

東北医科薬科大学

審査学位論文（博士）要旨

氏名（本籍）	サトウ トシキ 佐藤 稔之（秋田県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博薬学第6号
学位授与の日付	平成30年3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当
学位論文題名	カエル卵由来シアル酸結合性レクチンの悪性中皮腫治療戦略への応用
論文審査委員	主査 教授 顧 建国
	副査 教授 原 明義
	副査 教授 細野 雅祐

カエル卵由来シアル酸結合性レクチンの 悪性中皮腫治療戦略への応用

東北医科薬科大学大学院薬学研究科

佐藤 稔之

悪性中皮腫は、中皮細胞由来の高悪性度がんであり、罹患者の約 70～80% において、アスベスト暴露歴が報告されている。アスベスト暴露によりどのようにがん化が起こるのかは不明だが、アスベスト暴露から悪性中皮腫の発症まで平均 20～30 年かかるといわれており、今後、国内外で悪性中皮腫患者数が増加することが予測されている。しかし、現在のところの治療選択肢は限られており、化学療法では葉酸代謝拮抗薬 **pemetrexed** と、白金製剤である **cisplatin** の併用レジメンが、米国では 2004 年 2 月に、日本では 2007 年 1 月にそれぞれ標準レジメンとして承認されている。この併用療法により、奏効率、無増悪生存期間、全生存期間、および QOL を改善することが報告されているが、患者のほとんどで治療後 1 年以内のがんの増悪あるいは再発がみられること、薬剤耐性が生じることが明らかになっていることから、新たな治療薬の開発が期待されている。

ウシガエル (*Rana catesbeiana*) 卵由来シアル酸結合性レクチン (**sialic acid binding lectin, cSBL**) は、シアル酸を含む複合糖質と結合するレクチン活性、およびピリミジンヌクレオチドを認識し分解するリボヌクレアーゼ (**RNase**) 活性を併せ持つことで抗腫瘍活性を発揮する多機能性タンパク質である。このレクチンは、多くのがん細胞に対して抗腫瘍活性が認められている一方で、正常細胞に対してはほとんど細胞毒性を示さず、非常に高いがん細胞選択性を持つことを報告してきた。今日汎用されている DNA 障害性薬剤と比較し、RNase の抗腫瘍作用は遺伝毒性を示さないと考えられており、cSBL は RNA をターゲットとした新規作用機序による抗がん剤として期待される。

第一章では、*in vitro* における数種の悪性中皮腫細胞株 (H28, H2452, MESO-1, MESO-4, および MSTO) への cSBL の有効性、既存治療薬との併用効果ならびにその作用機序について解析を行った。その結果、cSBL は最大濃度 (20 μ M) においても、正常細胞 (MeT5A) の生存率を 40% 程度

しか低下させず，一方で，pemetrexed は 10 nM で 50%，cisplatin は 10 μ M で 70% 低下させたことから，cSBL が高いがん細胞選択性を持つことが示された．さらにはがん細胞選択性の指標として，相対的感受性 (RS, がん細胞での IC₅₀ 値と MeT5A での IC₅₀ 値の比) を算出した．RS>1 あるいは <1 のとき，がん細胞選択性がそれぞれ高い，あるいは低いことを示す．H2452, MESO-1, および MESO-4 は pemetrexed (RS: 0.37, 0.06, および 0.06) に対し，また H28, H2452, および MESO-1 は cisplatin (RS: 0.66, 0.24, および 0.26) に対し，それぞれ抵抗性を示したが，これらの細胞株は，cSBL に対して高い感受性を示した．H28 における 2 剤併用効果について検討したところ，pemetrexed + cSBL が既存レジメンと同等以上の抗腫瘍作用および相乗効果を示した．併用時の抗腫瘍メカニズムの検討では，アポトーシスマーカーの増減に有意差はなく，一方で pemetrexed + cSBL では他の併用と比較すると死細胞数が顕著に増加することが明らかになった．そこで細胞周期解析を行ったところ，pemetrexed および cisplatin は細胞周期を停止させ，細胞増殖抑制的に作用するのに対し，cSBL はアポトーシスによる細胞死を誘導していることが示された．併用時にはこの作用はそれぞれ独立して奏効し，ウェスタンブロット法による解析からも pemetrexed の持つ cyclin A の持続的活性化による細胞周期停止作用と cSBL の持つ caspase-3 の活性化を介したアポトーシスの誘導作用が協働していることを示す結果が得られた．

第二章では，異種移植可能な 2 種の悪性中皮腫細胞株 (H2452, MSTO) を用いて異種移植モデルマウスを作成し，*in vivo* における cSBL の抗腫瘍効果の検討を試みた．まず，*in vitro* における抗腫瘍メカニズム解析では，すでに cSBL の作用機序が明らかになっている H28 と同様に，caspase-9, -8, -3 が順次活性化され，アポトーシスが内在性経路により誘導されることが示唆された．*In vivo* における cSBL の効果検討では，通常動物実験に用いられる濃度の pemetrexed と比較すると，cSBL 処理群でより早期に腫瘍の増殖抑制が引き起こされた (H2452 移植マウス：pemetrexed, 47 日目；cSBL, 36 日目，MSTO 移植マウス：pemetrexed, 有意な変化なし；cSBL, 29 日目)．同時に腫瘍増殖抑制が観察される濃度においてマウスの有意な体重変化は見られず，生体への影響 (有害作用) は小さいことが示唆

された。さらに、これらの細胞における pemetrexed あるいは cisplatin との相乗性を検討したところ、第一章と同様に pemetrexed + cSBL の併用が強い抗腫瘍作用および高い相乗効果ならびに薬剤用量減少効果 (Dose Reduction Index, DRI) を示すことが明らかとなった。

第三章では、悪性中皮腫に対する効果が報告されている腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘発リガンド (TRAIL) および上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKIs) と、cSBL との併用効果の検討ならびに治療障壁の一つとなっている pemetrexed 耐性株への各薬剤の効果を比較した。H28 および H2452 に対する効果を検討した結果、pemetrexed および cisplatin と比較し、cSBL, TRAIL, および EGFR-TKIs はいずれも悪性中皮腫細胞に対して高い選択性を示した。また、cSBL および EGFR-TKIs は、細胞株の違いによる増殖抑制効果にほとんど差がないことが明らかとなった。Pemetrexed 耐性株に対して交叉耐性 (H2452-PR に対する cisplatin, cSBL など) が認められたが、H28-PR に対する cisplatin および cSBL, あるいは H2452-PR に対する TRAIL など、耐性株においてより強い細胞増殖抑制効果が認められたケースもあり、耐性克服への糸口がつかめる知見が得られた。また併用効果の検討では、耐性細胞において pemetrexed + cSBL が既存レジメンと比較し pemetrexed の DRI が 2 倍以上高く、耐性細胞株に対しても有効なレジメンとなる可能性が示された。また、3 剤併用では、Combination Index (CI, 薬剤併用効果の指標) および DRI の観点から、pemetrexed + cisplatin + cSBL が最も有効な組み合わせであることが示された。さらに、各薬剤の抗腫瘍メカニズムへの関与が報告されているタンパク質 (p21, cyclin A, Bid, および cleaved caspase 3) についてウェスタンブロット法による解析を行ったところ、pemetrexed + cSBL + TRAIL が、それぞれの薬剤の抗腫瘍メカニズムが相反することなく作用していることが示され、こちらにも有望な治療レジメンとなりうる可能性が示された。

本研究で用いた cSBL がもつ糖鎖結合能と RNase 活性は、近年がんの細胞生物学研究分野で注目されている糖鎖を介した情報伝達制御およびがんの消長に深く関わっていることが明らかとなってきたマイクロ RNA (miRNA) の両方を標的として作用し得る物質であり、あたらしい作用機序

をもつ薬剤として利用できるのではないかと著者は考えている。これまで明らかになっている cSBL の高い悪性腫瘍選択性が、細胞のがん化に伴う糖鎖末端のシアル酸の質的あるいは量的変化によるものか否か、また通常エクソソームと呼ばれる小胞に内包され存在する miRNA に対して cSBL が作用できるか、など解明すべき点は数多く残されており、今後 cSBL の臨床応用を目指す上での課題になると考えられる。

本研究により、悪性中皮腫株および pemetrexed 耐性株に対する cSBL と既存薬剤との相乗的抗腫瘍作用が示唆された。cSBL の抗腫瘍メカニズムのさらなる解明を通してレクチン活性を利用したドラッグデリバリーシステムの構築、miRNA を始めとしたがん関連分子との相互作用を利用した、新しいがん治療戦略への取り組みが加速することを期待する。

主論文 (原著論文)

1. Toshiyuki Satoh, Takeo Tatsuta, Shigeki Sugawara, Akiyoshi Hara, Masahiro Hosono
Synergistic anti-tumor effect of bullfrog sialic acid-binding lectin and pemetrexed in malignant mesothelioma
Oncotarget, 2017, **8** (26), 42466-42477.
2. Takeo Tatsuta, Toshiyuki Satoh, Shigeki Sugawara, Akiyoshi Hara, Masahiro Hosono
Sialic acid-binding lectin from bullfrog eggs inhibits human malignant mesothelioma cell growth *in vitro* and *in vivo*
PloS One, 2018, **13** (1), e0190653.
3. 佐藤 稔之, 立田 岳生, 菅原 栄紀, 原 明義, 細野 雅祐
新規抗がん剤候補としてのレクザイムを用いた悪性中皮腫細胞に対する多剤併用効果の検討
東北医科薬科大学研究誌, **64**, 印刷中