

## 総 説

### 抗腫瘍性リボヌクレアーゼの現状と展望

細野 雅祐, 立田 岳生

#### Current status and foresight of antitumor ribonucleases

Masahiro HOSONO and Takeo TATSUTA

(Received November 20, 2014)

#### はじめに

顧みれば, 生命科学における 20 世紀末はゲノムの時代であった. その潮流の源はもちろん, 1950 年代に遡ってワトソン (James D. Watson) とクリック (Francis H. C. Crick) による DNA 二重らせんモデルの提唱に帰する. 1962 年に彼らがノーベル賞を授与された時代を最初のピークとすれば, そのおよそ 20 年後にサンガー (Frederick Sanger) が DNA の配列分析法を確立して第 2 のピークを築き, さらに 20 年後, ゲノムプロジェクトがひとまず完了した時点で第 3 のピークを迎えたように思われる. 周知のように DNA 研究の進展は, 医療の分野に大きな福音をもたらした. 例えば本総説の主題である抗腫瘍薬は, がんの発生や増殖が基本的に遺伝子 (DNA) の異常による, という大筋のコンセンサスを背景に現在でもその多くが DNA を標的としている.

一方, DNA 研究の流れとほんの少し周期をずらすように, RNA もまた多くの研究者の注目を集め, その存在感を強めてきた. 1980 年代にチェック (Thomas R. Cech) によるリボザイムの発見に端を発した, いわゆる RNA ワールドという考え方が話題となり, また, シャープ (Phillip A. Sharp) とロバーツ (Richard J. Roberts) によるスプライシング機構の解明によって RNA 研究はさらに脚光を浴びた. その後 RNA は, 前述したゲノミクスの陰に隠れがちではあったが, 実は 1990 年代後半からファイヤー (Andrew Z. Fire) とメロウ (Craig C. Mello) により掘り起こされた RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) <sup>1)</sup> という遺伝子サイレンシング現象が理解され始め, その後急速にデータの蓄積がなされた. そして, ちょうどゲノミクスのピークがひと段落したのを待っていたかのように, DNA から見ればほんの小さな分子であるマイクロ

RNA (miRNA) という機能分子が, ここ 10 年ほどで一躍表舞台に登場してきた. <sup>2,3)</sup> 同時に, 「RNA 新大陸」という創語が我が国の理化学研究所 <sup>4)</sup> によってプロモートされ, タンパク質に翻訳されないことから基本的に機能をもたないと考えられてきた non-coding RNA (ncRNA, 実にゲノムの約 60%に相当する) <sup>5)</sup> が, 細胞内で生理的あるいは病的に重要な役割を担っている可能性が明らかとなってきた. miRNA は, 塩基長が 20 程度と非常に小さく, 合成や応用が容易なことから近年研究が急速に進展してきており, 現在では 2500 個ほどが同定され, 特になんがんエピジェネティクスの分野で盛んに用いられている. <sup>6,7)</sup> RNAi は, 利用法を工夫すればある病因遺伝子の特異的に, かつ効率的に抑制することができるため, 医薬品開発への応用も既に始められている. この RNAi に重要な役割を果たす Dicer と呼ばれるタンパク質は, 実はリボヌクレアーゼ (RNase III) <sup>8)</sup> であり, 細胞内で small interference RNA (siRNA) や miRNA が切り出される際に必須のアイテムとなっている. <sup>9)</sup>

ここで著者は, 敢えて紙面を割いて少し冗長とも思える記述をしてきたが, その意図するところは, 「今また RNA が主役の時代となってきた」ということである. そして, 本稿で紹介するレクザイム (後述) というタンパク質が, 抗腫瘍薬というフィールドにおいて, これまでと異なる RNA を標的とした新しいがん治療薬となり得ることを, 当研究室における最近の知見をもとに解説したい.

#### I. リボヌクレアーゼとは

リボヌクレアーゼ (ribonuclease, RNase) は, あらゆる細胞に普遍的に存在するリボ核酸分解酵素であり, 最初の発見からすでに 100 年あまり経過している酵素の老舗といえる. 酵素化学的には

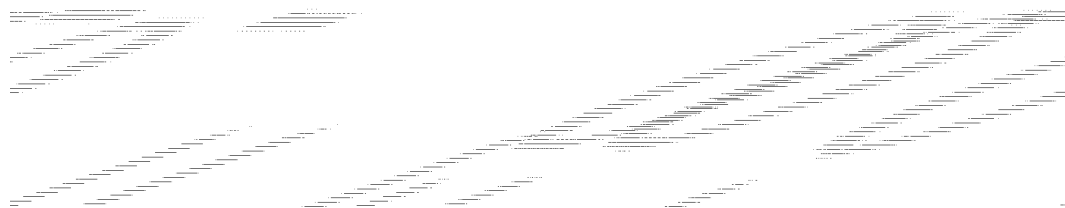


Fig. 1. Reaction mechanism of RNase catalyzing through 2',3'-cyclic phosphodiester R, next nucleoside or nucleotide.

エンド型とエキソ型に大別されるが、動植物から微生物まで生物種を問わず非常に多くの種類が存在し、現在でもその報告数が増加しているため、ネーミングも含めた分類方法も度々変遷を重ねてきている。エンド型のものだけでも現在 RNase A, T1, T2, H, L, 及び P ファミリーなどが知られ、またエキソ型にしても 3'5'型及び 5'3'型それぞれにおいて多数報告されている。<sup>10-14)</sup>

今日、酵素のみならずタンパク質の分類は通常、機能ドメインを中心とした一次配列（モチーフと呼ばれる）の相同性、あるいは立体構造の類似性をもとに行われるが、生化学的に重要で反応機構などがよく研究されているのはエンド型の 2',3'環状化 RNase、すなわち反応中間体として 2',3'環状化を経て反応生成物である 3'ヌクレオチドを生じる酵素群である (Fig. 1)。これらは構造の類似性から主に RNase A<sup>15)</sup> (ピリミジン塩基特異的)、RNase T1<sup>16)</sup> (プリン塩基特異的もしくは非特異的)、及び RNase T2<sup>17)</sup> (アデニン特異的もしくは非特異的) の 3 つのファミリーに分類されている。T1 及び T2 はもともと真菌 (*Aspergillus oryzae*) から見つかったもので、前者には細胞毒性のある  $\alpha$ -sarcin,<sup>18)</sup> 後者には植物の自家不和合性因子（自己と同じ遺伝形質をもつ花粉管の伸長を止める）である S-RNase が含まれる。<sup>19)</sup>  $\alpha$ -sarcin は、28S リボソームの 4325 番目のグアニンの 3'-ホスホジエステル結合を加水分解することでタンパク合成を止める細胞毒である。<sup>20)</sup> 興味深いことに、トウゴマ由来の毒素タンパク質である ricin (ribosome inactivation protein, Type II RIP の一員) は、わずかにその 1 塩基手前、4324 番目のアデニンの N-グリコシド結合を分解する。<sup>21)</sup> 7000 個あまりのポリヌクレオチド中、隣接する 2 個の塩基部分にそれぞれ RNase と N-グリコシダーゼの標的部位がピンポ

イントで配置され、しかも生体にとって致命的なダメージを与える急所となっている事実は非常に興味深い。RNase である  $\alpha$ -sarcin の細胞毒性を抗腫瘍薬として応用しようとする試みもなされたが、細胞選択性が低く、正常細胞にも等しく毒性を発揮することから、早い段階で候補からはずされた。<sup>22)</sup>

一方、RNase A はウシ膵臓から精製されたもので、科学史上最も研究された酵素といわれている。この酵素タンパク質ひとつを対象とした研究で、1972 年にアンフィンセン (Christian B. Anfinsen, タンパク質フォールディングメカニズムの解明)、ムーア (Stanford Moore, 構造と触媒活性解析)、ステイン (William H. Stein, 同)、及び 1984 年にメリフィールド (Robert B. Merrifield, 全合成) の計 4 人がノーベル賞 (化学) を授与されている (これを凌ぐタンパク質はインスリンのみ、医学・生理学賞及び化学賞で計 5 人)。ウシ膵臓が分泌する消化酵素であるこの酵素が起点となり、100 種類以上の同種酵素を集めてこれまで RNase A superfamily という名称が一般的に使用されてきた。<sup>23,24)</sup> 近年 D' Alessio は、このファミリーに属する酵素のほとんどが脊椎動物により産生される分泌性のタンパク質であることから、vertebrate-secreted RNase superfamily と呼ぶことを提唱した。総説<sup>14)</sup>によれば、このグループの RNase は、配列の中程に特徴的なペプチドモチーフ (CKXXNTF) をもち (Fig. 2)、単一のエキソンでコードされ、触媒活性中心として 2 個の His と 1 個の Lys (catalytic triad と呼ばれる) をもつ 2',3'-環状化 RNase (例外あり) であるという。また、3 本の  $\alpha$ -ヘリックスと 4 本の逆平行  $\beta$ -シート構造を主体とする 3-D モデルが腎臓を連想させることから、kidney-shape とも呼ばれるこのファミリーに特徴的な立体構造を成す。<sup>25)</sup> ゲノム解析により、ヒトにおけるすべての RNase

Table 1. Newly proposed classification of human RNases<sup>Ref14)</sup>

Human RNase	alternative <sup>1)</sup>	first identified in	function or biological activity	Refs
1	HP-RNase	pancreas	homeostasis of extracellular RNAs	27-29
2	EDN	eosinophil	neurotoxic, antiviral	30-32
3	ECP	eosinophil	cytotoxic, antibacterial	33-35
4	—	adenocarcinoma	unknown	36,37
5	ANG	adenocarcinoma	angiogenesis	38-40
6	—	most tissues	host defense?	41
7	—	human skin	antibacterial	42-44
8	—	placenta	antibacterial	45,46

1) HP-RNase, human pancreatic RNase; EDN, eosinophil-derived neurotoxin; ECP, eosinophil cationic protein; ANG, angiogenin.

(13種)は14番染色体にコードされており、<sup>26)</sup>触媒活性に必須のアミノ酸(上述)を欠く5種(noncanonical)を除く8種がcanonical RNaseとして以下のように分類されている(Table 1)。

表中, hPR (RNase 1)はヒト膵臓由来のRNaseで, RNase Aの orthologである。<sup>27)</sup>

Eosinophil-derived neurotoxin (EDN, またはRNase 2)<sup>30)</sup>は, もともと好酸球から抽出されたタンパク質をウサギの延髄に注射すると神経の障害を起こすという観察結果から見いだされたタンパク質で,<sup>31)</sup>抗ウイルス活性をもつが抗菌活性は示さない。<sup>47)</sup>一方 eosinophil cationic protein (ECP, またはRNase 3)<sup>33)</sup>は, 抗菌活性及び細胞傷害性を示す。名前の示す通りいずれも好酸球が産生するタンパク質で, ECPの方がより塩基性(pI 10.9)であるが, RNase活性はEDN(pI 8.9)の方が100倍程度強いとされている。<sup>30)</sup>また, angiogenin (ANG, またはRNase 5)<sup>38)</sup>も特筆すべき存在であり, RNaseでありながら血管新生活性をもつ。とはいっても酵素活性はRNase Aと比較して非常に弱い(1/10<sup>6</sup>程度, ただしアッセイ方法によってその差に幅がある)。配列中に核移行シグナルをもち,<sup>48)</sup>核小体に運ばれて集積された後,<sup>49)</sup>DNA上のリボソームRNA(rRNA)転写部位に結合し, 転写を活性化する。<sup>50)</sup>血管内皮細胞の増殖を促進するvascular endothelial growth factor(VEGF)やfibroblast growth factor(FGF)は, 内因性ANGの核内移行を促進することも知られている。<sup>51)</sup>弱いとはいえ, RNase活性を有するタンパク質が核に移行し, rRNAの転写に関与しているという事実は強烈なアイロニーであり, この矛盾に対する説明は今のところなされていない。このようにRNaseは消化酵素として, あるいは代謝酵素とし

てRNAの分解に参与する以外にも様々な機能あるいは生理活性をもつことが, 多くの研究から明らかとなっている。これらの機能・活性は, 基本的にRNase活性とリンクしており, 直接もしくは間接的にRNAの分解によって引き起こされるものがほとんどである。しかしながら, 興味深いことにいくつかの事例で生理活性が酵素活性と相関しないものが知られている。例えばECPは, HL60やHeLa細胞に対して細胞傷害性を示すが, このときECPによるRNAの分解は認められず, 細胞表面にECP分子が集積することにより細胞膜の透過性が増大する可能性が示唆されている。<sup>34)</sup>同様に, RNase 7の抗菌作用も膜透過性の亢進によるものとされ, RNase活性に依存しない。<sup>42)</sup>言い換えると, RNaseの生理活性には, 酵素分子が細胞に入ってRNAを分解するか, 入らずに細胞膜の構造や機能に影響を与えるかによって大きく2通りの作用機序が存在することになる。

## II. 抗腫瘍性リボヌクレアーゼ

これまで知られている代表的な抗腫瘍性RNaseは, 主にRNase Aファミリーに属する。<sup>14)</sup>上述したように, ウシ膵臓由来RNase Aはそのタンパク質としての姿, 性質について物理化学的, 酵素学的, 生化学的, 分子生物学的等々あらゆる方面から研究し尽くされたタンパク質である。RNAを分解することから, その抗腫瘍活性も既に半世紀以上前から検討されていたが, mgオーダーの大量投与により細胞傷害性は認められたものの,<sup>52-54)</sup>その後の研究によって低濃度では顕著な活性は認められないことが次第に明らかになった。<sup>55,56)</sup>その主たる要因は内在性の阻害剤RNase inhibitor(RI)の存在である。<sup>57)</sup>RIは分子量約50 kDaの酸性タ



LECZ	-----<ENWATFQQKH I-----NTPI I NCNTI MDNNI YI VGGQCKRVNTF I SSATTVKAI C-----TGVI -NMNV--	60
ONC	-----<EDWLTFLQKKHI T-----NTRDVC DNI MSTNLF-----HCKDKNTF I YSRPEPVKAI C-----KGI I ASKNV--	57
RNase A	---KETA AAKFERQHMDSSSTAASSSNYC NQMMKSRNL- TKDRCKPVNTF V HESLADVQAVCSQKNVACKNGQT--NCYQ	74
HPR		
(RNase1)	---KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYC NQMMRRRNM- TQGRCKPVNTF V HEPLVDVQNVCFQEKVTCCKNGQG--NCYK	74
EDN		
(RNase2)	KPPQFTWAQWFETQHI NMTSQQ-----CTNAMQVI NN- YQRRCKNQNTFL LTTTFANVVNVC GNPNTMCP SNKTRKNCHH	73
ECP		
(RNase3)	RPPQFTRAQWFAI QHI SLNPPR-----CTI AMRAI NN- YRWRCKNQNTFL RTTTFANVVNVC GNQSI RCPHNRTLNNCHR	73
ANG		
(RNase5)	--QDNSRYTHFLTQH YDAKPQ- GRDDRYCESI MRRRGL- T- SPCKDI NTF I HGNKRSI KAI C-----ENKNG--NPHR	66
Consensus	F H C M CK NTF C N	
LECZ	-----LSTTRFQLNCTRTSI TP-----RPCPYSSRTETNYI CVKCE NQ-----YPVHFAGI GRCP-	111
ONC	-----LTTSEFYLSDC---NVTS-----RPCKYK LKKSTNKFCVTCENQ-----APVHFVGVGSC--	104
RNase A	SY-----STMSI TDC---RETGSS--KYPNCAYKTTQANKHI I VACEGN-----PYVPVHF DASV----	124
HPR		
(RNase1)	SN-----SSMHI TDC---RLTNGS--RYPNCAYRTSPKERHI I VACEGS-----PYVPVHF DASVEDST	128
EDN		
(RNase2)	SG-----SQVPLI HC---NLTTSPQNI SNCRYAQTPANMFYI VACDNRDQRDPPQYPVVPVHLDRI I----	134
ECP		
(RNase3)	SR-----FRVPLLHC---DLI NPGAQNI SNCTYADRPGRRFYVVACDNRDPR- DSPRYPVVPVHLDTTI I----	133
ANG		
(RNase5)	ENLRI SKSSFQVITC---KLHGGS--PWPPCQYRATAGFRNVVACENG-----LPVHLDQSI FRRP	123
Consensus	C C Y V C PVH	

Fig. 2. Sequence alignment of the vertebrate-secreted RNase superfamily

Consensus amino acids are indicated at bottom of the matrix. Amino acid residues that are essential for catalysis are denoted in yellow and half-cystine residues are noted in pink. Consensus motif of vertebrate-secreted RNase is emphasized by red box. <E indicates pyroglutamic acid. Figures to the right of the matrix are the amino acid numberings. hPR, human pancreatic RNase; EDN, eosinophil-derived neurotoxin; ECN, eosinophil cationic protein; ANG, angiogenin.

ンパク質で、ほぼすべての哺乳類細胞に存在し、ロイシンリッチリピート構造をもち、分子全体として特徴的な馬蹄形を成す。<sup>58-60)</sup> RNase A とは 1:1 で非共有結合し、その解離定数は fM オーダーと非常に強固である。<sup>61,62)</sup> したがって細胞内に取り込まれた RNase がその RNA 分解活性により細胞毒性を示すには必然的にこの阻害剤の存在が障壁となるが、以下に示す 3 つのうちいずれかの条件をクリアできれば、それが可能となる。

- 1) すべての哺乳動物細胞に存在する RI に対して感受性がない。<sup>63)</sup>
- 2) RI に対して飽和量以上存在し、フリーの RNase 分子が RNA に到達できる。<sup>64)</sup>
- 3) RI との結合を阻害するような他の分子と結合する。<sup>65)</sup>

すなわち、細胞内に取り込まれて細胞傷害性を発揮する RNase は、少なくともこのいずれかのルートを通じて作用するものと考えられる。現在、RI による阻害を回避した上で抗腫瘍活性を示す RNase として、カエル卵由来の onconase (ranpirnase) が最もよく研究されているので、これらを主として以下に紹介する。

#### 【オンコナーゼ (Onconase, ONC; 一般名 Ranpirnase)】

ONC は 104 アミノ酸残基から成るポリペプチド

で、1991 年、Ardelt らによってヒョウガエル (*Rana pipens*) 卵から単離された。<sup>66)</sup> その後 2007 年には Singh らによって同じ材料から ONC とは別に 114 残基から成る RNase が単離され、amphinase と名付けられた。<sup>67)</sup> ゲノム解析の結果、それぞれに数種のバリエーションが存在することも明らかになっている。<sup>68)</sup> ちなみに Onconase は、最初にこれを単離・開発した米国のベンチャー企業 (当時) である Alfacell 社の登録商標で、もともとは P-30 protein あるいは ranpirnase と呼ばれていた。現在、学術論文では onconase の方が多く用いられていることから、本稿でもこの呼称を用いることとする。ONC は RNase A superfamily に属し、RNase A との相同性は約 30% 程度であるが、配列中に 4 カ所存在するジスルフィド結合のうち 3 カ所が保存され、上述した特徴的なフォルド (kidney shape) を成し、<sup>69)</sup> RNase A よりもややコンパクトである。また、N 端と C 端がそれぞれピログルタミン酸とジスルフィド結合でブロックされている (Fig. 2)。コンパクトな構造から非常に安定なタンパク質で、分解酵素による消化を受けにくく、熱変性に対しても抵抗性をもつ。<sup>70)</sup> ONC は、同じ触媒活性部位をもつにもかかわらず、RNase A と比べポリリボヌクレオチドや 1 本鎖 RNA を基質とした酵素活性は  $1/10^2$  から  $1/10^5$  程



### 【その他の抗腫瘍性 RNase と活性創出または増強への試み】

その他に RNase A superfamily に属する抗腫瘍性 RNase として挙げられるのは、ウシ精漿由来の bovine seminal RNase (BS-RNase) と上述の ECP である。<sup>92)</sup> 前者は天然の RNase としては唯一のホモ二量体である。RNase A との相同性は 83% と高く、フォールドもほぼ同様であるが、通常 RNase が分解できない二本鎖 RNA を切ることができる。BS-RNase の活性には二量体としての立体構造が最も重要で、モノマーである RNase A は前述した RI との相互作用により細胞傷害性をほとんど示さないのに対し、BS-RNase はがん細胞に対して選択的な毒性を発揮することが知られている。<sup>93)</sup> ECP の細胞傷害性については既に述べたが、がん細胞に対しても殺作用を有する。<sup>91,94)</sup>

BS-RNase の二量体構造がその抗腫瘍活性に重要であるという事実は、研究者をタンパク質の分子デザインへと駆り立てた。その方向性は幾筋かに分かれ、<sup>91)</sup>

#### (1) 二量体化

- A. 本来細胞傷害性のない RNase A のような分子に対し、遺伝子改変によりジスルフィド結合を導入して二量体化する。<sup>95,96)</sup>
- B. 遺伝子をタンデムに並べて二量体をつくる。<sup>97)</sup>
- C. 二量体構造の安定性を高める。<sup>98)</sup>

#### (2) 変異導入

- A. RNase A と RI との会合メカニズムを精査し、酵素側の結合部位を改変することにより相互作用を失わせる。<sup>99)</sup>
- B. アミノ酸置換あるいは化学修飾により陰性電荷 (カルボキシル基) を隠ぺいし、陽性電荷の割合を高めて細胞との相互作用を増強する。<sup>100)</sup>

#### (3) 複合体形成

- A. がん細胞へのターゲティングを志向し、モノクローナル抗体などと結合させる (イムノトキシン化)。<sup>101)</sup>
- B. 細胞膜上の受容体を介したエンドサイトーシス機構に乗せることを狙い、トランスフェリンやホルモン、増殖因子などと結合させる。<sup>102)</sup>
- C. ポリエチレングリコールなどと結合させて膜透過性の増大を図る。<sup>103)</sup>
- D. アルブミンなどと結合させて血中での分解を防ぎ (半減期の延長)、かつ特定の臓器への蓄積を抑制する。<sup>104)</sup>

などの試みが、多くの研究者により行われた。しかしながら、その効果については各々で一定の評価が得られてはいるものの、決定打となるようなケースはまだ報告されていない。

### Ⅲ. レクザイムの発見と発展

レクザイム (Leczyme, LECZ) は、シアル酸結合活性をもつレクチンであるウシガエル (*R. catesbeiana*) 卵由来レクチン (通常、我々は sialic acid-binding lectin, SBL と呼んでいる) が RNase 活性を併わせもつことから創りだされた造語である。111 アミノ酸から成る分子量 12450, pI 9.2 の塩基性タンパク質で、細胞表面のシアロ糖タンパク質 (あるいは糖脂質) に結合し、ピリミジン塩基特異的な RNase 活性を有する。RNase A 類縁体との相同性は、RNase A (28%), human RNase 1 (26%), human RNase 5 (ANG, 35%), ONC (49%) である。以下、LECZ が発見された経緯を簡単に紹介する。

当研究室の前身である旧癌研究所第一部において、Kawauchi らによりカエル卵凝集素の研究が始められたのは 1970 年代半ばである。<sup>105)</sup> 当初は卵の粗抽出画分が用いられ、主にラット腹水がん細胞 (AH109A) に対する凝集反応を検討していたなかで、初めて活性を認めたのはニホンアカガエル (*R. japonica*) 及びトノサマガエル (*R. nigromaculata*) 卵由来のものであった。<sup>106)</sup> 次いで同じ *Rana* 属であるウシガエル (*R. catesbeiana*) 卵抽出物にヒト赤血球凝集活性があることが分かり、具体的に糖鎖との相互作用が認められたことからレクチンという名称が使われ始めた。<sup>107)</sup> カラムクロマトグラフィーによりヒト A 型赤血球凝集素とがん細胞凝集素が完全に分離できたのは 1977 年のことで、<sup>108)</sup> これが LECZ 発見の端緒となった。その後、がん細胞凝集反応はシアロ糖鎖を介することが明らかとなり、<sup>109)</sup> また、担がんマウスへの投与により延命効果も認められたことから、<sup>110)</sup> 研究の方向性はレクチンの抗腫瘍活性へとシフトしていった。1987 年、Titani らによってウシガエル卵レクチンの一次構造がタンパク質化学的手法によって解明され、<sup>111)</sup> 同時に Nitta らによりがん細胞との相互作用及び選択性が理解され始めた。<sup>112)</sup> アミノ酸配列の情報は、ちょうどその頃利用され始めたコンピューターによる相同性検索に供され、意外にも RNase との接点が見いだされた。1990 年のことである。<sup>113)</sup> この頃



ウシガエル卵レクチンはSBLと略記され、耐性細胞の樹立、*in vivo*における抗腫瘍活性の検討などがなされたが、<sup>114,115)</sup> 一方ではRNase活性をもつ唯一のレクチンという捉え方でも研究が進められ、酵素学的側面ではピリミジン塩基特異性などが明らかとなったことから<sup>116,117)</sup> 1996年、Nittaらにより「Leczyme」という創語が *International Journal of Oncology* 誌上において初めて紹介された。<sup>118)</sup> LECZの抗腫瘍作用がRNase活性に依存することは既に確認されていたが、そのメカニズムについては不明であった。しかし、1990年代に隆盛を迎えていた細胞のアポトーシス現象への関与が見いだされたことから、次節以降に述べる研究へと発展していくことになる。なお、1992年にLiaoらによって、台湾のウシガエル卵からLECZと同種のRNaseが単離され、以来RC-RNaseとして別個に研究が進められている。<sup>119)</sup>

#### IV. レクザイムの抗腫瘍作用機序

LECZの抗腫瘍作用は、*in vitro* 及び *in vivo* 両方で報告されており、<sup>114)</sup> その効果は、1) 細胞表面のシアル酸複合体を認識するレクチン活性と、2) 細胞生存に必須であるRNase活性が協働することにより発揮されると考えられている。<sup>120)</sup> LECZの細胞表面への結合は、シアロ糖タンパク質の共存や細胞のシアリダーゼ処理により阻害され、それによりLECZの細胞毒性も減弱される。<sup>114)</sup> Benzyl- $\alpha$ -N-acetylgalactosamine (benzyl-GalNAc) を細胞培養液に添加することにより、細胞はLECZに対し抵抗性を示すようになることから、LECZの細胞膜への結合にO-結合型糖鎖が関与することが示唆されている。<sup>131)</sup> Nittaらは、LECZ耐性マウスP388細胞(RC-150)を樹立した。<sup>115)</sup> 親細胞株であるP388細胞に対するLECZの50%増殖阻害濃度は3.1~6.2  $\mu$ Mであるのに対し、RC-150の細胞増殖はLECZ濃度100  $\mu$ Mにおいても変化しなかった。RC-150細胞の増殖能はP388とほぼ同等であり、LECZの凝集活性及びシアリダーゼ処理により切り出されるシアル酸レベルにおいても、両細胞間で違いは認められなかった。一方、ダンシルカダベリンでラベルされたLECZを用いた実験から、LECZはP388細胞内へ取り込まれるが、RC-150細胞内には取り込まれないことが明らかとなった。<sup>115)</sup> このことは、LECZが抗腫瘍作用を発揮する機序に、細胞表面への結合のみでなく細胞内へ

取り込みも重要であることを示している。

我々は近年、種々のヒト白血病細胞に対するLECZの有効性及びその作用機序の検討を行った。<sup>122-124)</sup> 現行のがん治療に用いられているエトポシドやドキシソルビシンは、P糖タンパク質を過剰発現した多剤耐性細胞に対して細胞毒性を発揮しない一方、LECZは多剤耐性細胞を含む数種の白血病細胞に対し、強い細胞毒性を示した。<sup>122)</sup> LECZ処理細胞では、核の断片化・凝縮、ホスファアチジルセリンの細胞膜外層側への移行、カスパーゼファミリーの活性化及びDNAの断片化など、典型的なアポトーシス様変化が観察された。また、そのDNA断片化は、全カスパーゼ阻害剤であるz-VAD-fmkにより完全に抑制され、LECZがカスパーゼの活性化に依存したアポトーシスを誘導することが明らかになった。<sup>122)</sup> LECZによるアポトーシス誘導機序の詳細を、ミトコンドリア膜電位低下検出試薬である5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1)を用いて検討した結果、デスレセプター経路でアポトーシスを誘導するtumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) 処理細胞において、そのミトコンドリア膜電位の低下がz-VAD-fmk前処理によりほぼ完全に抑制されるのに対し、LECZ処理細胞ではz-VAD-fmkによる影響を受けず、すなわちLECZがカスパーゼ活性化の上流で強いミトコンドリア障害を引き起こすことが示され、LECZ誘導アポトーシスにおけるミトコンドリア経路の重要性が明らかとなった。<sup>122)</sup> さらに、シグナル伝達解析の結果から、近年がん治療の標的として注目される小胞体ストレス経路もまた、LECZ誘導アポトーシスに関与している可能性が明らかになった。LECZ処理細胞では、calnexin and immunoglobulin heavy chain binding protein/glucose regulated protein 78 (Bip/GRP78)の発現上昇やカスパーゼ-4の活性化など、小胞体ストレスのマーカーが観察され、さらに、カスパーゼ-4特異的阻害剤であるz-LEVD-fmkの前処理により、LECZ誘導DNA断片化が減弱された。LECZ誘導アポトーシスにおけるミトコンドリア経路または小胞体ストレス経路それぞれの寄与及び関連を検討したところ、両者はカスパーゼ-9及び-4それぞれに特異的な阻害剤の影響を受けず、独立して誘導されることが示唆された。また、小胞体ストレス性アポトーシスの誘導剤、タブシガ

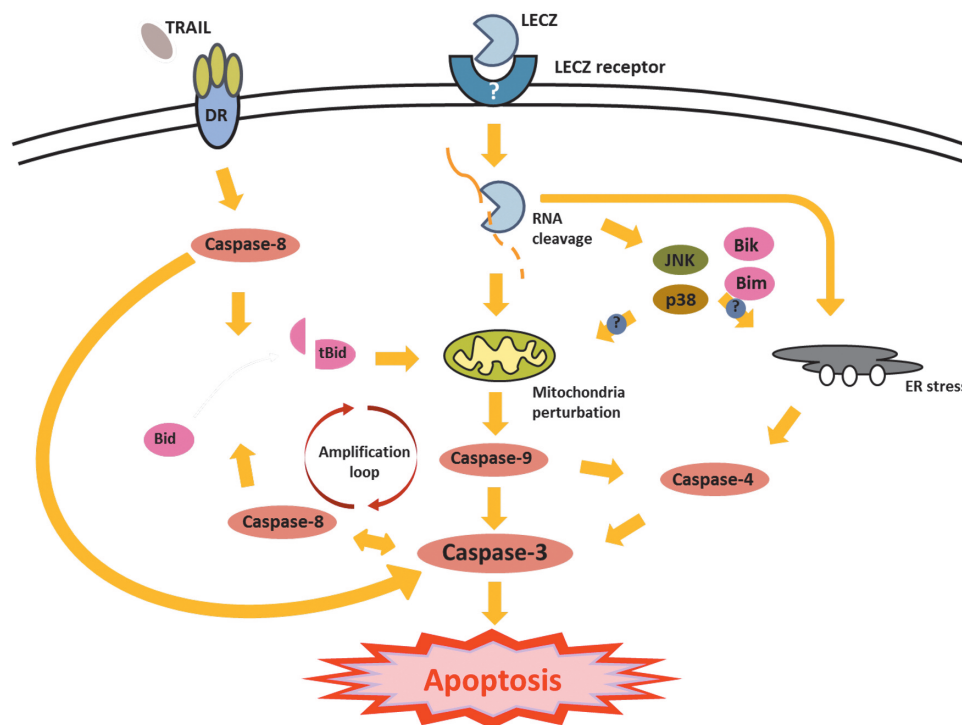


Fig. 4. Hypothetic Leczyme-induced apoptotic pathway

Leczyme induces tumor-selective apoptosis through a certain LECZ receptor by multiple cellular signaling pathway including "caspase amplification loop", in which RNA is its target.

ルギンを用いた比較研究から、LECZ 誘導アポトーシスではミトコンドリア経路の寄与が大きいことが明らかになっている。<sup>123)</sup> さらに、ヒト白血病 Jurkat 細胞及びヒト悪性中皮腫 H28 細胞にて行った実験結果から、これらの細胞では LECZ 処理により JNK 及び p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) が活性化され、また、LECZ 処理 H28 細胞では Bik や Bim などの Bcl-2 ファミリータンパクの発現上昇が確認されたことから、これらの活性化が LECZ 誘導アポトーシスに関する可能性が示唆された。<sup>122,125)</sup>

LECZ は他の薬剤との併用により、相乗的な抗腫瘍効果を示すことが報告されている。Wang らのグループは、乳がん細胞や肝がん細胞を用い、interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) が LECZ の細胞死誘導効果を増強することを明らかにし、その機序として、IFN- $\gamma$  処理により LECZ の細胞表面への結合が増加する可能性や、細胞の分化状態の変化が関与する可能性を議論している。<sup>126,127)</sup> さらに、近年我々は、TRAIL が LECZ と相乗的な相互作用を示すことを発見した。<sup>125)</sup> 両薬剤共処理による相乗的な抗腫瘍効果は正常組織由来細胞では観察されず、悪性細胞選択的であった。その作用機序解析の結果、

Bcl-2 ファミリータンパクである Bid の切断が増強していることが判明し (Bid は切断されることにより活性化し、ミトコンドリアからのシトクロム c の放出、すなわちミトコンドリア障害を促進させる分子)、Bid の発現を抑制することでその相乗的抗腫瘍効果は減弱された。このことから、LECZ と TRAIL の併用では Bid の切断上昇を介したアポトーシスシグナルの増強が起こることが示された。<sup>125)</sup>

これまでの知見をまとめると、LECZ によって誘導されるアポトーシスシグナルの伝達は Fig. 4 のようであると考えられる。LECZ はがん細胞表面に結合後取り込まれ、細胞内 RNA を分解する。そのストレスは、ミトコンドリア障害と小胞体ストレスを独立に引き起こし、カスパーゼカスケードが活性化してアポトーシスが実行される。さらに、そのシグナル伝達には JNK や p38 の MAPK、また、Bik、Bim などの Bcl-2 ファミリー分子の関与が示唆される。また、TRAIL との併用では、Bid の切断、ミトコンドリア障害、カスパーゼの活性化で構成されるアポトーシスシグナルの amplification loop が活性化され、相乗的なアポトーシス誘導効果が引き起こされるものと考えられる。以上のように、LECZ は RNA を標的とした



Table 2. Tumor cell susceptibility on Leczyme treatment

Cells high sensitive to Leczyme			Cells low or non-sensitive to Leczyme		
Cell lines	Characteristics	Refs	Cell lines	Characteristics	Refs
P338	mouse leukemia	114, 115 124, 128	HFW	normal human fibroblast	129
L1210	mouse leukemia	114	NIH3T3	normal mouse embryonic fibroblast	129
S-180	mouse ascites	114	BHK21	normal hamster fibroblast	129, 133
Mep II	mouse ascites	114	HS-68	normal human HS-68 foreskin fibroblast	127
Ehrlich	mouse ascites	114	MDA-MB-231	human breast carcinoma cells	131
CaSki	human cervical carcinoma	129	ZR-75-30	human breast carcinoma cells	131
HA-22T	human hepatocellular carcinoma	129	MCF-7	human breast carcinoma	128
KB	human oral carcinoma	129	Daudi	human Burkitt's lymphoma	128
SK-Hep-1	human hepatocellular carcinoma	126, 127 129	Raji	human Burkitt's lymphoma	128
Hela	human cervical carcinoma	129	NHDF	normal human epidermal fibroblasts	128
J5	human hepatocellular carcinoma	126	NHEM	normal human epidermal melanocytes	128
Hep G2	human hepatocellular carcinoma	126	NHEK	normal human keratinocytes	128
MCF-7	human breast carcinoma	127, 128 132	Met-5A	normal human mesothelial cells	125
HL-60	human promyelocytic leukemia	127, 128 132			
ZR-75-1	human breast carcinoma cells	131			
Jurkat	human T-cell leukemia	122			
K562	human erythroleukemia	122, 128			
K562	human P-glycoprotein-overexpressing K562 cells	122			
U937	human promyelocytic leukemia	122			
Raji	human Burkitt's lymphoma	122			
H28	human malignant mesothelioma	125			
Meso-1	human malignant mesothelioma	125			
Meso-2	human malignant mesothelioma	125			

新しい機序による抗腫瘍効果を示し、新分野の抗がん剤となり得ると期待される。

## V. レクザイムの臨床応用への可能性

先にも述べたように LECZ の独特な抗腫瘍作用は、1980 年代から研究者の関心を集め、国内外を問わず、その新規抗がん剤としての応用を検討する研究が行われてきた。これまで LECZ に対する感受性が報告されている細胞種を Table 2 にまとめた。LECZ は多種類のがん腫 [上皮腫 (子宮, 肝, 口腔, 及び乳がん), 肉腫, 中皮腫, 白血病 (T-細胞性, 前骨髄球性及び赤芽球性白血病) 及びリンパ腫] に対し強い細胞毒性を示すことが知られている一方、注目すべきことに、これまでに試験された正常組織由来細胞 (線維芽細胞, メラニン細胞, 角化細胞及び中皮細胞) はすべて LECZ に対し低感受性であることがそれぞれの報告で明らかになっている。一部の細胞種 (MCF-7, Daudi 及び Raji) については報告間で差異があるが、これらの細胞は他のがん細胞に比べ感受性が低いと

考えられる。この LECZ のがん細胞に対する高い選択性は特筆すべきであるが、その原因はまだまだ不明である。しかし、種々の研究から、LECZ の細胞毒性に影響を及ぼすいくつかの要因が報告されている。上述したように、ムチンなどのシアル酸複合体や細胞のシアリダーゼ処理は、LECZ の細胞表面への結合を阻害し、また、細胞内への取り込み機構の阻害も LECZ の細胞毒性を減弱させる。<sup>114,115)</sup> 近年の研究で、heatshock protein (HSP) 70 ファミリー分子が、LECZ 高感受性細胞の表面に発現し、LECZ 処理によりその局在が変化すること、並びにその発現抑制は LECZ の細胞表面への結合には影響しないが、LECZ の細胞毒性を減弱させることから、それらの分子が LECZ の細胞内取り込み機構に参与する可能性が明らかになっている。<sup>124,128)</sup> さらに、Japanese encephalitis virus (JEV) に感染した細胞は、LECZ に高い感受性を示すようになることが報告されている。<sup>133)</sup> LECZ は正常ハムスター線維芽細胞, BHK-21 細胞には細胞毒性を示さないが、JEV に感染した BHK-21 細

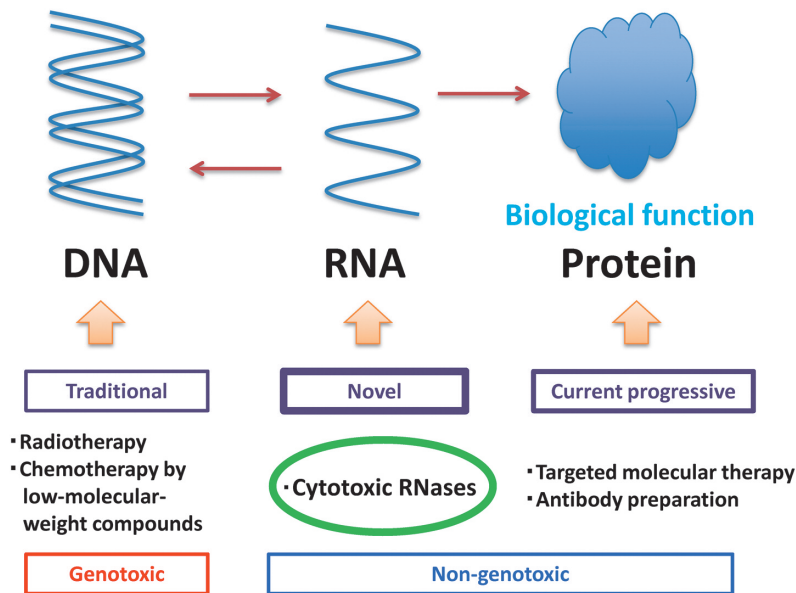


Fig. 5. RNA could be effectively targeted by cytotoxic RNases

胞は LECZ に高感受性になり、その際、何らかの機序により LECZ の細胞内取り込み量が増加していることが明らかになった。細胞内 RNA 切断後にアポトーシスシグナルを伝達するステップでは、TRAIL との共処理により、Bid 切断上昇を介したアポトーシスシグナルの増強が引き起こされることを述べたが、その一方で、Bcl-2 の過剰発現がミトコンドリア障害の抑制を介してアポトーシスシグナルを減弱することも報告されている。<sup>131)</sup> また、その作用機序は不明ながら、エストロゲンレセプターを発現する乳がん細胞 (MCF-7 及び ZR-75-1) は、そのレセプターを発現しない細胞 (MDA-MB-231 及び ZR-75-30) よりも LECZ に対する感受性が高く、<sup>131)</sup> 白血病細胞や肝がん細胞では、未分化な細胞ほど LECZ に高感受性であるとされている。<sup>126,132)</sup> 注目すべきことに、これらいずれの報告においても、LECZ の細胞選択性は細胞の増殖速度とは相関せず、高いがん細胞選択性を示す何らかの要因を LECZ が認識できることが示唆されている。このように、LECZ は特異的ながん細胞選択性をもち、その機序をより詳細に明らかにすることにより、新規の抗がん剤開発やがん治療標的の発見に寄与できると考えられる。

現行のがん治療では、細胞選択性の問題による副作用、耐性の出現が大きな課題となっている。今日、分子標的薬や抗体医薬によってその克服が試みられているが、いずれもいまだ発展途上の分野であり、従来の DNA を標的とした薬剤が多く使

用されているのが現状である。LECZ の抗がん剤としての応用は“RNA を標的とする”新しいがん治療戦略となる (Fig. 5)。LECZ を応用する利点として、1) 多種類のがんに対して細胞毒性が報告されている、2) 高いがん細胞選択性を示す、3) 他の薬剤との併用で相乗的な抗腫瘍効果が期待できる、4) 新規の作用機序による抗がん作用をもつ、5) 従来の DNA 障害型薬剤や放射線治療と異なり遺伝毒性がない、6) 低分子化合物と交差耐性がなく、多剤耐性細胞にも強い細胞死誘導効果を示し、また、RNA を標的とすることから遺伝子発現を介した耐性獲得を克服できる可能性がある、などが挙げられる。

LECZ はレクチン活性とリボヌクレアーゼ活性を併せ持つタンパク質である。レクチンは糖鎖を特異的に認識する性質から、新規腫瘍マーカーの探索ツールや診断薬などへの応用が期待されており、アフィニティークロマトグラフィー、レクチン染色、レクチンアレイ解析等の糖鎖解析技術に応用され、新規腫瘍マーカー候補分子の発見などに貢献している。<sup>134,135)</sup> また、病態に付随した糖タンパク質の量的変動を、特異的なモノクローナル抗体で、糖鎖修飾という質的变化として改変レクチンプローブで検出するという新しい診断法も提案されている。<sup>136-139)</sup> さらに、細胞毒性を示すコンカナバリン A や、ヤドリギレクチン (mistletoe lectin) は、それら自体を抗がん剤として応用しようとする研究が現在も行われている。<sup>140,141)</sup> このようにレ

クチンには、糖鎖解析研究におけるツールとしてのみならず、がん治療における強力な武器としての役割も期待されている。細胞毒性をもつ RNase のがん治療への応用を目指して、現在でも新規 RNase を探索する研究が生物種を問わず行われており、ホンシメジ由来 LS RNase,<sup>142)</sup> ニガウリ由来 RNase MC,<sup>13)</sup> ヒラタケ由来 RNase pol,<sup>144)</sup> などに抗腫瘍活性が見いだされている。また、前述したように抗体と RNase を融合させることで特定のがん細胞に対する選択性を高めようとする試みや、<sup>144,145)</sup> 核移行シグナルを付加することにより RNase の細胞内局在を変化させ、その作用を増強させる研究、<sup>65)</sup> さらにヒト血清アルブミンと融合させ、特定の臓器への蓄積を防ぐことで薬物動態学的に副作用を軽減させようとする研究など、<sup>104)</sup> 最新の遺伝子工学・タンパク質工学技術を駆使し、がん細胞選択性あるいは抗腫瘍活性を増強するようなタンパク質変異体、融合タンパク質の作製を試みる研究が盛んに行われている。2009年に米国で固形がんに対する臨床試験が開始された EVade™ RNase (Quintessence Biosciences Inc; <http://www.quintbio.com/>) はヒト由来 RNase 1 の変異体で、ヒト細胞内 RI に対する親和性を低下させた変異体である。LECZ はヒト RI に結合しないことが既に明らかになっており、<sup>117)</sup> この特性からも治療応用が期待される他の RNase と比肩し得るものと考えられる。

## おわりに

がんの生化学において、かつて腫瘍マーカーというテーマが一世を風靡した時代があった。がん細胞で特異的に出現あるいは消失する細胞表面分子のことで、その多くは糖鎖が主体であるが、当時はたして幾人の研究者が将来腫瘍マーカーとして RNA が研究される時代を予測したであろうか。今年 (2014 年) 8 月、本邦において新エネルギー・産業総合開発機構 (NEDO) が主体となり、「13 種類のがんを 1 回の採血で診断する」という極めて画期的かつ野心的な産学官連携プロジェクト (国立がん研究センター、東レ株式会社他) が始動し、衆目を集めた。<sup>146)</sup> DNA マイクロアレイを用い、がん組織から放出されるエクソソーム中に存在する miR-21 に代表されるがん特異的 miRNA を検出し、肉腫や神経膠腫を含むがんあるいは認知症の早期発見を目指すという。最近、このような

がん特異的 miRNA に対して oncogene ならぬ “OncomiR” という呼称も提唱されており、<sup>147)</sup> この分野の研究が今後急速に発展していくことは間違いない。本稿で取り上げた ONC が、その RNase 活性をもって特定の miRNA をダウンレギュレートするという報告<sup>148)</sup> があるように、RNase の標的として従来の tRNA や rRNA からより小さな、そしてがんやその他の疾患に特異的な miRNA へと目線を移した研究が既に始められている。一方、自然免疫研究の分野では、細胞内のインターロイキン 6 をコードしている mRNA に結合し、分解する活性をもつ RNase として regulatory RNase-1 (Regnase-1) という酵素が見いだされ、自己免疫性の炎症性疾患の発症を抑制するために重要なファクターであると推測されている。<sup>149)</sup> このように現在 RNase 研究にはまた新たなステージが拡がりつつあるが、その中で著者らに与えられた武器である LECZ が、昨今流行している二刀流ともいふべき活性を活かし、がんの臨床により効果的な貢献ができるよう鋭意研究を進めていきたいと考えている。

**謝辞** 本総説中で述べた当研究室関連の研究は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の助成により行われた。

## REFERENCES

- 1) Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., *Nature*, **391**, 806–811 (1998).
- 2) Bartel D. P., *Cell*, **116**, 281–297 (2004).
- 3) Stefani G., Slack F. J., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 219–230 (2008).
- 4) <http://www.riken.jp/pr/press/2005/>
- 5) Dunham I., et al. (ENCODE Project Consortium), *Nature*, **489**, 57–74 (2012).
- 6) Bolton E. M., Tuzova A. V., Walsh A. L., Lynch T., Perry A. S., *Clin. Cancer Res.*, **20**, 35–43 (2014).
- 7) Suzuki H., Maruyama R., Yamamoto E., Kai M., *Front. Genet.*, **258**, doi: 10.3389/fgene.2013.00258 (2013).
- 8) Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. J., *Nature*, **409**, 363–366 (2001).
- 9) Lee Y. S., Nakahara K., Pham J. W., Kim K., He Z.,



- Sontheimer E. J., Carthew R. W., *Cell*, **117**, 69–81 (2004).
- 10) Aravind L., Koonin E. V., *Methods Enzymol.*, **341**, 3–28 (2001).
- 11) Deshpande R. A., Shankar V., *Crit. Rev. Microbiol.*, **28**, 79–122 (2002).
- 12) Fang E. F., Ng T. B., *Biochim. Biophys. Acta*, **1815**, 65–74 (2011).
- 13) Fang E. F., Zhang C. Z., Fong W. P., Ng T. B., *Apoptosis*, **17**, 65–74 (2012).
- 14) D'Alessio G., “Ribonucleases” ed. by Nicholson A. W., *Nucleic Acids and Molecular Biology* 26, Springer, Heidelberg, pp.1–34 (2011).
- 15) Smyth D. G., Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.*, **238**, 227–234 (1963).
- 16) Takahashi K., *J. Biol. Chem.*, **240**, 4117–4119 (1963).
- 17) Kawata Y., Sakiyama F., Tamaoki T., *Eur. J. Biochem.*, **176**, 683–697 (1989).
- 18) Endo Y., Wool I. G., *J. Biol. Chem.*, **257**, 9054–9060 (1982).
- 19) Parry S. K., Liu Y., Clark A. E., Newbiggin E., “Ribonuclease, Structure and Functions” eds. by D'Alessio G., Riordan J. F., Academic Press, New York, pp.131–162 (1997).
- 20) Chan Y. L., Endo Y., Wool I. G., *J. Biol. Chem.*, **258**, 12768–12770 (1983).
- 21) Endo Y., Mitsui K., Motizuki M., Tsurugi K., *J. Biol. Chem.*, **262**, 5908–5912 (1982).
- 22) Wool I. G., *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 14–17 (1984).
- 23) Beintema J. J., Fitch W. M., Carsana A., *Mol. Biol. Evol.*, **3**, 262–275 (1986).
- 24) Beintema J. J., Breukelman H. J., Carsana A., Furia A., “Ribonuclease, Structure and Functions” eds. by D'Alessio G., Riordan J. F., Academic Press, New York, pp.245–269 (1997).
- 25) Raines R. T., *Chem. Rev.*, **98**, 1045–1066 (1998).
- 26) Cho S., Beintema J. J., Zhang J., *Genomics*, **85**, 208–220 (2005).
- 27) Beintema J. J., Wietzes P., Weickmann J., Glitz J. J., *Anal. Biochem.*, **136**, 48–64 (1984).
- 28) Libonati M., Sorrentino S., *Meth. Enzymol.*, **341**, 234–248 (2001).
- 29) Potenza N., Salvatore V., Migliozi A., Martone V., Nobile V., Russo A., *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2906–2913 (2006).
- 30) Slifman N. R., Loegering D. A., McKean D. J., Gleich G. J., *J. Immunol.*, **137**, 2913–2917 (1986).
- 31) Fredens K., Dahl R., Venge P., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **70**, 361–366 (1982).
- 32) Domachowske J. B., Dyner K. D., Adams A. G., Leto T. L., Rosenberg H. F., *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3358–3363 (1998).
- 33) Gulberg U., Widegren B., Arnason U., Egesten A., Olsson I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**, 1239–1242 (1986).
- 34) Navarro S., Aleu J., Jimenez M., Boix E., Cuchillo C. M., Nogues M. V., *Cell Mol. Life Sci.*, **65**, 324–337 (2008).
- 35) Lehrer R. I., Szklarek D., Barton A., Ganz T., Hamann K. J., Gleich G. J., *J. Immunol.*, **142**, 4428–4434 (1989).
- 36) Shapiro R., Fett J. W., Strydom D. J., Vallee B. L., *Biochemistry*, **25**, 7255–7264 (1986).
- 37) Zhou H-M., Strydom D. J., *Eur. J. Biochem.*, **217**, 401–410 (1993).
- 38) Fett J. W., Strydom D. J., Lobb R. R., Alederman E. M., Bethune J. L., Riordan J. F., Vallee B., *Biochemistry*, **24**, 5480–5486 (1985).
- 39) Riordan J. F., “Ribonuclease, Structure and Functions” eds. by D'Alessio G., Riordan J. F., Academic Press, New York, pp.446–466 (1997).
- 40) Strydom D. J., *Cell Mol. Life Sci.*, **54**, 811–824 (1998).
- 41) Rosenberg H. F., Dyner K. D., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3507–3513 (1996).
- 42) Harder J., Schroder J. M., *J. Biol. Chem.*, **277**, 46779–46784 (2002).
- 43) Huang Y. C., Lin Y. M., Chang T. W., Wu S. J., Lee Y. S., Chang M. D., Chen C., Wu S. H., Liao Y. D., *J. Biol. Chem.*, **282**, 4626–4633 (2007).
- 44) Torrent M., Badia M., Moussaoui M., Sanchez D., Nogues M. V., Boix E., *FEBS J.*, **277**, 1713–1725 (2010).
- 45) Zhang J., Dyer K. D., Rosenberg H. F., *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1169–1175 (2002).
- 46) Rudolph B., Podschun R., Sahly H., Schubert S., Schroder J. M., Harder J., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 3194–3196 (2006).
- 47) Rosenberg H. F., Dyer K. D., *J. Biol. Chem.*, **270**, 21539–21544 (1995).
- 48) Moroianu J., Riordan J. F., *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun.*, **203**, 1765–1772 (1994).
- 49) Moroianu J., Riordan J. F., *Biochemistry*, **33**, 12535–12539 (1994).
- 50) Xu Z. P., Tsuji T., Riordan J. F., Hu G. F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, 287–292 (2002).
- 51) Kishimoto K., Liu S., Tsuji T., Olson K. A., Hu G. F., *Oncogene*, **24**, 445–456 (2005).
- 52) Ledoux L., *Nature*, **175**, 258–259 (1955).
- 53) Ledoux L., *Nature*, **176**, 36–37 (1955).
- 54) Aleksandrowicz J., *Lancet*, **272**, 420–422 (1958).
- 55) de Lamirande, *Nature*, **192**, 52–54 (1961).
- 56) Roth J. S., *Cancer Res*, **23**, 657–666 (1963).
- 57) Gribnau A. A. M., Schoenmaker J. G. G., Bloemendal H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 48–52 (1969).
- 58) Lee F. S., Vallee B. L., *Prog. Nucleic Acid Res.*, **44**, 1–30 (1993).
- 59) Hofsteenge J., “Ribonuclease, Structure and Functions” eds. by D’Alessio G., Riordan J. F., Academic Press, New York, pp.621–658 (1997).
- 60) Kobe B., Deisenhofer J., *Nature*, **366**, 751–756 (1993).
- 61) Lee F. S., Shapiro R., Vallee B. L., *Biochemistry*, **28**, 225–230 (1989).
- 62) Vicentini A. M., Kieffer B., Matthies R., Meyhack B., Hemmings B. A., Stone S. R., Hofsteenge J., *Biochemistry*, **29**, 8827–8834 (1990).
- 63) Dickson K. A., Haigis M. C., Raines R. T., *Prog. Nucleic Acid Res.*, **26**, 3358–3363 (2005).
- 64) Leich F., Stohr N., Rietz A., *J. Biol. Chem.*, **282**, 27640–27646 (2007).
- 65) Bosch M., Benito A., Ribo M., Puig T., Beaumelle B., Vilanova M., *Biochemistry*, **43**, 2167–2177 (2004).
- 66) Ardelt W., Mikulski S. M., Shogen K., *J. Biol. Chem.*, **266**, 245–251 (1991).
- 67) Singh U. P., Ardelt W., Saxena S. K., Holloway D. E., Vidunas E., Lee H. S., Saxena A., Shogen K., Acharya K. R., *J. Mol. Biol.*, **371**, 93–111 (2007).
- 68) Ardelt W., Shogen K., Drazynkiewicz Z., *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **9**, 215–225 (2008).
- 69) Mosimann S. C., Ardelt W., James M. N. G., *J. Mol. Biol.*, **236**, 1141–1153 (1994).
- 70) Leland P. A., Staniszewski K. E., Kim B., Raines R. T., *FEBS Lett.*, **477**, 203–207 (2000).
- 71) Boix E., Wu Y., Vasandani V. M., Saxena S. K., Ardelt W., Ladner Y., Youle R. J., *J. Mol. Biol.*, **257**, 992–1007 (1996).
- 72) Wu Y., Mikulski S. M., Ardelt W., Rybak S. M., Youle R. J., *J. Biol. Chem.*, **268**, 10686–10693 (1993).
- 73) Rutkoski T. J., Raines R. T., *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **9**, 185–189 (2008).
- 74) Kobe B., Deisenhofer J., *J. Mol. Biol.*, **264**, 1028–1043 (1996).
- 75) Haigis M. C., Raines R. T., *J. Cell Sci.*, **116**, 313–324 (2003).
- 76) Dickson K. A., Raines R. T., *Biochemistry*, **48**, 5051–5053 (2009).
- 77) Notomista E., Mancheno J. M., Crescenzi O., Di Donato A., Gavilanes J., D’Alessio G., *FEBS J.*, **273**, 3687–3697 (2006).
- 78) Smith M. R., Newton D. L., Mikulski S. M., Rybak S. M., *Exp. Cell Res.*, **247**, 220–232 (1999).
- 79) Iordanov M. S., Ryabinina O. P., Wong J., Dinh T. H., Newton D. L., Rybak S. M., Magun B. E., *Cancer Res.*, **60**, 1983–1994 (2000).
- 80) Tsai S. Y., Ardelt B., Hsieh T. C., Darzynkiewicz Z., Shogen K., Wu J. M., *Int. J. Oncol.*, **25**, 1745–1752 (2004).
- 81) Suhasini A. N., Sirdeshmukh R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **363**, 304–309 (2007).
- 82) Deptala A., Halicka H. D., Ardelt B., Ardelt W., Mikulski S. M., Shogen K., Darzynkiewicz Z., *Int. J. Oncol.*, **13**, 11–16 (1998).
- 83) Ardelt B., Ardelt W., Darzynkiewicz Z., *Cell Cycle*, **2**, 22–24 (2003).
- 84) Zhao H., Ardelt B., Ardelt W., Shogen K., Darzynkiewicz Z., *Cell Cycle*, **7**, 3258–3261 (2008).
- 85) Saxena A., Saxena S. K., Shogen K., *Anticancer Res.*, **29**, 1067–1071 (2009).
- 86) Iordanov M. S., Wong J., Newton D. L., Rybak S. M., Bright R. K., Flavell R. A., Davis R. J., Magun B. E., *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, **4**, 122–128 (2000).
- 87) Michaelis M., Cinatl J., Anand P., Rothweiler F., Kotchetkov R., von Deimling A., Doerr H. W., Shogen K., Cinatl J. Jr., *Cancer Lett.*, **250**, 107–116 (2007).
- 88) Mei Y., Young J., Liu H., Shi Y., Meinkoth J., Dreyfuss G., Yang X., *Mol. Cell*, **37**, 668–678 (2010).
- 89) Porta C., Paglino C., Mutti L., *Biol. Targets Ther.*, **2**, 601–609 (2008).
- 90) Lee I., Shogen K., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **62**, 337–346 (2008).
- 91) Ribo M., Benito A., Vilanova M., “Ribonucleases” ed.

- By Nicholson A. W., *Nucleic Acids and Molecular Biology* 26, Springer, Heidelberg, pp.55–88 (2011).
- 92) D'Alessio G., Donatto A. D., Mazzarella L., Piccoli R., "Ribonuclease, Structure and Functions" eds. by D'Alessio G., Riordan J. F., Academic Press, New York, pp.383–413 (1997).
- 93) Youle R. J., D'Alessio, "Ribonuclease, Structure and Functions" eds. by D'Alessio G., Riordan J.F., Academic Press, New York, pp.491–514 (1997).
- 94) Carreras E., Boix E., Navarro S., Rosenberg H. F., Cuchillo C. M., Nogues M. V., *Mol. Cell Biochem.*, **272**, 1–7 (2005).
- 95) Merlino A., Avella G., Di Gaetano S., Arciello A., Piccoli R., Mazzarella L., Sica F., *Protein Sci.*, **18**, 50–57 (2009).
- 96) Gotte G., Testolin L., Costanzo C., Sorrentino S., Armato U., Libonati M., *FEBS Lett.*, **415**, 308–312 (1997).
- 97) Leich F., Stohr N., Rietz A., Ulbrich-Hofmann R., Arnold U., *J. Mol. Biol.*, **358**, 1305–1313 (2006).
- 98) Kim J. S., Soucek J., Matousek J., Raines R. T., *Biochem. J.*, **308**, 547–550 (1995).
- 99) Leland P. A., Schultz L. W., Kim B. M., Raines R. T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10407–10412 (1998).
- 100) Futami J., Nukui E., Maeda T., Kosaka M., Tada H., Seno M., Yamada H., *J. Biochem.*, **132**, 223–228 (2002).
- 101) Newton D. L., Hansen H. J., Mikulski S. M., Goldenberg D. M., Rybak S. M., *Blood*, **97**, 528–535 (2001).
- 102) Rybak S. M., Saxena S. K., Ackerman E. J., Youle R. J., *J. Biol. Chem.*, **266**, 21202–21207 (1991).
- 103) Rutkoski T. J., Kink J. A., Strong L. E., Raines R. T., *Transl. Oncol.*, **6**, 392–397 (2013).
- 104) Zhao H. L., Xue C., Du J. L., Ren M., Xia S., Cheng Y. G., Liu Z. M., *J. Control. Release*, **159**, 346–352 (2012).
- 105) Kawauchi H., Sakakibara F., Watanabe K., *Experientia*, **31**, 364–365 (1975).
- 106) Yokota M., Sakakibara F., Kawauchi H., *YAKUGAKU ZASSHI*, **95**, 50–55 (1975).
- 107) Sakakibara F., Takayanagi G., Kawauchi H., Watanabe K., Hakomori S., *Biochim. Biophys. Acta*, **444**, 386–395 (1976).
- 108) Sakakibara F., Takayanagi G., Ise H., Kawauchi H., *YAKUGAKU ZASSHI*, **97**, 855–862 (1977).
- 109) Sakakibara F., Kawauchi H., Takayanagi G., Ise H., *Cancer Res.*, **39**, 1347–1352 (1979).
- 110) Sue H., Takayanagi G., Koseki T., Nitta K., Sakakibara F., Kawauchi H., *YAKUGAKU ZASSHI*, **100**, 706–712 (1980).
- 111) Titani K., Takio K., Kuwada M., Nitta K., Sakakibara F., Kawauchi H., Takayanagi G., Hakomori S., *Biochemistry*, **26**, 2189–2194 (1987).
- 112) Nitta K., Takayanagi G., Kawauchi H., Hakomori S., *Cancer Res.*, **47**, 4877–4883 (1987).
- 113) Kamiya Y., Oyama F., Oyama R., Sakakibara F., Nitta K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Titani K., *J. Biochem.*, **108**, 139–143 (1990).
- 114) Nitta K., Ozaki K., Ishikawa M., Furusawa S., Hosono M., Kawauchi H., Sasaki K., Takayanagi Y., Tsuiki S., Hakomori S., *Cancer Res.*, **54**, 920–927 (1994).
- 115) Nitta K., Ozaki K., Tsukamoto Y., Furusawa S., Ohkubo Y., Takimoto H., Murata R., Hosono M., Hikichi N., Sasaki K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Tsuiki S., Hakomori S., *Cancer Res.*, **54**, 928–934 (1994).
- 116) Okabe Y., Katayama N., Iwama M., Watanabe H., Ohgi K., Irie M., Nitta K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Oyama F., Titani K., Abe Y., Okazaki T., Inokuchi N., Koyama T., *J. Biochem.*, **109**, 786–790 (1991).
- 117) Nitta K., Oyama F., Oyama R., Sekiguchi K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Hakomori S., Titani K., *Glycobiology*, **3**, 37–45 (1993).
- 118) Nitta K., Ozaki K., Tsukamoto Y., Hosono M., Ogawa Y., Kawauchi H., Takayanagi Y., Tsuiki S., Hakomori S., *Int. J. Oncol.*, **9**, 19–23 (1996).
- 119) Liao Y. D., *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1371–1377 (1992).
- 120) Nitta K., *Methods Enzymol.*, **341**, 368–374 (2001).
- 121) Irie M., Nitta K., Nonaka T., *Cell Mol. Life Sci.*, **54**, 775–784 (1998).
- 122) Tatsuta T., Hosono M., Sugawara S., Kariya Y., Ogawa Y., Hakomori S., Nitta K., *Int. J. Oncol.*, **43**, 1402–1412 (2013).
- 123) Tatsuta T., Hosono M., Miura Y., Sugawara S., Kariya Y., Hakomori S., Nitta K., *Int. J. Oncol.*, **43**, 1799–1808 (2013).
- 124) Tatsuta T., Hosono M., Ogawa Y., Inage K.,



- Sugawara S., Nitta K., *Oncol. Rep.*, **31**, 13–18 (2014).
- 125) Tatsuta T., Hosono M., Takahashi K., Omoto T., Kariya Y., Sugawara S., Hakomori S., Nitta K., *Int. J. Oncol.*, **44**, 377–384 (2014).
- 126) Hu C. C., Lee Y. H., Tang C. H., Cheng J. T., Wang J. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 1229–1236 (2001).
- 127) Tang C. H., Hu C. C., Wei C. W., Wang J. J., *FEBS Lett.*, **579**, 265–270 (2005).
- 128) Ogawa Y., Sugawara S., Tatsuta T., Hosono M., Nitta K., Fujii Y., Kobayashi H., Fujimura T., Taka H., Koide Y., Hasan I., Matsumoto R., Yasumitsu H., Kanaly A., Kawsar S. M. A., Ozeki Y., *Glycoconj. J.*, **31**, 171–184 (2014).
- 129) Liao Y. D., Huang H. C., Chan H. J., Kuo S. J., *Protein Exp. Purif.*, **7**, 194–202 (1996).
- 130) Hu C. C., Tang C. H., Wang J. J., *FEBS Lett.*, **503**, 65–68 (2001).
- 131) Tseng H. H., Yu Y. L., Chen Y. L., Chen J. H., Chou C. L., Kuo T. Y., Wang J. J., Lee M. C., Huang T. H., Chen M. H. C., Yiang G. T., *Oncol. Rep.*, **25**, 849–853 (2011).
- 132) Wei C. W., Hu C. C., Tang C. H., Lee M. C., Wang J. J., *FEBS Lett.*, **531**, 421–426 (2002).
- 133) Lee Y. H., Wei C. W., Wang J. J., Chiou C. T., *Antiviral Res.*, **89**, 192–198 (2011).
- 134) Narimatsu H., Sawaki H., Kuno A., Kaji H., Ito H., Ikehara Y., *FEBS J.*, **277**, 95–105 (2010).
- 135) Matsuda A., Kuno A., Matsuzaki H., Kawamoto T., Shikanai T., Nakanuma Y., Yamamoto M., Ohkohchi N., Ikehara Y., Shoda J., Hirabayashi J., Narimatsu H., *J. Proteomics*, **85**, 1–11 (2013).
- 136) Akatsuka A., Ito M., Yamauchi C., Ochiai A., Yamamoto K., Matsumoto N., *Int. J. Immunol.*, **22**, 783–790 (2010).
- 137) Mikami K., Yamaguchi D., Tateno H., Mikami K., Hu D., Qin S. Y., Kawasaki N., Yamada M., Matsumoto N., Hirabayashi J., Ito Y., Yamamoto K., *Glycobiology*, **20**, 310–321 (2009).
- 138) Yamaguchi D., Hu D., Matsumoto N., Yamamoto K., *Glycobiology*, **20**, 348–355 (2009).
- 139) Chen Y., Hu D., Yabe R., Tateno H., Qin S. Y., Matsumoto N., Hirabayashi J., Yamamoto K., *Mol. Biol. Cell*, **22**, 3559–3570 (2011).
- 140) Liu B., Min M. W., Bao J. K., *Autophagy*, **5**, 432–433 (2009).
- 141) Fu L. L., Zhao X., Xu H. L., Wen X., Wang S. Y., Liu B., Bao J. K., Wei Y. Q., *Cell Prolif.*, **45**, 477–485 (2012).
- 142) Zhang R. Y., Zhang G. Q., Hu D. D., Wang H. X., Ng T. B., *Biochem. Genet.*, **48**, 658–668 (2010).
- 143) Kobayashi H., Motoyoshi N., Itagaki T., Tabata K., Suzuki T., Inokuchi N., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1486–1491 (2013).
- 144) Chang C. H., Sapra P., Vanama S. S., Hansen H. J., Horak I. D., Goldenberg D. M., *Blood*, **106**, 4308–4314 (2005).
- 145) Glinka E. M., Edelweiss E. F., Sapozhnikov A. M., Deyev S. M., *Gene*, **366**, 97–103 (2006).
- 146) [http://www.nedo.go.jp/news/press/AA5\\_100304.html](http://www.nedo.go.jp/news/press/AA5_100304.html)
- 147) He L., Thomson J. M., Hemann M. T., Hernando-Monge E., Mu D., Goodson S., Powers S., Cordon-Cardo C., Lowe S. W., Hannon G. J., Hammond S. M., *Nature*, **435**, 828–833 (2005).
- 148) Qiao M., Zu L. D., He X. H., Shen R. L., Wang Q. C., Liu M. F., *Cell Res.*, **22**, 1199–1202 (2012).
- 149) Uehata T., Iwasaki H., Vandenbon A., Matsushita K., Hernandez-Cuellar E., Kuniyoshi K., Satoh T., Mino T., Suzuki Y., Standley D. M., Tsujimura T., Rakugi H., Isaka Y., Takeuchi O., Akira S., *Cell*, **153**, 1036–1049 (2013).