討した。腫瘍塊の成長が比較的緩やかな乳がん細胞の場合には、100mg/kg の用量を腹腔内へ一週間に 3 回、投与を 7 週間継続して行ったところ、5-S-GAD は有意な増殖抑制効果を発揮した。

*In vitro* 実験系で 5-S-GAD 感受性が見られなかったヒトメラノーマ G361、CRL1579 と乳がん MDA-MB-468、MCF-7 の *in vivo* 増殖に対しては、上記と同様なスケジュールで 200mg/kg 5-S-GAD を投与したが、有意な抑制効果は見られなかった。

## 2. 5-S-GAD からの活性酸素産生と抗腫瘍活性への寄与

5-S-GAD の抗腫瘍活性に対する抗酸化分子添加の効果を検討した。その結果、MDA-MB-435S に対する 5-S-GAD の作用は添加カタラーゼの濃度依存に減少した。したがって、この細胞に対する 5-S-GAD の抗腫瘍活性には過酸化水素が関与していることが示された。また superoxide dismutase (SOD) を添加しても、5-S-GAD の抗腫瘍活性は消失し

た。この結果より、5-S-GAD の抗腫瘍活性には過酸化水素だけでなく、superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) など、他の活性酸素種も関与する可能性が示された。カタラーゼや SOD は細胞膜を通過しないことから、これらの活性酸素種は細胞外で産生されるものと思われる。

次に実際に 5-S-GAD から過酸化水素が産生されるか検討した。その結果、細胞非存在下培地中に 5-S-GAD を添加後 4 時間以降に過酸化水素の産生が検出され、24 時間後にプラトーに達した。添加 5-S-GAD からほぼ等モル相当の過酸化水素の産生が検出された。

### 3. 5-S-GAD からの過酸化水素産生のメカニズム

5-S-GAD が過酸化水素を産生する際、5-S-GAD 構造中のカテコール部分が自己酸化してキノン構造になると考えられる。その反応中間体として、セミキノンラジカルができる可能性を考え、5-S-GAD からのラジカル形成を電子スピン共鳴法 (ESR) にて検出した。その結果、5-S-GAD は 20 分以上インキュベーションすると、ラジカルを形成することが明らかとなった。このラジカルは 10 時間後まで安定に検出された。このラジカル形成はカタラーゼの添加では阻害されず、SOD または グルタチオンの添加により阻害された。このラジカルは波形から 5-S-GAD のカテコール部分から形成されるセミキノンラジカルであると考えられた。

SOD が 5-S-GAD ラジカル形成を阻害したことから、SOD が 5-S-GAD からの過酸化水素産生を阻害する可能性を考えた。そこで、5-S-GAD からの過酸化水素産生に対する SOD の効果を検討したところ、SOD は添加濃度および酵素活性依存に 5-S-GAD からの過酸化水素の産生を阻害した。この結果より、SOD は反応中間体であるラジカル形成を阻害して、5-S-GAD からの過酸化水素産生を阻害すると考えられた。

以上の結果から、5-S-GAD はラジカル形成を介して過酸化水素を産生することが明らかとなった。また、SOD は 5-S-GAD のラジカル形成を阻害し、その過酸化水素産生および抗腫瘍活性を抑制すると考えられた。現在までに 5-S-GAD からの  $O_2^{\cdot-}$  産生は確認されておらず、SOD がラジカル形成を阻害するメカニズムは不明である。しかし、SOD はカテコール類からのセミキノンラジカル形成を阻害する、いわゆる superoxide : semiquinone 酸化還元活性があると言われており、この活性が関与する可能性がある。5-S-GAD の抗腫瘍活性はカタラーゼの添加によりほぼ完全に消失することから、5-S-GAD の抗腫瘍活性には過酸化水素の産生が必須と考えられ、5-S-GAD ラジカルは過酸化水素産生過程に関与していると考えられる。

### 4. 5-S-GAD の細胞選択性の分子メカニズム

上記の結果より 5-S-GAD はラジカル形成を介して過酸化水素を産生し、長時間にわたっ

て細胞に酸化ストレスを与えると考えられた。しかし 5-S-GAD の抗腫瘍活性には細胞選択性がみられている。したがって、この 5-S-GAD に対する細胞の感受性の違いは、細胞側の抗酸化能力に起因する可能性を考えた。そこで、細胞内のカタラーゼ活性、SOD 活性、GSH 量を比較した。その結果、細胞の SOD 活性と GSH 量は有意な差が見られなかったが、カタラーゼ活性は 5-S-GAD 感受性の細胞と比較して、非感受性細胞は 3 倍から 6 倍の活性を有することが明らかになった。この結果より、5-S-GAD 感受性細胞ではカタラーゼ発現量が低いことが示された。

次に培養がん細胞のカタラーゼ発現量と 5-S-GAD に対する感受性が相関するか検討した。MDA-MB435S 細胞に遺伝子導入を行い、親株や空ベクター導入細胞と比較して、カタラーゼの発現量が 3 倍以上である stable cell line を樹立した。この細胞を用いて 5-S-GAD 感受性を比較したところ、カタラーゼ過剰発現細胞は 5-S-GAD に対する感受性が明らかに低下していた。IC<sub>50</sub> 値を比較すると、親株や空ベクター導入細胞が約 40 $\mu$ M なのに対し、カタラーゼ過剰発現細胞は約 80 $\mu$ M となり、ほぼ 2 倍となった。この結果から、少なくともこの細胞株では 5-S-GAD の *in vitro* 増殖阻害活性は細胞のカタラーゼの発現量に依存すると考えられた。

## 5. まとめと考察

本研究で私は昆虫由来抗菌物質 5-S-GAD が一部の腫瘍細胞に対して増殖抑制効果を示すことを見出した。そして、この増殖抑制効果は 5-S-GAD から産生される過酸化水素によるものであり、その産生過程にラジカル形成の関与があることも明らかにした。私はまた、細胞工学的手法により、5-S-GAD の細胞選択性は、標的細胞のカタラーゼ発現量に依存することを示した。この結果は、5-S-GAD をリードとして、癌化して抗酸化分子の発現が低下した細胞に対して選択性のある抗がん剤の作出が可能であることを示唆するものである。