

## 審査の結果の要旨

氏名 秋山伸子

本論文は、昆虫の自然免疫機構を担う物質の抗腫瘍効果について研究した結果を述べたものである。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發揮するだけでなく、NF- $\kappa$ B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指摘されている。

本論文は、6章から構成されている。第1章では、5-S-GADの発見かに抗腫瘍作用があるのではないかと、という着想に至った経緯が説明されている。

第2章では、5-S-GAD の *in vitro* および *in vivo* 抗腫瘍活性に関する結果が述べられている。検査した5株の乳がん細胞のうち2株の増殖が5-S-GAD 処理により著明に阻害された。さらに5-S-GAD の細胞増殖抑制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。

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發揮した。

第3章では、5-S-GAD からの活性酸素産生とその抗腫瘍活性への寄与が述べられている。

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結果、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<sub>2</sub><sup>-</sup>) など、他の活性酸素種も関与する可能性が

示された。さらに、実際に5-S-GAD から過酸化水素が産生されることも明らかとなった。5-S-GAD が過酸化水素を産生する際、5-S-GAD のカテコール部分から形成されるセミキノラジカルが重要な役割を果たしていると考えられた。

第4章では、5-S-GAD の細胞選択性の分子メカニズムが述べられている。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。

さらに、第5章では、5-S-GAD の部分構造体の抗腫瘍活性及び、過酸化水素産生について述べられている。さらに、第6章では、本研究の成果の今後の展開の可能性について論じられている。

以上、本研究は、昆虫の自然免疫に預かる抗菌物質が、抗腫瘍効果を有することを明らかにした点で、免疫学、細胞生物学、微生物学に貢献するところが大きい。よって、博士（薬学）の学位に値するものと判定した。