

## 論文の内容の要旨

論文題目 新規アンスラサイクリン系制癌剤 **amrubicin** の抗腫瘍効果に関する作用機序  
研究及び併用効果の探索研究  
氏名 花田 充治

**doxorubicin** に代表されるアンスラサイクリン系制癌剤は(下図)、悪性リンパ腫、白血病、乳癌等の化学療法に欠かせない制癌剤として広く使用されている。効果増強や毒性軽減を目指して、これまでに検討されてきたアンスラサイクリン誘導体の多くは、発酵品あるいは発酵品からの半合成品であるため、その化学構造の変換には一定の制限があった。これらとは異なり、化学的全合成という創薬アプローチを取ることで、**amrubicin** は見出された(下図)。**amrubicin** の化学構造上の特徴は、9 位に水酸基の代わりにアミノ基を有し、アミノ糖の代わりに簡単な糖部分を有することである。アンスラサイクリン系制癌剤の主要な代謝経路は、13 位のカルボニル基が水酸基へ還元される反応であり、この代謝過程は一般に不活性化経路と考えられている。**amrubicin** もまた 13 位還元代謝物である **amrubicinol** へ変換されるが(下図)、**amrubicinol** の *in vitro* 細胞増殖抑制作用は、細胞株の違いによって **amrubicin** よりも 5~200 倍強く、**doxorubicin** と同程度であった。このように、他のアンスラサイクリン系制癌剤では活性を減弱させる代謝により、逆に活性が亢進する点が、**amrubicin** の大きな特徴の一つである。

本研究では、**doxorubicin** との比較を中心に、DNA トポイソメラーゼ II 阻害剤 **etoposide** やアポトーシス誘導作用を有するアンスラサイクリン系制癌剤 **daunorubicin** を陽性対照と

して、amrubicin が抗腫瘍効果を発現する機構を明らかにすることを目的とした。第一章では、amrubicin 及び amrubicinol の作用機序として、精製酵素系及び培養細胞系を用いて DNA トポイソメラーゼ II 阻害作用を検討した。第二章では、抗腫瘍効果の発現に重要と考えられるアポトーシス誘導作用について、培養細胞系を用いて検討した。第三章では、癌の化学療法においては、多剤併用が主流である実態をふまえ、amrubicin を併用することで抗腫瘍効果の増強が期待できる既存制癌剤を *in vitro* 及び *in vivo* で探索した。

amrubicin 及び amrubicinol は、intercalation により DNA に結合する作用を有していたが、これらの作用は doxorubicin の 1/5 以下の強さであった。DNA トポイソメラーゼ II は、DNA 代謝に重要な酵素であるだけでなく、様々な制癌剤の細胞内標的分子でもある。amrubicin 及び amrubicinol は、精製ヒト DNA トポイソメラーゼ II による decatenation 反応を阻害するとともに、本酵素を介した DNA 切断を増強した。すなわち、amrubicin 及び amrubicinol は DNA トポイソメラーゼ II 阻害剤であり、その阻害様式は cleavable complex (切断された DNA の 5'末端が酵素のチロシン残基と共有結合した DNA-タンパク質複合体) の安定化であることが示された。更に、CCER-CEM 株 (ヒト白血病) 及び KU-2 株 (ヒト腎癌) を amrubicin 及び amrubicinol で処理した場合、薬剤濃度に依存して、タンパク質-DNA 複合体の形成量が増加し、染色体 DNA の切断が増強することが示された。また、DNA topoisomerase II catalytic inhibitor である ICRF-193 で前処理することにより、amrubicin や amrubicinol による細胞内 DNA トポイソメラーゼ II 阻害作用が抑制されるとともに、*in vitro* 細胞増殖抑制作用もまた抑制された。従って、amrubicin 及び amrubicinol は、cleavable complex を安定化することにより細胞内 DNA トポイソメラーゼ II を阻害し、主にこの阻害作用によって癌細胞の増殖を抑制することが示された。一方、doxorubicin の DNA トポイソメラーゼ II 阻害作用は、amrubicin や amrubicinol と比較すると、軽微であり、その *in vitro* 細胞増殖抑制作用は、ICRF-193 の影響を受けなかった。

癌が消失・縮小するためには、細胞増殖の停止では不十分であり、アポトーシスの誘導が必要と考えられている。U937 株 (ヒト白血病) を amrubicin 及び amrubicinol で処理した場合、核の断片化やヌクレオソーム単位での DNA 切断が観察され、ICRF-193 によって DNA の断片化は抑制された。そのため、amrubicin 及び amrubicinol は、アポトーシスを誘導すること、その作用は、DNA トポイソメラーゼ II 阻害作用に起因することが示された。一方、doxorubicin のアポトーシス誘導作用は、amrubicin や amrubicinol と比較すると、軽微であった。また、amrubicin 及び amrubicinol 誘導アポトーシスにおいては、経時的な caspase-3/7 の活性化に続き、ミトコンドリア膜電位の低下を伴っており、これらは etoposide や daunorubicin 誘導アポトーシスと共通した経路であった。

DNA トポイソメラーゼ II 阻害作用により、*in vitro* 細胞増殖抑制作用を発現すること、また、アポトーシス誘導作用を有する点で、amrubicin 及び amrubicinol の作用機序は、etoposide と類似していた。そこで、アポトーシス誘導機構の薬剤間での差異を検討するため、セリンプロテアーゼ阻害剤 phenylmethanesulfonyl fluoride、汎 caspase 阻害剤 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB あ

るいはミトコンドリア FoF1-ATPase 阻害剤 oligomycin の影響を検討した。その結果、etoposide による caspase-3/7 の活性化は、oligomycin によって抑制されなかったのに対し、amrubicin 及び amrubicinol の場合には、oligomycin によって caspase-3/7 の活性化が抑制された。このことから、amrubicin 及び amrubicinol によって誘導されるアポトーシスの機構は互いに類似しているが、etoposide 誘導アポトーシスとは経路に違いがあることが示唆された。

癌の化学療法の領域においては、生存率や quality of life の改善を目指し、多剤併用療法が主流である。併用療法における制癌剤の組み合わせは、互いに作用機序が異なること、毒性が重複しないこと、薬剤相互作用がないこと等を考慮して選択される。DNA トポイソメラーゼ II 阻害作用やアポトーシス誘導作用の検討結果から、amrubicin は doxorubicin とは異なる作用機序により抗腫瘍効果を発現することが示されたため、amrubicin を併用することで抗腫瘍効果の増強が期待できる既存制癌剤を *in vitro* 及び *in vivo* で探索した。*in vitro* 併用効果は、amrubicinol と他剤を同時添加する条件で、combination index 法により評価した。その結果、LX-1 株（ヒト小細胞肺癌）において、白金系制癌剤 cisplatin または DNA トポイソメラーゼ I 阻害剤 irinotecan と amrubicinol の併用は相乗効果であった。抗 human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) 抗体 trastuzumab あるいは epidermal growth factor receptor 阻害剤 gefitinib と amrubicinol の併用も、それぞれ BT-474 株（ヒト乳癌）あるいは A-431 株（ヒト皮膚癌）において相乗効果を示した。また、A549 株（ヒト非小細胞肺癌）における tubulin 重合阻害剤 vinorelbine との併用は相加、代謝拮抗剤 gemcitabine との併用は拮抗であった。なお、amrubicin との同時併用については、irinotecan、trastuzumab あるいは gefitinib で相乗、cisplatin 及び vinorelbine で相加であった。

amrubicin の適応癌種は、小細胞肺癌及び非小細胞肺癌である。マウスにおける amrubicin の最大耐量 (MTD) である 25 mg/kg の用量で、ヒト肺癌細胞株に対する *in vivo* 細胞増殖抑制作用を検討したところ、小細胞肺癌では 2 株中 2 株、非小細胞肺癌では 4 株中 3 株において、amrubicin 単剤は有効であることが確認された。そこで、cisplatin、irinotecan、vinorelbine、gemcitabine、trastuzumab、gefitinib 及び代謝拮抗剤 UFT (tegafur/uracil) について、amrubicin との *in vivo* 併用効果を検討した。併用投与群の用量は、それぞれを単剤で投与した場合の MTD としたが、いずれも担癌マウスの体重減少が 15% をこえることは無かった。そのため、検討した制癌剤はいずれも MTD で amrubicin との併用が可能であることが示された。中でも、腫瘍の消失例が観察されたことから、HER2 高発現の 4-1ST 株（ヒト胃癌）に対する trastuzumab の *in vivo* 細胞増殖抑制作用を、amrubicin 併用は顕著に増強することが示された。更に、cisplatin、irinotecan、あるいは UFT と amrubicin の併用は、それぞれの単独治療と比較して、体重減少を増悪することなく、LX-1 株や SC-6 株（ヒト胃癌）に対する *in vivo* 細胞増殖抑制作用を増強した。また、gemcitabine または vinorelbine との併用では、*in vivo* 細胞増殖抑制作用の指標とした最小 T/C が、それぞれ LX-1 株または QG-56 株（ヒト非小細胞肺癌）において、amrubicin 単独治療と比較して低下した。

本研究により、amrubicin が抗腫瘍効果を発現する機構は、doxorubicin の場合とは異なる

ことが明らかとなった。すなわち、doxorubicin が主に DNA への intercalation によって細胞増殖抑制作用を発現すると考えられたのに対し、amrubicin 及び amrubicinol は intercalation 作用は弱く、むしろ cleavable complex の安定化を介して DNA トポイソメラーゼ II を強く阻害し、主にこの作用により癌細胞の増殖を抑制することが示された。また、amrubicin 及び amrubicinol は、ヒト癌細胞において、DNA トポイソメラーゼ II 阻害に続き、caspase-3/7 の活性化とミトコンドリア膜電位の低下を伴ったアポトーシスを、doxorubicin よりも強く誘導した。このように doxorubicin とは異なる作用機序を有する amrubicin は、単剤でヒト肺癌細胞株に対して *in vivo* 細胞増殖抑制作用を示すとともに、cisplatin、irinotecan、vinorelbine、gemcitabine、UFT あるいは trastuzumab と併用することにより、これらの効果を増強することが示された。

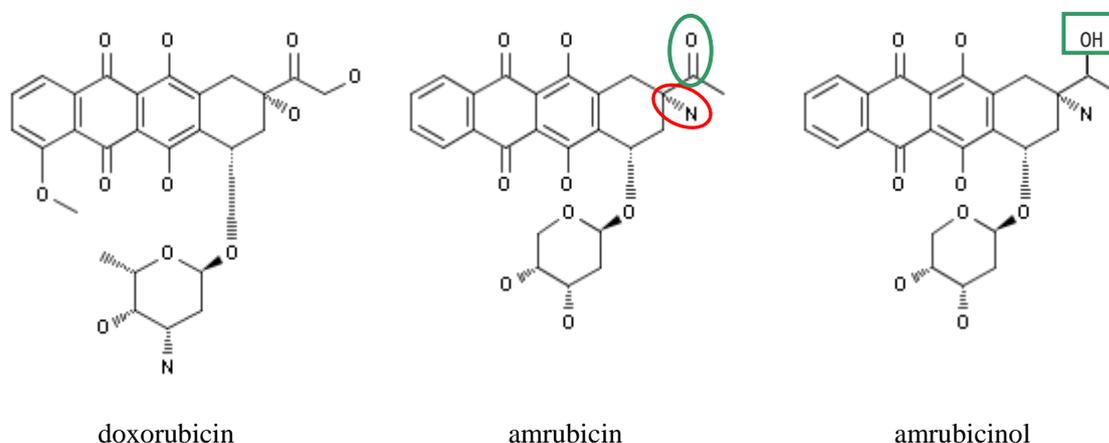


図 アンスラサイクリン系抗癌剤の化学構造式

○は9位のアミノ基を示す。○及び□は、それぞれ13位カルボニル基及び水酸基を示す。