

東北医科薬科大学
審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	サウ 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

目 次

緒論	1
本論	
第一章 悪性中皮腫に対する cSBL および pemetrexed の相乗的抗腫瘍作用	
第一節 序	5
第二節 実験材料および実験方法	
1. 細胞培養	7
2. 材料	7
3. 細胞生存率の測定	8
4. 薬剤併用効果の検討	8
5. アネキシン V の結合とヨウ化プロピジウム (PI) の 取り込みの測定	8
6. Caspase-3 活性の検出	9
7. 細胞増殖への影響	10
8. 細胞周期解析	10
9. 統計解析	10
第三節 結果	
1. 抗腫瘍効果および細胞選択性の比較	11
2. 併用効果の比較検討	14
3. 併用処理時のアポトーシス誘導率	16
4. 併用処理時の caspase-3 活性の変化	17
5. 細胞増殖への影響	18
6. 細胞周期解析	20
第四節 考察	22
第二章 <i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> における cSBL の抗腫瘍効果の検討	
第一節 序	27
第二節 実験材料および実験方法	
1. 細胞培養	29
2. 動物	29
3. 材料	29
4. アネキシン V の結合とヨウ化プロピジウム (PI) の 取り込みの測定	30
5. 核断片化の観察	30
6. Caspases 活性の検出	30
7. 異種移植モデルマウスの作製および動物実験	31

8. 薬剤併用効果の検討	32
9. 統計解析	33
第三節 結果	
1. アポトーシスの観察	33
2. Caspases 活性の検出	35
3. 異種移植モデルマウスにおける cSBL の抗腫瘍作用の検討	37
4. 併用効果の比較検討	39
第四節 考察	42
第三章 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	
第一節 序	45
第二節 実験材料および実験方法	
1. 細胞培養	47
2. 材料	47
3. Pemetrexed 耐性 H28 細胞株 (H28-PR) の樹立	47
4. 細胞生存率の測定	48
5. 薬剤の併用効果の検討	48
6. ウェスタンブロット法	49
第三節 結果	
1. 抗腫瘍効果および細胞選択性の比較	49
2. Pemetrexed 耐性株に対する抗腫瘍効果の比較	51
3. 2 剤併用時の併用効果の検討	54
4. 3 剤併用時の併用効果の検討	57
5. 薬剤用量減少効果の比較	60
第四節 考察	61
総括	66
謝辞	71
引用文献	72
論文目録	86

結 論

がん (cancer) とは、異常な細胞が制御なく分裂し、周囲組織に侵入することがある疾患として定義されている。すなわち、“恒常性”の枠を超えて際限なく増殖する細胞によって形成される病変であり、骨や体の軟部組織などの結合組織や支持組織から発生する肉腫 (sarcoma) と、皮膚や内臓の内外を覆っている上皮組織から発生する癌腫 (carcinoma) に大きく分類される。「がん」を表す「Cancer」は、「かに座」と同じであるが、これは固形腫瘍の切開面が蟹の足のようあらゆる方向に伸びている様を見て、医学の父と呼ばれるヒポクラテス (紀元前 460-370) がギリシャ語で「蟹」を表す「καρκίνος」を用いたのが始まりといわれている。がんは、多くの古代文明の絵画、文書などで取り上げられており、エジプトのミイラの調査からは、骨肉腫の存在が指摘されている。また、最も古い書面による記録として、エジプトの「Edwin Smith Papyrus」が存在し、紀元前 1600 年頃には乳がんが認知されていたことが伺える。^{2,3)} このようにがんは有史以前から病変として認識されていたが、その具体的な研究は 19 世紀以降の医学・生物学の開始とともに始まり、近代の分子生物学、細胞生物学の進歩とともに大きく発展を遂げた。

厚生労働省による人口動態調査によると、日本国内における平成 27 年の死因別死亡数では、がん (悪性新生物) が 372,801 人で第 1 位であり、全死因の約 3 割を占めている。また、年次推移でも、昭和 56 年にそれまで第 1 位だった脳血管疾患に代わり第 1 位となり、その後 30 年以上にわたり増加の一途をたどっている。年齢別にみても、14 歳以下の若年層や、30 歳台以降で悪性新生物による死亡者数が増加している。加齢とともにその割合は増加し、男性では 65~69 歳、女性では 55~59 歳および 60~64 歳がピークとなっている。

がんの治療法には、大きく分けて「手術療法」、「化学療法」、「放射線療法」の 3 種類があり、通常これらを組み合わせて治療が行われている。近年、「免疫療法」などの新たな治療法も開発され、注目を浴びている。従来、化学療法では、DNA の複製・合成などを阻害する代謝拮抗薬やアルキル化剤などが用いられて

きた。これらは直接的に DNA の代謝を阻害するため、高い治療効果を示す反面、盛んに分裂・増殖する正常細胞（皮膚，腸管，骨髄，毛母細胞など）に対しても影響を及ぼし、様々な副作用を示すことが問題となっている。そこで近年汎用されるようになってきたのが、いわゆる「分子標的薬」である。これらの薬剤は、がん細胞特異的であるか、あるいは正常細胞と比較して発現が顕著な特定の分子（主にタンパク質）を標的とした低分子化合物や特異的抗体である。従来の DNA 傷害剤が細胞の殺傷を目的としているため副作用が現れやすいのに対し、分子標的薬はがん細胞の増殖，浸潤，転移などに関わる特定の分子を標的としていることから、正常細胞に対して影響しにくく、重篤な副作用が現れにくいと考えられた。しかし、臨床現場で汎用されるにつれ、例えば gefitinib による間質性肺炎の出現など、⁴⁾ これまで想定されていなかったような副作用の報告が増加してきた。分子標的薬の標的はがん細胞で高発現，機能異常を示している分子ではあるが、これらは正常細胞で全く発現していないわけではなく、ほとんどの分子は細胞が正常な機能を維持するために必要な分子である。そのため、頻度は低いですが、正常細胞に発現しているこれらの分子に薬剤が結合・作用することで、従来の抗がん剤では起こりえなかった副作用が発現すると考えられている。また、分子標的薬の中でも抗体医薬品は、がんに限らずこれまで治療法がなかったような疾患に対しても効果を示す可能性があることから、今後の医療を変革する新たな薬剤として期待されている。一方、他の薬剤と比べ開発コストが非常に高く、さらに従来薬のみならず、分子標的薬同士で併用されることも多いことから、医療費増大の一因となっていることが問題視されている。

日々進歩してきているがん治療の分野で、近年注目されるようになったものが RNA、特にノンコーディング RNA(ncRNA) と呼ばれる分子を標的とした治療法である。ncRNA は古くからその存在が認識されていたが、タンパク質をコードしていないために当初はあまり関心を持たれていなかった。しかし、分析技術の向上により、発見されるようになった数があまりに多いため、何か特別な機能を持つ物質なのではないかと研究が行われるようになった。その結果、ncRNA の一種であるマイクロ RNA(miRNA) が、細胞増殖やアポトーシス制御

など、多岐にわたる機能をもつことが明らかとなった。これまで、生物における生命現象は、タンパク質が担っていると考えられ、DNA → RNA → タンパク質で表現されるセントラルドグマの流れの中で、中継役である RNA を対象とした薬剤の研究は、DNA やタンパク質を対象としたものと比べ、興味の対象から外れていた。しかし、miRNA の発見により、タンパク質発現を制御する RNAこそ、疾患の真の支配者ではないかという新たな概念が生まれることとなり、研究が盛んに行われるようになった。その一つの成果として、2017 年、国立研究開発法人国立がん研究センターより、血液に含まれるごくわずかな miRNA を検出することによるがんの早期発見に関する報告がなされ、⁵⁾ 数年内に新規血液検査の事業化を目指し、臨床研究を行うことが発表された。

がん治療領域において、RNA を主要な標的とする薬剤は現在扱われていないが、リボヌクレアーゼ (RNase) の一部に抗腫瘍活性をもつものが報告されており、現在新規メカニズムを有する治療薬候補として期待されている。RNase はその名の通りリボ核酸分解作用を有する酵素であり、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普遍的に存在する物質である。非常に多くの種類が存在し、エンド型だけでも RNase A, T1, T2, H など、様々なファミリーに分類されている。⁶⁻¹⁰⁾ 抗腫瘍活性を有する RNase は主に RNase A superfamily に属している。¹¹⁻¹³⁾ RNase A はウシ膵臓由来の RNase であり、このファミリーに属する酵素のほとんどが脊椎動物において産生される分泌タンパク質で、配列の中央部に特徴的なペプチドモチーフを有している。これらのタンパク質は、消化酵素あるいは代謝酵素としてだけでなく、様々な生理機能・活性を持つことが明らかとなっているが、その作用は直接的あるいは間接的な RNA 分解作用と関連していることが知られている。

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を認識し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 RNase 活性を併せ持つことで抗腫瘍効果を発揮する多機能性タンパク質である。このタンパク質も前述の RNase A superfamily に分類されている。cSBL 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が、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示すことを、これまで当研究室が報告してきた。がんを始め、様々な疾患で RNA の関与が示唆され始めた昨今の状況を鑑みると、RNA を主要なターゲットとし、高い悪性細胞選択性、殺細胞作用を持つ cSBL は、これまでにない作用機序を有する治療薬として、様々な分野に新たなブレイクスルーを巻き起こすものと期待される。

本研究では、悪性度が高く、今後患者数の増加が見込まれているにもかかわらず、治療法が限られている悪性中皮腫を対象に、他の薬剤との併用を含めた cSBL の有効性を検討し、またその抗腫瘍作用機序の解明を通し、より効果的な cSBL の応用について検討を行った。第一章では、悪性中皮腫治療のキードラッグである pemetrexed, cisplatin と cSBL の効果を比較し、さらにそれらの併用における相乗効果の有無、その作用機序の解明を試みた。第二章では、悪性中皮腫細胞を用いた異種移植マウスを作製し、*in vivo* における cSBL の効果を検証した。第三章では、悪性中皮腫細胞に対しての効果が報告されている数種の分子標的薬 (チロシンキナーゼ阻害薬, TKIs), 腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘発リガンド (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) と cSBL の併用効果の検証, pemetrexed 耐性細胞の構築と耐性株に有効な治療法の模索を行った。

本 論

第一章

悪性中皮腫に対する cSBL および pemetrexed の相乗的抗腫瘍作用

第一節 序

悪性中皮腫は、中皮細胞由来の高悪性度がんであり、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。¹⁴⁻¹⁸⁾ 20 世紀においてアスベストは、工業、建築分野で大規模に使用されてきたが、悪性中皮腫との因果関係は、1960 年代に初めて指摘された。¹⁹⁻²²⁾ 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、悪性中皮腫患者数が増加することが予測されている。²³⁻²⁵⁾ しかし、現在のところ悪性中皮腫の治療法は限られており、キードラッグである葉酸代謝拮抗薬の 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 月にそれぞれ悪性中皮腫の標準レジメンとして承認されている。^{26,27)} Cisplatin 単独療法と比較し、pemetrexed + cisplatin 併用療法は、悪性中皮腫患者の奏効率 (16.7% 対 41.3%)、無増悪生存期間 (3.9 ヶ月対 5.7 ヶ月)、全生存期間 (9.3 ヶ月対 12.1 ヶ月)、および QOL を改善することが報告されているが、²⁶⁾ pemetrexed + cisplatin 併用療法を行った患者のほとんどで、治療後 1 年以内にながんの増悪あるいは再発がみられること、^{28,29)} また薬剤耐性が生じることが明らかになっていることから、³⁰⁾ 悪性中皮腫に対する新たな治療薬の開発が期待されている。

cSBL は、レクチン活性、^{31,32)} RNase 活性、¹³⁾ 抗腫瘍活性³²⁾ を併せ持つ多機能性タンパク質である。cSBL は、白血病細胞、乳がん細胞、悪性中皮腫、肝細胞がんなど、多くのがん細胞株に対して細胞毒性を示すことが報告されて

いる。³³⁻⁴²⁾ また、線維芽細胞、色素細胞、角化細胞、中皮細胞などの正常細胞に対しては、ほとんど細胞傷害作用を及ぼさないことも明らかとなっている。

^{35,36,40,41,43)} cSBL により誘導される細胞死は、(1) シアル酸を含む複合糖質を介した細胞表面への結合、(2) 細胞内への移行、(3) RNA の断片化を介したアポトーシスの誘導、の少なくとも 3 段階を経て引き起こされると考えられている。cSBL によるアポトーシス誘導は、ミトコンドリア異常に起因するが、同時にその RNase 活性が殺細胞作用に必須の要素であることが示されている。

³⁹⁾ また、マウス腹水がん細胞である sarcoma 180, Ehrlich, および Mep 2 細胞をそれぞれ移植した担癌マウスにおいて、cSBL は生体に毒性を示さない濃度で生存期間を延長することが確認されている。³²⁾ 今日汎用されている DNA 障害性薬剤と比較し、RNase の殺細胞作用は遺伝毒性を示さないと考えられていることから、⁴⁴⁾ cSBL は RNA をターゲットとした新しい作用機序を有する抗がん剤として、新規治療薬となる可能性が期待される。

今日、多剤併用化学療法は、抗がん剤の治療効果を増強し、同時に薬剤耐性を防ぐため、多くのがん治療において一般的な手法となっている。cSBL は数種の悪性中皮腫細胞 (NCI-H28 [H28], ACC-MESO-1 [MESO-1], および ACC-MESO-4 [MESO-4]) に対し抗腫瘍効果を示すこと、H28 細胞に対する TRAIL との併用⁴⁰⁾ あるいは肝細胞癌に対するインターフェロン- γ (INF- γ) との併用⁴²⁾ で相乗効果を示すことが報告されている。本章では、cSBL が pemetrexed, cisplatin 以上の腫瘍選択性を示すか、さらに pemetrexed + cSBL が臨床的な標準的治療レジメンである pemetrexed + cisplatin と比較して有効か否かを検討した。

第二節 実験材料および実験方法

1. 細胞培養

悪性中皮腫細胞株 H28, NCI-H2452 (H2452), MSTO-211H (MSTO) および不死化正常中皮由来細胞株 MeT5A は American Type Cell Culture Collection より購入した。悪性中皮腫細胞株 MESO-1 および MESO-4 は、理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室より購入した。H28, H2452, MSTO, MESO-1, および MESO-4 細胞は、10% 非働化牛胎児血清 (FBS, Biosera 社製) を含む RPMI-1640 培地 (日水製薬社製) 中で培養した。MeT5A 細胞は、3.3 nM 上皮成長因子 (EGF), 400 nM hydrocortisone, 870 nM insulin, 20 mM HEPES, 10% FBS を含む Medium 199 with Earle's balanced salt sodium (75 mM L-glutamine, 1.25 g/L sodium bicarbonate を含む, Sigma 社製) を用いて培養した。いずれの細胞も培地に 100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin を加え、37°C, 飽湿, 5% CO₂ 条件下で培養した。

2. 材料

cSBL は既報³¹⁾ に従い, Sephadex G75, DEAE-cellulose, hydroxyapatite および SP-Sepharose を用いた連続クロマトグラフィーにより精製したものをを用いた。Pemetrexed disodium salt heptahydrate は LC Laboratories より, cisplatin は和光純薬工業より購入した。抗 caspase-3 抗体, 抗 cyclin B1 抗体 (D5C10), 抗 cyclin D1 抗体 (92G2), 抗 p21 抗体 (12D1), 抗 Akt 抗体 (11E7) および抗 phospho-Akt 抗体 (Ser473) (D9E) は, Cell Signaling Technology より, 抗 cyclin A 抗体 (H-432) および抗 cyclin E 抗体 (HE12) は Santa Cruz Biotechnology より, 抗 β-actin 抗体は Sigma-Aldrich より, Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体は Zymed より, HRP 標識抗ラビット IgG 抗体は Cerdarlane より購入したものをを用いた。Caspase-Glo™ 3/7 assay は Promega 社より購入した。

3. 細胞生存率の測定

細胞生存率は、WST-8 法を用いて決定した。各細胞を 96-well plate に 5×10^3 cells/well になるように播種し、各薬剤を以下の濃度域で培地中に加え、72 時間培養した。Pemetrexed, 0.1 nM–20 mM ; cisplatin, 1 nM–1 mM ; cSBL, 1 nM–30 μ M. その後、培地中に Cell Count Reagent SF (ナカライテスク社製) を 10 μ L ずつ加え、37°C, 5% CO₂ 下でさらに 1–4 時間培養した。その後、Glomax™-Multi Detection System (Promega 社製) を用いて、450 nM および 600 nM の吸光度を測定した。50% 致死濃度 (IC₅₀) は GraphPad Prism 5.0 software を用いて算出した。

4. 薬剤併用効果の検討

薬剤併用時の生存率の測定は、WST-8 法を用いて行った。H28 細胞を前項と同様に播種し、各処理 72 時間後に吸光度を測定した。薬剤は pemetrexed, cisplatin および cSBL より任意の 2 種を同時に処理し、濃度は前項において算出した IC₅₀ を基に処理濃度比を固定したものを用いた。各併用の処理濃度比および各薬剤の処理濃度は以下の通りである: pemetrexed + cisplatin (1 : 2), pemetrexed + cSBL (20 : 1), cisplatin + cSBL (40 : 1), pemetrexed, 2 nM–400 μ M ; cisplatin, 4 nM–800 μ M ; cSBL, 0.1 nM–20 μ M. 併用効果の指標として、Combination Index (CI) の算出は既報⁴⁵⁾ を参考に CompuSyn software (ComboSyn 社製) を用いて行った。CI の算出は以下の計算式により行った。CI = $(D_{x, \text{comb}})^a / (D_{x, \text{alone}})^a + (D_{x, \text{comb}})^b / (D_{x, \text{alone}})^b$. 計算式において、 $D_{x, \text{comb}}$, $D_{x, \text{alone}}$ は、生存率を x% 低下させる濃度を、a, b は併用に用いた薬剤 (薬剤 a, 薬剤 b) を表している。CI>1 のとき拮抗的、また CI<1 のとき相乗的であることを示す。

5. アネキシン V の結合とヨウ化プロピジウム (PI) の取り込みの測定

アポトーシスの検出は、MEBCYTO apoptosis kit (MBL 社製) を用い、アネキシン V の結合と PI の取り込みにより評価した。12-well plate に H28 細胞を

5×10^4 cells/well になるように播種し、併用時の細胞生存率がいずれの組合わせでも同程度 (約 30%) となる下記濃度で各薬剤の処理を行った：

pemetrexed, 20 μ M ; cisplatin, 40 μ M ; cSBL, 1 μ M. 72 時間後、細胞を回収・染色し、FACScalibur フローサイトメーター (BD 社製) を用いて、蛍光強度を測定し、CELLQuest software (BD 社製) により解析を行った。

6. Caspase-3 活性の検出

Caspase-3 の活性化レベルの検出は、ウェスタンブロット法により行った。6-well plate に H28 細胞を 1×10^5 cells/well になるように播種し、pemetrexed, cisplatin, および cSBL の終濃度がそれぞれ 20 μ M, 40 μ M, および 1 μ M となるように処理した。72 時間後に細胞を回収し、1 tablet/10 mL cComplete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science 社製), 1 tablet/10 mL PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science 社製) を加えた抽出バッファー (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS]) を用い、whole cell lysate を作製した。可溶性タンパク質を回収し、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社製) を用い、タンパク質濃度を測定した。タンパク質は、14% SDS-PAGE により分離し、Immobilon-P Transfer Membrane (Merck Millipore 社製) に転写した。転写膜に対し、Can Get Signal (東洋紡社製) で希釈した一次、二次抗体をそれぞれ処理した。タンパク質バンドは ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare 社製) を用いて検出した。

Caspase-3 の酵素活性は、Caspase-Glo™ 3/7 assay を用いて評価した。White 96-well plate に、H28 細胞を 1.25×10^4 cells/well となるように播種し、pemetrexed, cisplatin, および cSBL の終濃度がそれぞれ 20 μ M, 40 μ M, および 1 μ M となるように処理した。72 時間後、各 well に Caspase-Glo™ Reagent (25 μ L) を加え、30 秒間プレートシェーカーにて攪拌し、37°C, 5% CO₂ 条件下で 1 時間培養した。その後、各 well の発光量を、Glomax™-Multi

Detection System を用いて測定した。

7. 薬剤処理による細胞増殖への影響

細胞増殖は Muse™ Count & Viability Kit (Merck Millipore 社製) を用いて定量した。24-well plate に、H28 細胞を 2.5×10^4 cells/well となるように播種し、pemetrexed, cisplatin, および cSBL の終濃度がそれぞれ 20 μ M, 40 μ M, および 1 μ M となるように処理した。薬剤処理開始時点を 0 時間とし、24 時間ごとに細胞を回収、Muse™ Count & Viability Reagent と混合し (cell : reagent = 1 : 9), Muse™ Cell Analyzer (Merck Millipore 社製) により、生死細胞数をそれぞれ検出し、細胞増殖への影響を評価した。

8. 細胞周期解析

薬剤処理による細胞周期の変化は、CycleTEST™ Plus DNA Reagent Kit (BD Biosciences 社製) を用いて評価した。12-well plate に、H28 細胞を 5×10^4 cells/well となるように播種し、pemetrexed, cisplatin, および cSBL の終濃度がそれぞれ 20 μ M, 40 μ M, および 1 μ M となるように処理した。72 時間後、細胞を回収・染色し、FACScalibur フローサイトメーター (BD 社製) を用いて蛍光強度を測定し、CELLQuest software (BD 社製) により解析を行った。各周期の割合は、Flowing Software 2 を用いて算出した。

細胞周期調節因子 (cyclin A, B1, D1, E, および p21), Akt, および phospho-Akt の発現レベルは、第一章、第二節、第 6 項のウェスタンブロット法により解析した。

9. 統計解析

各実験は少なくとも 3 回ずつの独立した試験を行い、結果の数値を平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表記した。統計解析は、GraphPad Prism 5.0 software を用い、多重比較検定として one-way ANOVA, post-hoc test として Bonferroni test を行った。

第三節 結果

1. 抗腫瘍効果および細胞選択性の比較

上皮性中皮腫細胞 (H2452, MESO-1, および MESO-4), 二相性中皮腫細胞 (MSTO), 肉腫性中皮腫細胞 (H28), および正常中皮細胞 (MeT5A) の生存率に対する cSBL, pemetrexed および cisplatin それぞれの効果を WST-8 法を用いて評価した. いずれの薬剤も悪性中皮腫細胞の生存率を低下させたが, 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% 程度しか低下させないことから, 正常細胞への効果が低いことが示された (Fig. 1). 一方で, pemetrexed は 10 nM で 50%, cisplatin は 10 μ M で 70%, MeT5A の生存率を低下させた. 用量-反応曲線より, IC_{50} を算出し, がん細胞選択性の指標として相対的感受性 (RS, がん細胞の IC_{50} 値と MeT5A の IC_{50} 値の比) を算出した (Table 1). $RS > 1$ あるいは < 1 のとき, それぞれがん細胞選択性が高いあるいは低いことを示している. その結果, H2452, MESO-1, および MESO-4 は pemetrexed に対し抵抗性を示し (RS: 0.37, 0.06, および 0.06), H28, H2452, および MESO-1 は cisplatin に対して抵抗性を示す (RS: 0.66, 0.24, および 0.26) ことが明らかとなった. 対照的に, cSBL はこれらの薬剤抵抗性を示す細胞株に対しても, 細胞毒性を示すことが明らかとなった. すなわち悪性中皮腫細胞に対する cSBL の RS 値 (9.48–247.02) は, pemetrexed, cisplatin の RS 値よりも高く, cSBL の細胞毒性は, よりがん細胞に選択的であることが示された.

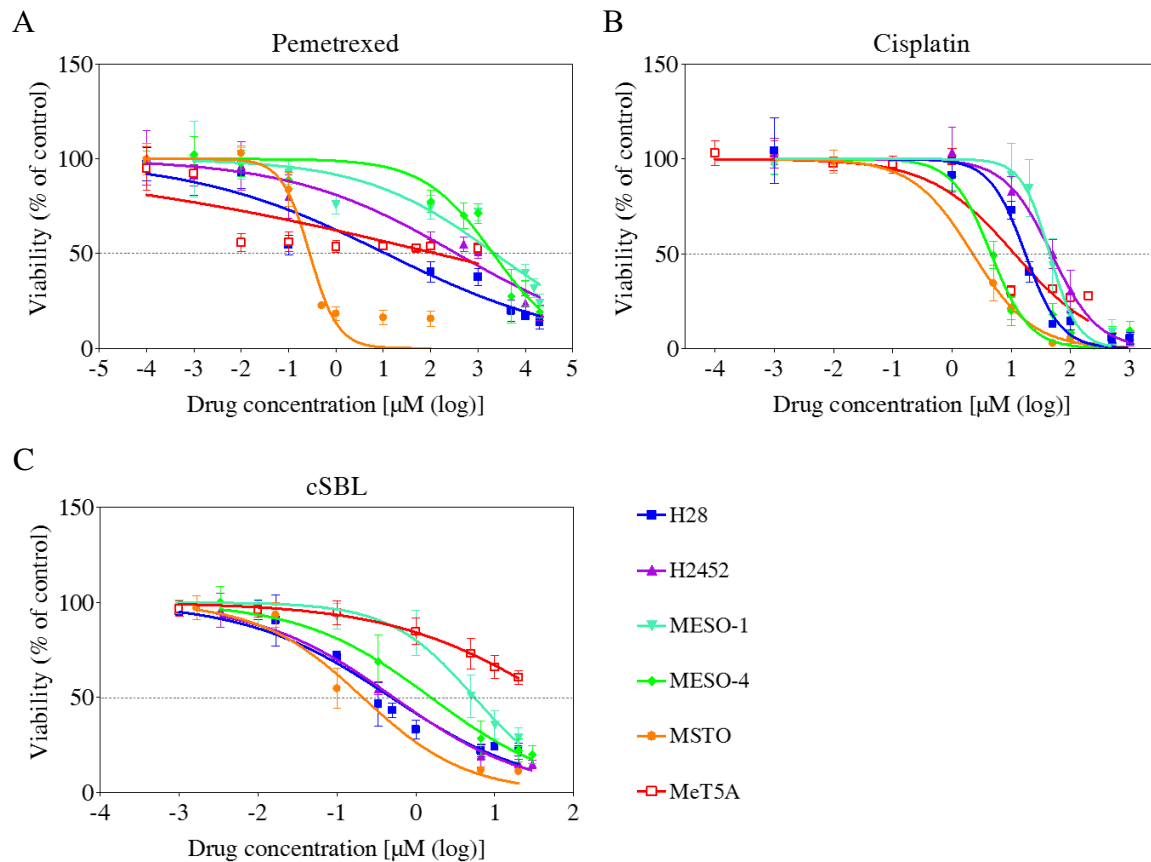


Fig. 1. Dose-response curves in the mesothelioma cell lines H28, H2452, MESO-1, MESO-4, and MSTO, and the mesothelial cell line MeT5A treated with pemetrexed (A), cisplatin (B), or cSBL (C).

Cells were treated with pemetrexed (0.1 nM–20 mM), cisplatin (1 nM–1 mM), or cSBL (1 nM–30 μ M) for 72 h. The dots and bars represent the mean and SD, respectively. Dose-response curves are depicted as lines. Each data point represents the mean \pm SD of at least three independent WST-8 assays. Each sample was plated in triplicate.

Table 1. IC₅₀ values (μM) and relative sensitivity (RS) of pemetrexed, cisplatin, and cSBL in mesothelioma cells

Drugs	Drug targets		MeT5A (normal)	H28	H2452	MESO-1	MESO-4	MSTO
Pemetrexed	TS DHFR GRAFT	IC ₅₀	129.50	11.27	353.00	2267.00	2077.00	0.28
			24.20 to 693.20	5.67 to 22.39	208.6 to 597.3	1393 to 3691	1634 to 2639	0.23 to 0.34
		RS	1.00	11.49	0.37	0.06	0.06	465.99
Cisplatin	DNA	IC ₅₀	11.27	17.18	47.62	44.14	4.54	2.23
			8.07 to 15.73	15.14 to 19.50	41.23 to 55.00	38.62 to 50.46	3.87 to 5.33	1.62 to 3.06
		RS	1.00	0.66	0.24	0.26	2.48	5.06
cSBL	RNA	IC ₅₀	52.22	0.46	0.52	5.51	1.54	0.21
			33.94 to 80.36	0.35 to 0.68	0.41 to 0.66	4.67 to 6.50	1.10 to 2.17	0.15 to 0.29
		RS	1.00	113.89	100.00	9.48	33.91	247.02

The 95% confidence intervals for each IC₅₀ value are shown in parentheses. The RS value was calculated as the IC₅₀ value of each agent in MeT5A cells divided by the IC₅₀ value in each cancer cell line.

2. 併用効果の比較検討

2 剤を併用した際の薬物相互作用を H28 細胞を用いて評価した。H28 細胞はいずれの薬剤に対しても中程度の感受性を持つこと (Fig. 1, Table 1), また cSBL と TRAIL の併用が相乗性を示すことを報告していること⁴⁰⁾ から, 被験細胞として選択した。併用時の各薬剤の濃度は, 単独処理時の IC₅₀ 値を基に決定し, 濃度比を固定して処理を行った。その結果, pemetrexed + cisplatin と pemetrexed + cSBL が, 細胞生存率を同程度低下させることが明らかとなった (Fig. 2A)。さらに, 薬剤併用時の相乗効果の有無を判定するため, CI 値を算出した。Fig. 2B に示した CI-Fa 曲線から, 他の併用と比較し, pemetrexed + cSBL が最も高い相乗性をもつことが示された。一方で, cisplatin + cSBL は, 最も低い細胞毒性および相乗性を示した。次に Fa = 0.5 (薬剤併用時の IC₅₀ に相当する濃度) における各薬剤の濃度を算出した (Table 2)。この結果, すべての薬剤で, 生存率を 50% 低下させるのに要する薬物濃度が, 単独処理時と比較すると, 併用処理時には低下することが明らかとなった。また, pemetrexed の濃度に注目すると, cisplatin (0.65 μM) 併用時と比較して, cSBL (0.38 μM) 併用時の方が約 1/2 の濃度で済むことが示された。

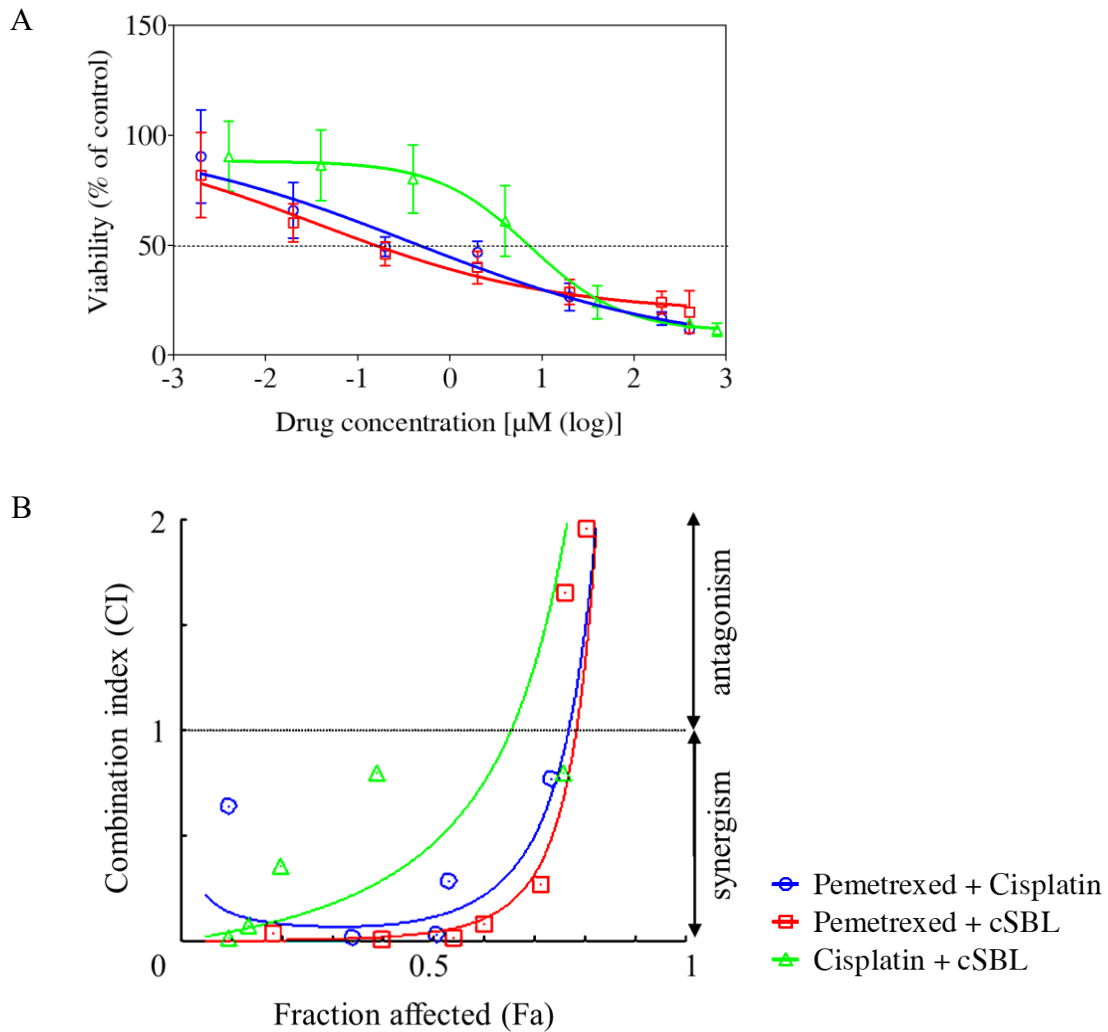


Fig. 2. Pharmacological interactions between pemetrexed, cisplatin, and cSBL in H28 cells.

(A) The drug concentration ratios were as follows: pemetrexed + cisplatin (1 : 2), pemetrexed + cSBL (20 : 1), cisplatin + cSBL (40 : 1). Cells were treated with pemetrexed (2 nM–400 μM), cisplatin (4 nM–800 μM), or cSBL (0.1 nM–20 μM) for 72 h. The horizontal axis indicates the concentration of pemetrexed in the pemetrexed + cisplatin or pemetrexed + cSBL combination or the concentration of cisplatin in the cisplatin + cSBL combination. (B) CI- F_a curves for H28 cells treated with pemetrexed + cisplatin, pemetrexed + cSBL, or cisplatin + cSBL. CI values less than 1 indicate a synergistic effect, and CI values greater than 1 indicate an antagonistic effect. Each data point represents the mean \pm SD of three independent WST-8 assays. Each sample was plated in triplicate.

Table 2. CI values and drug concentrations at Fa = 0.5 in H28 cells.

	Drug/Combo	CI value	Concentration at Fa = 0.5		
			Pemetrexed (μM)	Cisplatin (μM)	cSBL (μM)
Single	Pemetrexed	–	20.44	–	–
	Cisplatin	–	–	15.2	–
	cSBL	–	–	–	0.69
Combination	Pemetrexed + Cisplatin	0.12	0.65	1.31	–
	Pemetrexed + cSBL	0.05	0.38	–	0.02
	Cisplatin + cSBL	0.47	–	4.6	0.12

3. 併用処理時のアポトーシス誘導率

我々はこれまでに、cSBL 単独処理で H28, MESO-1, および MESO-4 細胞に対して、アポトーシスが誘導されること、また H28 細胞に対する cSBL + TRAIL 併用時の相乗的抗腫瘍作用が、アポトーシスの誘導により調節されていることを報告してきた。⁴⁰⁾ H28 細胞における pemetrexed + cSBL の相乗効果のメカニズムを検討するため、まずアポトーシスマーカーの評価を行った。Fig. 2A より、pemetrexed (20 μM), cisplatin (40 μM), および cSBL (1 μM) による併用処理を行うことで、H28 細胞の生存率がいずれの組み合わせでも同程度 (約 30%) となることから、以降の実験では、これらの濃度での処理を行った。その結果、72 時間処理後のアネキシン V 陽性細胞の割合は、単独処理時で 27.3% (pemetrexed), 38.7% (cisplatin), および 44.3% (cSBL), 併用処理時で 44.8% (pemetrexed + cisplatin), 47.3% (pemetrexed + cSBL), および 46.0% (cisplatin + cSBL) となった (Fig. 3)。しかし、単独・併用いずれの処理においても、アポトーシスの誘導率に統計学的有意差は生じなかった。

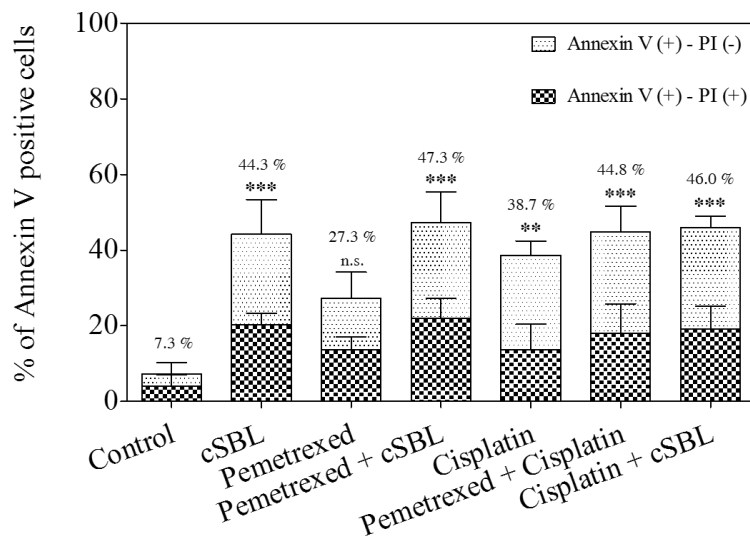


Fig. 3. Pemetrexed, cisplatin, and cSBL, either alone or in combination, induced apoptosis in H28 cells.

Cells were treated with pemetrexed (20 μ M), cisplatin (40 μ M), or cSBL (1 μ M) for 72 h. The y-axis indicates the percentage of Annexin V-positive cells. The percentages of PI-positive and negative cells were distinguishably represented by different column pattern as indicated. The statistical significance of the percentage of Annexin V-positive cells compared with control was shown in figures. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s.: not significant.

4. 併用処理時の caspase-3 の変化

Pemetrexed + cSBL の相乗的抗腫瘍効果がアポトーシスシグナルの増減により調節されるかどうかを検討するため、caspase-3 の活性化レベルについて検討を行った。ウェスタンブロット法による解析では、すべての処理で cleaved caspase-3 の発現レベルが増加することが示された (Fig. 4A)。一方、Caspase-Glo™ 3/7 assay による評価では、pemetrexed および cisplatin 単独処理時に、caspase-3 の顕著な活性化は確認できなかった。さらに、cSBL 単独あるいはすべての併用処理において、未処理群と比較して有意な caspase-3 の活性化が観察されたが (Fig. 4B)、いずれの解析においても各処理間における caspase-3 の活性に有意な差は確認できなかった。

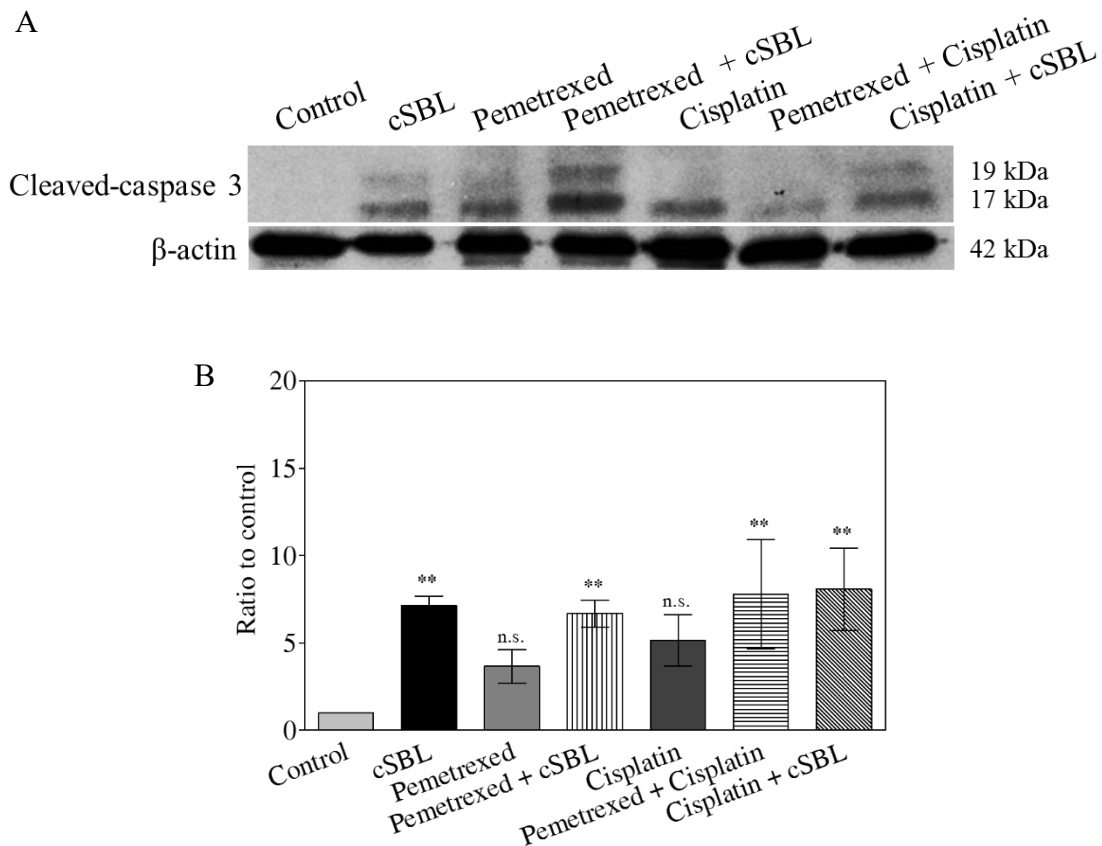


Fig. 4. Caspase-3 activation was not enhanced by the combination treatments.

Cells were treated with pemetrexed (20 μ M), cisplatin (40 μ M), or cSBL (1 μ M) for 72 h. (A) Cleaved (activated) caspase-3 was detected using western blot analysis. (B) Caspase-3 activity was analyzed using a Caspase-Glo™ 3/7 assay. * $p < 0.05$, n.s.: not significant.

5. 細胞増殖への影響

Pemetrexed + cSBL の併用によるアポトーシスシグナルは、単剤処理時や他の併用と比較して有意な変化は認められなかった。そこで次に著者は、各薬剤が悪性中皮腫細胞の生存率低下を引き起こすメカニズムについて詳細に検討した。これまで、pemetrexed と cisplatin は細胞周期の阻害を伴うアポトーシスを誘導することで、抗腫瘍作用を示すことが報告されている。⁴⁶⁻⁵¹⁾ そこで、細胞増殖への各薬剤の影響を解析した結果、72 時間後における未処理群の細胞数を 100% としたとき、薬剤処理をした群の細胞数はそれぞれ、10.4%

(pemetrexed), 14.2% (cisplatin), 32.7% (cSBL) へと低下した (Fig. 5A). また, 死細胞の割合を反映するアネキシン V/PI 両陽性細胞の割合は, pemetrexed, cisplatin 処理細胞ではいずれも 13% 程度の増加しか確認されず, 一方で, cSBL 処理細胞では 20% 以上の増加が確認された (Fig. 5B).

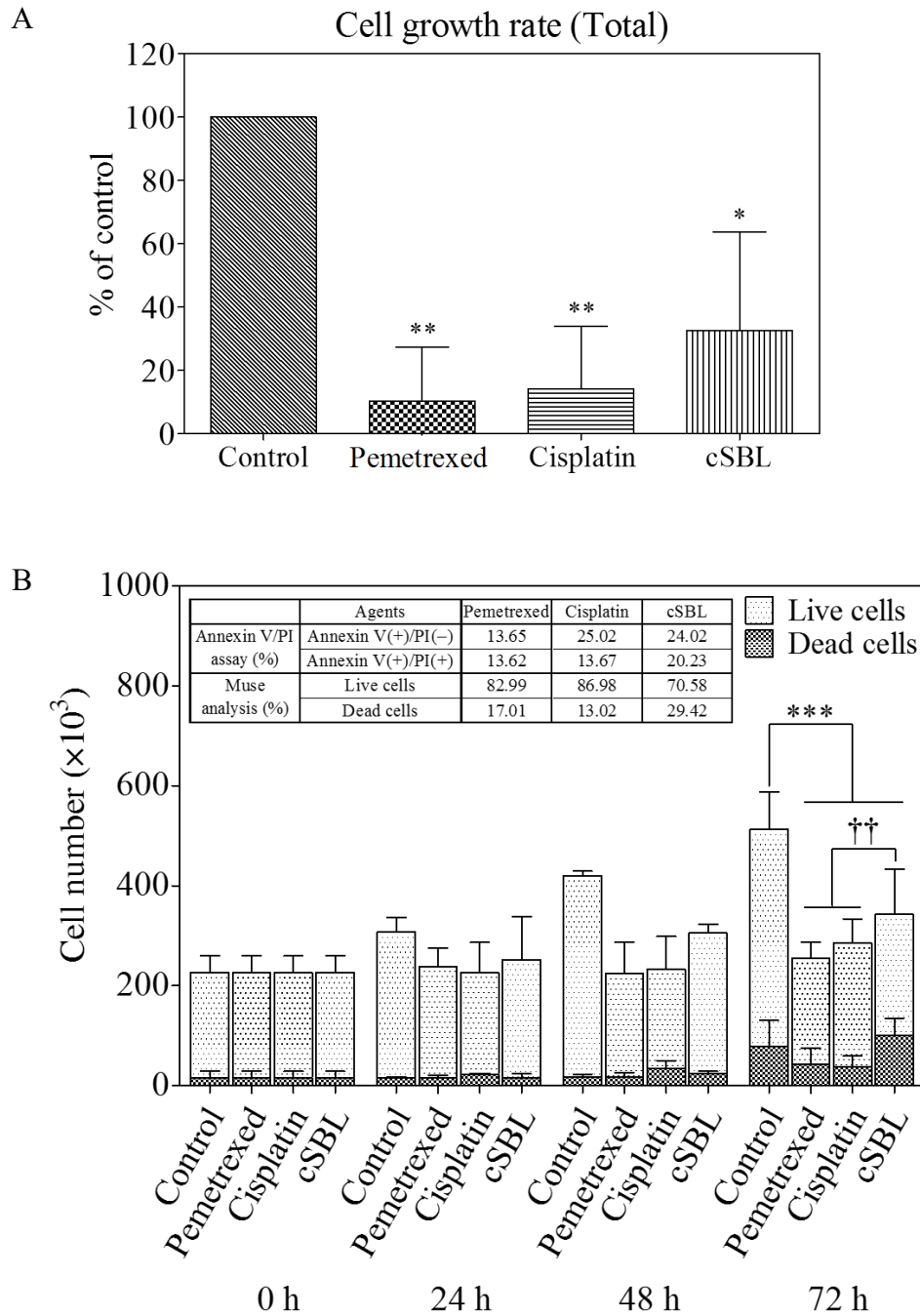


Fig. 5. Pemetrexed and cisplatin exerted a proliferation-inhibiting effect, whereas cSBL exerted a cytotoxic effect in H28 cells.

Cells were treated with pemetrexed (20 μ M), cisplatin (40 μ M), or cSBL (1 μ M) for 0-72 h. The number of cells were determined using a MuseTM Count & Viability Kit. (A) Cell growth rates were calculated as the ratio of the cell number at 72 h to the cell number at 0 h. (B) The number of live and dead cells every 24 h were shown. The statistical significance of the difference compared with control (*) in cell growth rate and live cells or cSBL (†) in dead cells was shown in figures. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ††p < 0.01.

6. 細胞周期解析

細胞増殖率の解析より, pemetrexed および cisplatin は細胞増殖を抑制することが示された. そこで, 次に H28 細胞を用いて細胞周期解析を行った. フローサイトメトリー法による解析から, pemetrexed は S 期において, cisplatin は S あるいは G2 期において細胞周期の停止を引き起こすことが示された (Fig. 6A, B). 一方, cSBL 処理では, 細胞周期への影響はほとんどなかったが, アポトーシスの指標となる, sub-G1 期細胞の有意な増加が確認された. また, 薬剤併用時には, それぞれの単独処理時のヒストグラムを足し合わせたような変化が起こることが示された. すなわち, pemetrexed + cisplatin: S 期での停止, pemetrexed + cSBL: S 期での停止と sub-G1 期の増加, cisplatin + cSBL: S あるいは G2 期での停止と sub-G1 期の増加を反映していた. これらの分子メカニズム解析のため, 細胞周期関連タンパク質 (cyclins, p21) の発現レベルおよび Akt のリン酸化レベルをウェスタンブロット法で評価した. Pemetrexed 処理では, cyclin A および p21 の発現はほぼ変化しなかったが, Akt のリン酸化レベルが増加した. Cisplatin 処理では, cyclin A および B1 が減少し, p21 が増加した. cSBL 処理では, cyclin A, B1, D1, E, および p21 の発現レベル, ならびに Akt のリン酸化レベルが減少した. Pemetrexed + cisplatin 処理では, cyclin A, および B1 の発現低下, p21 の発現上昇が確認された. Pemetrexed + cSBL, および cisplatin + cSBL 処理群では, cyclin B1 および p21 の発現レベル, ならびに Akt のリン酸化レベルが減少した (Fig. 6C).

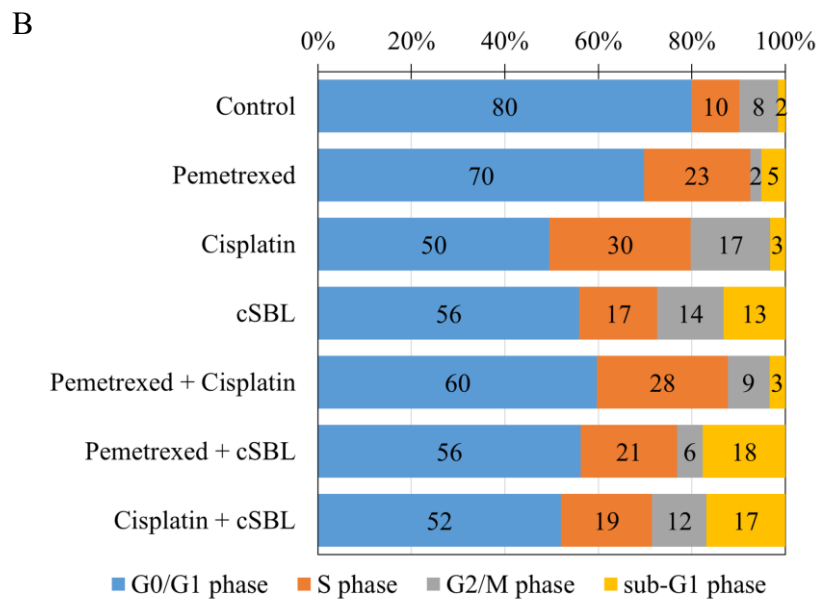
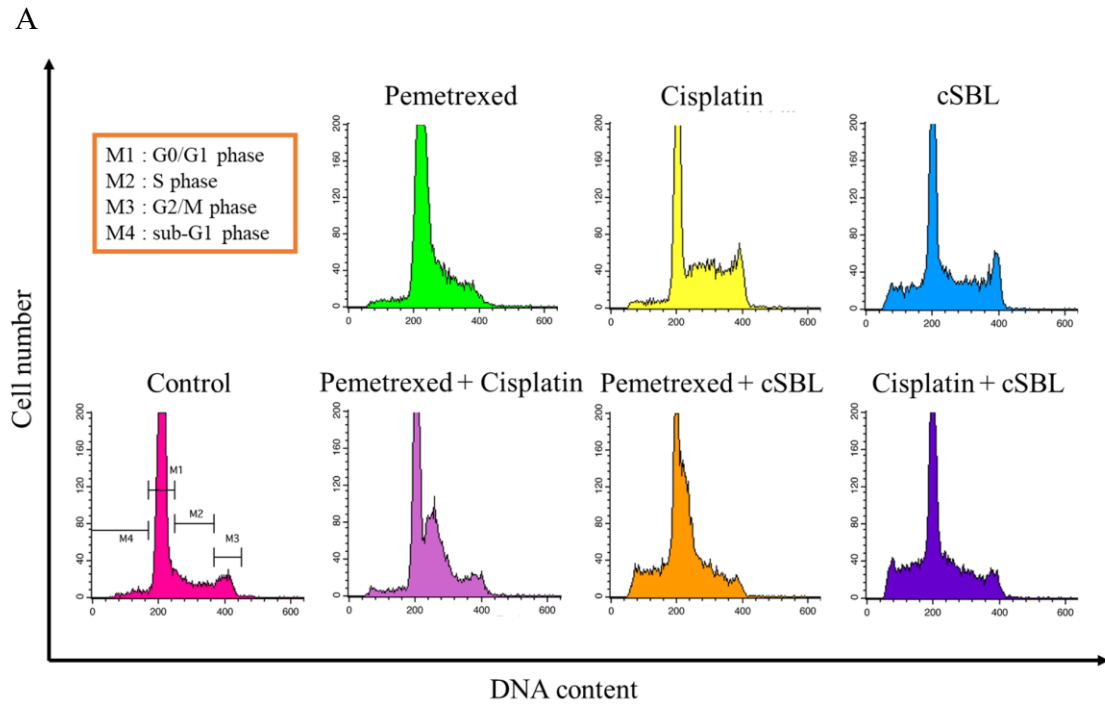


Fig. 6. Pemetrexed, cisplatin, and cSBL, either alone or in combination, altered cell cycle dynamics in H28 cells.

Cells were treated with pemetrexed (20 μ M), cisplatin (40 μ M), or cSBL (1 μ M) for 72 h. (A, B) Flow cytometry analysis of cell cycle progression in H28 cell lines after 72 h of treatment. (C) Levels of cyclins (A, B1, D1, and E), p21, Akt, and phospho-Akt were detected by western blot.

C

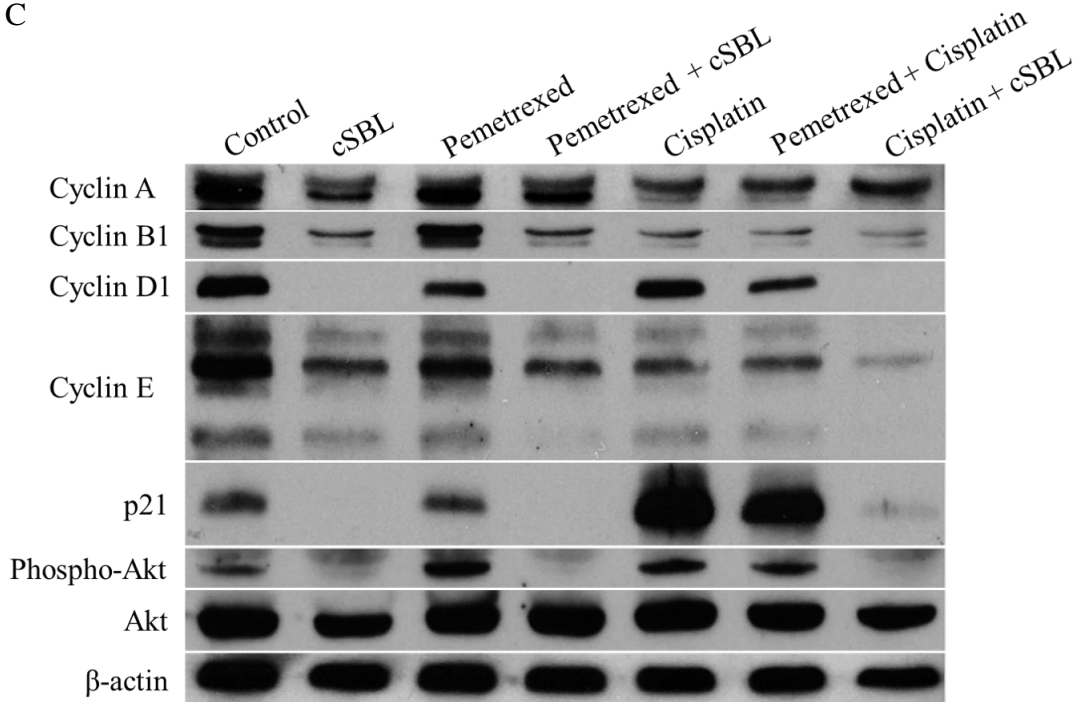


Fig. 6 continued

第四節 考察

悪性中皮腫は、組織学的に上皮性、二相性および肉腫性の 3 つのサブタイプに分類される。^{14,52)} 上皮型は非上皮型と比較すると、より予後が良いことが報告されている。^{14,53,54)} 我々は、これまでに cSBL が悪性中皮腫を含む 20 種のヒトあるいはげっ歯類がん細胞に対して選択性を示すこと、一方で 10 種の正常細胞には作用しないことを報告してきた。³¹⁾ cSBL の細胞毒性、がん細胞選択性に関しては、総説としてもまとめられている。^{55,56)} cSBL は正常細胞よりがん細胞に優先的に結合し、細胞内に取り込まれ、自身の持つ RNase 活性により細胞毒性を示すと考えられている。³²⁾ cSBL 耐性を獲得させたマウス P-388 細胞株では、cSBL の細胞内への取り込み能が欠損しており、細胞表面への cSBL の結合は観察されたが、細胞毒性は認められなかった。⁵⁷⁾ そのため、正常細胞では cSBL の取り込み機構の欠如により、毒性を示さないと考え

られる。本章では、cSBL が pemetrexed あるいは cisplatin に抵抗性を示す細胞株を含む複数の悪性中皮腫細胞株に対して、強い細胞毒性を持つことを明らかにした。

これまで、cSBL と他剤の併用効果についてはいくつかのがん細胞株で報告されているが、^{36,40,42)} 悪性中皮腫の治療薬としてわが国で承認を受けている pemetrexed, cisplatin との併用は検討されていない。著者は、pemetrexed + cSBL が、既存レジメンの pemetrexed + cisplatin と同程度の相乗性を持つことを明らかにした (Fig. 2A, B)。また、pemetrexed と cSBL を併用することで、pemetrexed の濃度依存的な副作用の発現リスクあるいは耐性の出現を低下させる可能性が示された (Table 2)。その作用機序解析を行ったところ、pemetrexed + cSBL の相乗効果は、アポトーシスの増強に依存するものではないことが明らかになった (Fig. 3, 4)。一般的に、抗がん剤を高濃度で使用した際には、がん細胞ではアポトーシスが観察され、一方比較的低濃度で使用をした際には、一過性の増殖阻害などの細胞増殖抑制が観察されることが知られている。⁵⁸⁾ Pemetrexed あるいは cisplatin 単独処理時の、アネキシン V/PI 両陽性率 (Fig. 3) と Muse™ analyzer により算出した死細胞率はほぼ同等で、比較的低値 (13~17%) であることが示された。さらに細胞周期解析 (Fig. 6) からは、pemetrexed と cisplatin は細胞増殖抑制的に作用し、cSBL は細胞死誘導的に作用することが明らかになった。これらの結果から、pemetrexed, cisplatin は、本研究における処理濃度では、初期 (前期) アポトーシスまでしか進行せず、アポトーシスを完了させるには cSBL が必要であると示唆された。細胞周期関連タンパク質に対する薬剤の影響は、細胞種や処理の方法により異なるが、pemetrexed は肺がん細胞株 A549 において、Akt の活性化の延長による CDK2/cyclin A キナーゼの持続的活性化を引き起こし、S 期において細胞周期を停止させることが報告されている。^{47,59-61)} 本研究では、pemetrexed 処理による cyclin A の発現レベルに変化は観察されなかったが、Akt のリン酸化レベルの増加が観察され、それにより cyclin A が安定化され S 期での細胞周期の停止を引き起こしたと考えられる (Fig. 6)。また、cSBL 処理で、種々の cyclin

および p21 の発現レベルが低下することも明らかとなった。これらは、cyclin などの短命なタンパク質が cSBL 処理による RNA 断片化、翻訳阻害の影響を受けやすいためだと考えられる。興味深いことに、pemetrexed + cSBL 処理細胞では、cSBL 単独処理細胞と同様に、cyclin B1, D1, E および p21 の発現低下が観察されたが、cyclin A の発現に変化は観察されなかった。このことは、cSBL 処理により cyclin A の翻訳は阻害されているが、一方で pemetrexed 処理により cyclin A の発現レベルが安定化し、CDK2/cyclin A キナーゼの活性が亢進している可能性を示している。また、アポトーシス誘導率 (Fig. 3) や細胞周期解析 (Fig. 6) の結果から、pemetrexed + cSBL では、S 期での細胞周期停止とアポトーシスが引き起こされると考えられる。以上の結果より、pemetrexed + cSBL は、CDK2/cyclin A キナーゼの持続的活性化により引き起こされる pemetrexed の細胞増殖抑制効果と、cSBL のアポトーシス促進作用が合わさることで強い相乗性を示すと考えられる。

本研究で、p21 の発現レベルは、処理ごとに異なることが明らかとなった。腫瘍抑制因子である p21 は、cyclin-CDK 複合体や DNA ポリメラーゼの機能を抑制することで、細胞周期の進行を抑制することが知られている。⁶²⁻⁶⁴⁾ また、p21 の過剰発現により、G1, G2 期,⁶⁵⁾ あるいは S 期^{66,67)} において細胞周期が停止するという報告もある。Pemetrexed と cisplatin は p21 の発現を増加させることで細胞周期の停止を引き起こすことも知られている。^{46,68)} 本研究において、単独処理時における p21 発現レベルは、pemetrexed 処理では変化がなく、cisplatin 処理では顕著に増加、cSBL 処理では顕著に減少した。併用処理においては、pemetrexed + cisplatin 併用時のみ、大幅な増加が観察された。これらのことから、H28 細胞において、cisplatin を含む処理で誘導される細胞周期の停止には、p21 の発現レベルが重要な役割を担っていると考えられる。事実、cisplatin と非ステロイド性抗炎症薬である piroxicam との併用では、MSTO 細胞に対して、p21 発現上昇によりアポトーシスが誘導され、p21 のサイレンシングによりこの効果が減弱されることが報告されている。⁶⁹⁾ 本研究では、H28 細胞においても、cisplatin 処理により p21 が強く誘導されたが

(Fig. 6), 一方で cSBL 処理でその発現が減弱された. この p21 に対する相反する作用のため, cisplatin + cSBL は他の併用と比べ相乗性が低下したと推測される. 他方, Lazzarini らは, H28 および H2052 細胞に対して shRNA 処理を行い, p21 を阻害することで, doxorubicin, etoposide, および CPT11 などの DNA 傷害性薬剤の抗腫瘍効果が増強されること, ⁷⁰⁾ また Inoue らは, 腎細胞がん, 肝細胞がんにおいて, sorafenib 処理による p21 の阻害が, paclitaxel および doxorubicin などによる細胞死を亢進することを報告している. ⁷¹⁾ これらのことから, cSBL と上記 DNA 傷害性薬剤 (cisplatin を除く) との併用が, 悪性中皮腫の新たな治療戦略となる可能性があると考えられる. Fig. 7 に, 本研究の結果より予測される併用処理時の抗腫瘍メカニズムを図示した.

cSBL は既存薬 (pemetrexed および cisplatin) と比較し, 複数の悪性中皮腫細胞に対して, 強力かつ高い選択性をもった抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった. また, 併用処理においても, pemetrexed + cSBL が, 現在の治療レジメンと同等以上の相乗性および抗腫瘍作用を示すことが示唆された. この相乗性は, pemetrexed の細胞増殖抑制作用と, cSBL の細胞死誘導作用が協働し作用することで発揮されることが考えられる. 以上のことより, 著者は cSBL は悪性中皮腫の新たな治療戦略となる可能性を持つと考える.

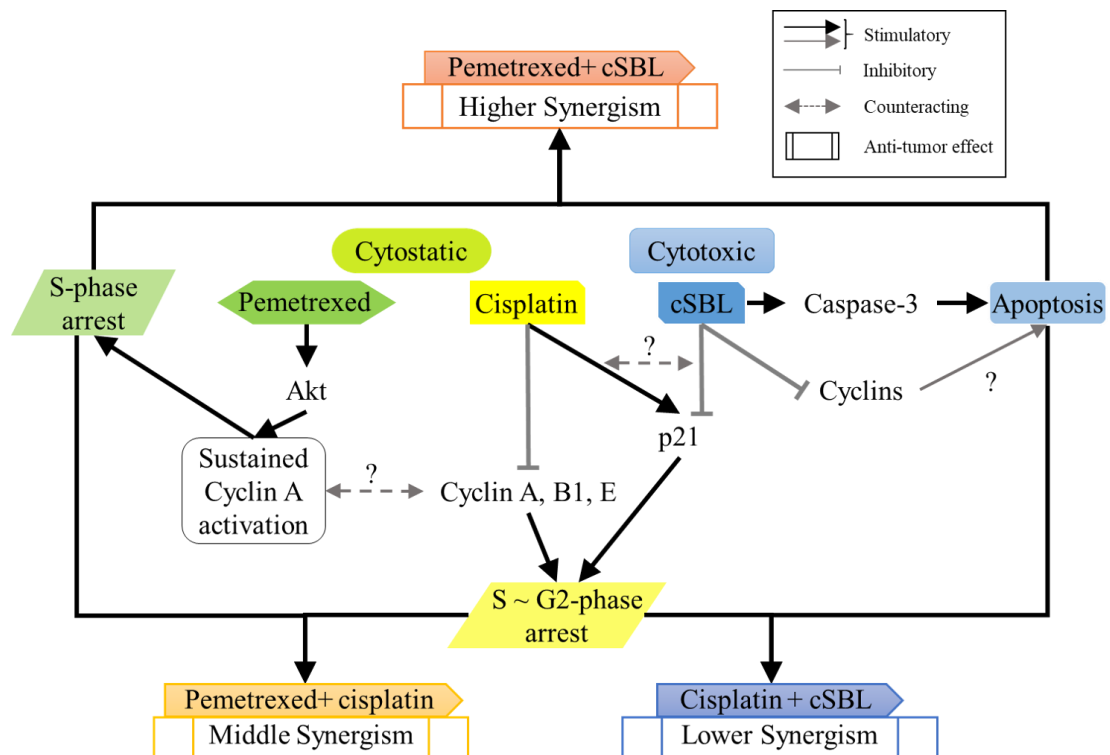


Fig. 7. Schematic representation of the molecular mechanism underlying the synergism of each combination treatment in H28 cells.

第二章

In vitro および *in vivo* における cSBL の抗腫瘍効果の検討

第一節 序

悪性中皮腫は、今後の罹患率上昇が懸念される難治性がんである。⁷²⁾ 第一章、第四節冒頭において述べた通り、治療感受性は組織学的性質によって差があり、^{73,74)} 一般に上皮型患者において治療成績が良好な傾向にある。^{75,76)} また、腫瘍の組織学的分類以外にも、性差、パフォーマンスステータス、病期、血清 LDH 量、および貧血あるいは白血球増加症などの合併症の有無が悪性中皮腫患者の生存率に関わる因子として示唆されている。⁷⁷⁾ しかし、悪性中皮腫患者の長期生存率は非常に低いため、これら生物学的要素と患者の予後の関係を明確に関連付けることは現状では困難であり、このことも悪性中皮腫の合理的治療アプローチ開発ならびに予後改善への障壁となっている。⁷⁸⁾

治療選択肢の少ない悪性中皮腫に対して、現在様々なアプローチが模索されているが、⁷⁹⁾ その一つとして、化学療法、手術療法、および片側胸郭放射線照射の 3 種併用療法があり、完遂した場合生存期間中央値が 29 ヶ月に達したという報告がある。⁸⁰⁻⁸³⁾ さらに、手術および光線力学療法の併用により胸膜除去あるいは剥離を行い、pemetrexed ベースのアジュバント療法を実施した場合、生存期間中央値が 36 ヶ月に達したという報告もある。⁸⁴⁾ しかし、こうした積極的なアプローチにもかかわらず、悪性中皮腫の予後はなお不良であり、前述したように今後患者数のピークを迎えることが予測されていること、現在

使用されている薬剤に対して耐性が存在することなどから、新たな治療薬の開発が不可欠となっている。

古くから、天然物由来分子をがん治療へ応用する試みが盛んになされており、生物界に普遍的に存在するレクチンは、特にその応用が期待されている物質の一つである。中でもヤドリギレクチン (ML-1),⁸⁵⁾ イヌエンジュ (*Maackia amurensis*) 種子由来レクチン (MASL),⁸⁶⁾ *Polygonatum cyrtoneum* レクチン (POL),⁸⁷⁾ およびクロアワビ (*Haliotis discus discus*) レクチン (HddSBL)⁸⁸⁾ などのシアル酸結合性レクチン (SBLs) は、抗腫瘍作用を有することが報告されている。当研究室で単離した cSBL もその一つであることはすでに述べたが、台湾の Liao らにより単離された *Rana catesbeiana* RNase (RC-RNase) は cSBL と同一のタンパク質であり、^{11,89)} こちらも乳がんや肝細胞がんに対する抗腫瘍作用がよく研究されている。cSBL は 111 残基のアミノ酸より構成され、4 つのジスルフィド結合を有し、¹¹⁾ 脊椎動物の分泌型 RNase ファミリー (RNase A superfamily) に属している。⁵⁵⁾ このタンパク質は熱およびタンパク変性剤に対して高い抵抗性を示すことが明らかになっていて、⁹⁰⁾ この性質が高い抗腫瘍活性を示す理由の一つと考えられ、製剤化という観点からもメリットになりうると考えられる。また、cSBL は構造的にヒトの内在性 RNase inhibitor との結合を回避することで、ヒトがん細胞に対し RNase 活性を介した細胞毒性を示すと考えられている。³²⁾ 当研究室では、ヒト白血病細胞 Jurkat において、p38 および JNK の活性化による MAPK 経路の活性化とミトコンドリア経路を介したアポトーシスを誘導することを報告している。³⁴⁾ また、乳がん細胞 MDA-MB231 において、アミノ酸の置換により RNase 活性を欠損させた cSBL を用いた実験では、変異型 cSBL は天然 cSBL 同様に細胞内に取り込ま

れるものの、アポトーシスは誘導されなかったことから、cSBL の殺細胞作用には RNase 活性が必須の因子であることを明らかにした。³⁹⁾

これまで cSBL の *in vivo* における効果は、マウス腹水がんを移植した担癌モデル³²⁾ でしか検討されておらず、ヒト悪性中皮腫細胞に対する生体モデルでの効果は明らかにされていなかった。そこで本研究では、*in vivo* での cSBL の抗腫瘍効果を検討するため、2 種の悪性中皮腫細胞を移植した異種移植モデルマウスを作製し、cSBL の効果を評価した。

第二節 実験材料および実験方法

1. 細胞培養

細胞は悪性中皮腫細胞株 H2452 および MSTO を使用した。各細胞は、第一章、第二節、第 1 項で述べた方法で培養した。

2. 動物

実験に用いたマウスは、5 週齢の雄性ヌードマウス (BALB/c nu/nu Slc) を日本 SLC より購入した。実験は東北医科薬科大学動物実験ガイドライン (permission number: A16012-cn) に従って執り行い、固形飼料および水が自由摂取できる環境下で飼育した。

3. 材料

cSBL, pemetrexed disodium salt heptahydrate, cisplatin, 抗 caspase-3 抗体, 抗 β -actin 抗体, HRP 標識抗マウス IgG 抗体, および HRP 標識抗ラビット IgG 抗体は、第一章、第二節、第 2 項にあるものと同様のものを用いた。抗 caspase-8 抗体は Cell Signaling Technology より、抗 caspase-9 抗体は Medical & Biological Laboratories より購入したのものを用いた。

4. アネキシン V の結合とヨウ化プロピジウム (PI) の取り込みの測定

アポトーシスの検出は、6-well plate に H2452 および MSTO 細胞を 1×10^5 cells/well になるように播種し、第一章、第二節、第 5 項の方法で行った。cSBL の終濃度は H2452 および MSTO 細胞に対してそれぞれ $1 \mu\text{M}$ および $0.4 \mu\text{M}$ となるように処理し、24 時間ごとに 72 時間まで、細胞を回収・染色し、測定・解析を行った。

5. 核断片化の観察

核断片化の観察および断片化度の算出は、High-Content Analysis System Operetta CLS™ (PerkinElmer 社製) を用いて行った。Cell Carrier-96 Ultra Microplate に H2452 および MSTO 細胞を 5×10^3 cells/well になるように播種した。cSBL の終濃度は H2452 および MSTO 細胞に対してそれぞれ $1 \mu\text{M}$ および $0.4 \mu\text{M}$ となるよう、測定の 6, 24, 48, および 72 時間前に処理した。その後、 $2 \mu\text{g/mL}$ の Hoechst 33342 (同人科学研究所製) を用いて 1 時間染色を行い、NA 20X および 40X 対物レンズを用いて染色像を撮影後、Harmony™ Imaging and Analysis Software 4.6 (PerkinElmer 社製) により核の断片化度の指標となる Fragmentation Index を算出した

6. Caspases 活性の検出

Caspase-3, -8, および -9 の活性化レベルの検出は、第一章、第二節、第 6 項に記載したウェスタンブロット法により行った。H2452 および MSTO 細胞を 2×10^5 cells/well になるように播種し、cSBL の終濃度がそれぞれ $5 \mu\text{M}$ および $2 \mu\text{M}$ となるように培地中に添加し、1, 3, 6, 24, 48, および 72 時間処理を行った。

それぞれの caspase の酵素活性は、Cell Meter™ Multiplexing Caspase-3/7, -8 and -9 Activity Assay Kit (AAT Bioquest 社製) を用いて測定した。Black 96-well plate に H2452 および MSTO 細胞を 5×10^3 cells/well になるように播種し、cSBL の終濃度がそれぞれ $5 \mu\text{M}$ および $2 \mu\text{M}$ となるように培地中に添加し、

1, 3, 6, 24, 48, および 72 時間処理を行った。その後、基質溶液 (100 $\mu\text{L}/\text{well}$) を加え、プレートシェーカーで 30 秒間攪拌したのち、再度 37°C, 5% CO_2 の大気圧下で 1 時間培養した。各ウェルの蛍光は Infinite™ 200 PRO および i-control™ software (Tecan 社製) を用いて測定した。

7. 異種移植モデルマウスの作製および動物実験

H2452 (5×10^6 cells) および MSTO (2×10^6 cells) 細胞を等量の氷冷した Corning™ Matrigel™ Basement Membrane Matrix (Corning 社製) に懸濁し、細胞懸濁液 100 μL をマウスの右下肢部に皮下投与した。がん細胞移植より 2~4 週後、腫瘍体積が 100-150 mm^3 に達したところ (day1) で、マウスを 10 匹ずつ、3 群にランダムにグループ分けした。Group 1 はコントロール群として 1 mL/kg vehicle (PBS) を腫瘍内投与した。Group 2 は既報^{91,92)} の濃度および投与経路を参考に滅菌済み PBS で溶解した pemetrexed (100 mg/kg) を days 1-5 および 15-19 に腹腔内投与した。Group 3 は cSBL (2.5 mg/kg) を週 2 回、4 週間腫瘍内投与した。体重および腫瘍径は週 2 回測定し、以下の計算式より腫瘍径を用いて腫瘍体積を算出した。腫瘍体積 (mm^3) = $0.4 \times A \times B^2$ (A, B はそれぞれ腫瘍の長径 [mm] および短径 [mm] を示す)。腫瘍体積変化および体重変化は、day1 を基準として算出した。Fig. 1 に本研究における投与スケジュールを図示した。腫瘍体積が 200 mm^3 に達したマウスは、エーテル麻酔下で頸椎脱臼により屠殺した。

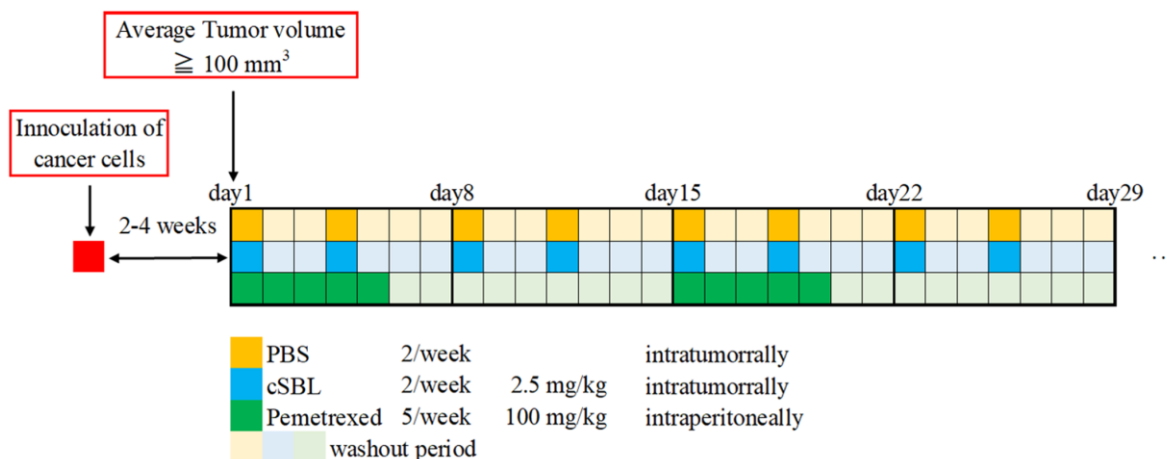


Fig 1. A schematic overview of the cancer cell injection and drug administration schedule.

The cell suspension (100 μ L/mouse, H2452; 5×10^6 cells, MSTO; 2×10^6 cells) was injected subcutaneously into the lower backs of mice. After 2-4 weeks, mice bearing tumors of 100-150 mm^3 were randomly divided into 3 groups with 10 mice per group. Group 1 was administered PBS as control. Group 2 was injected intraperitoneally with pemetrexed (100 mg/kg) dissolved in sterile PBS on days 1-5 and 15-19. Group 3 was injected intratumorally with cSBL (2.5 mg/kg) twice per week for 4 weeks. Body weights and tumor sizes were measured twice per week. The endpoint of experiment was when the tumor diameter exceeded 200 mm^3 .

8. 薬剤併用効果の検討

薬剤併用時の生存率の測定は、第一章、第二節、第 4 項の方法で行った。薬剤の処理濃度は、第一章、第三節、第 1 項で算出した IC_{50} 値を基に決定した。併用効果の指標である CI と併用時の薬物用量の減少効果の指標である Dose Reduction Index (DRI) の算出は既報⁴⁵⁾ を参考に CompuSyn software (ComboSyn 社製) を用いて行った。CI は第一章、第二節、第 4 項の式より、 $DRI = (D_{x, \text{alone}})_a / (D_{x, \text{comb}})_a$ より算出した。それぞれの計算式において、 $D_{x, \text{comb}}$ 、 $D_{x, \text{alone}}$ は、生存率を $x\%$ 低下させる濃度を、 a は併用に用いた薬剤 (薬剤 a) を表す。また、 $CI > 1$ 、 $= 1$ 、および < 1 の場合、薬剤の併用がそれぞれ拮抗的、相加的、および相乗的であることを示す。 $DRI > 1$ 、 $= 1$ 、および < 1 の場合、薬物用量の減少効果がそれぞれ良好、全くない、および不良であることを示す。

9. 統計解析

統計解析は第一章，第二節，第 9 項と同様に行い，多重比較検定として one-way ANOVA，あるいは two-way ANOVA を，post-hoc test として Bonferroni test を行った． $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した．

第三節 結果

1. アポトーシスの観察

本研究では，異種移植可能な悪性中皮腫細胞株である H2452 および MSTO 細胞を用いた．まず始めに，*in vitro* における cSBL の抗腫瘍メカニズムの解析を行った．cSBL 処理後 72 時間のアネキシン V 陽性細胞率は有意に増加し，H2452 および MSTO 細胞でそれぞれ，16.13% および 40.05% であった (Fig.2A, B)．さらに，核の形態変化を High-Content Analysis Systems を用いて観察し，Fragmentation Index として数値化したところ，どちらの細胞も cSBL 処理によりクロマチン凝集および核の断片化が観察された (Fig. 2C)．また，Fig. 2D および 2E に示したように，cSBL 処理により両細胞で時間依存的に有意な核の断片化が観察された

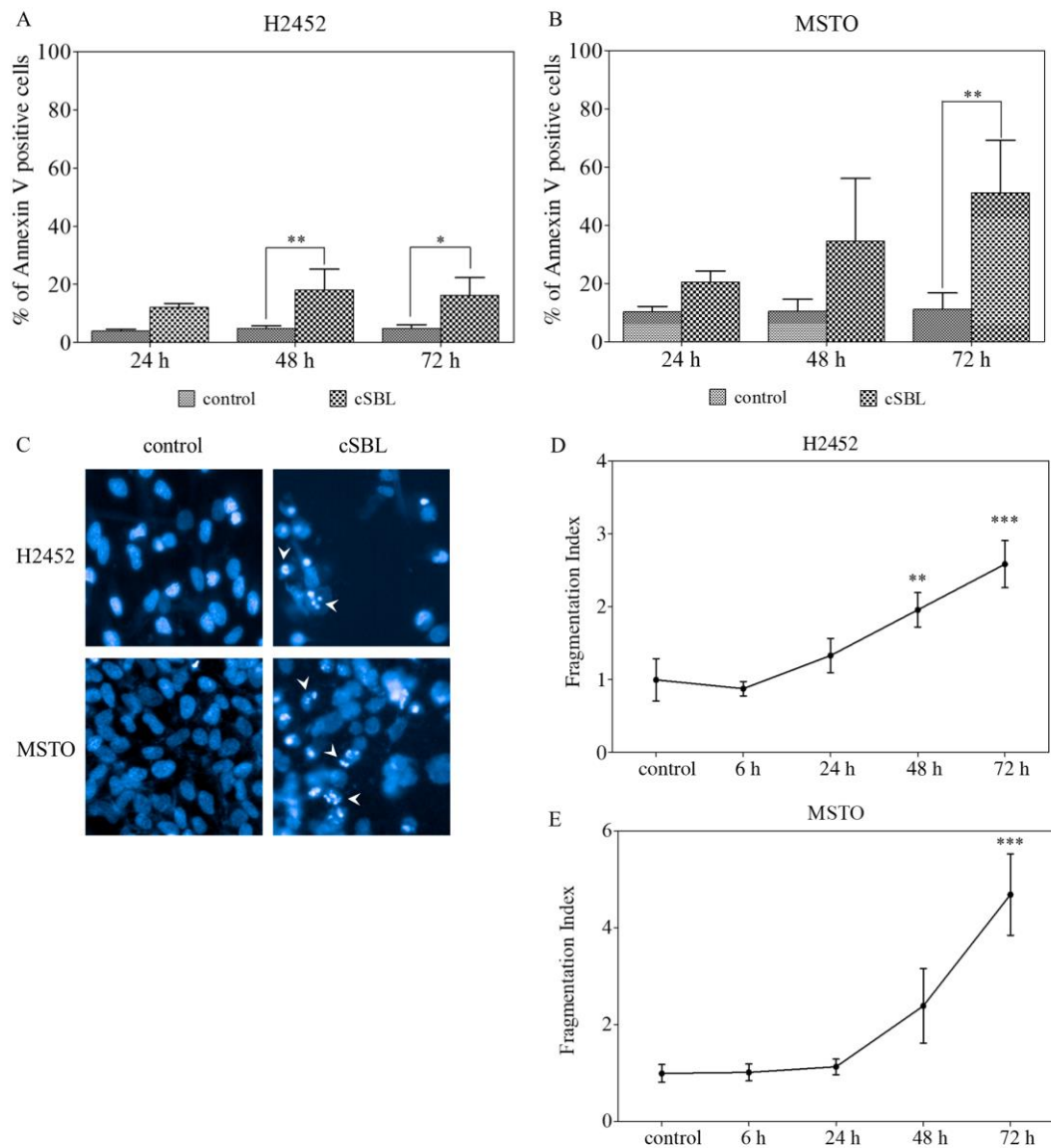


Fig 2. cSBL induced apoptotic changes in H2452 and MSTO cells.

Cells were treated with cSBL for the indicated times. (A, B) Rate of apoptosis as indicated by the percentage of annexin V-positive cells. (C) Nuclear fragmentation images were captured using 40X objective; a false-colored image of the nuclei (blue) is shown. White arrowheads indicate the cells with condensed or fragmented nuclei. (D, E) Fragmentation index indicating the degree of nuclear fragmentation; a higher index indicates greater occurrence of fragmentation, calculated using the High-Content Analysis System. All data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. The statistical significance of these experiments compared with the control is shown as follows: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2. Caspases 活性の検出

H2452 および MSTO 細胞に対する cSBL 誘導アポトーシスメカニズムの詳細を明らかにするため、3 種の key caspase の活性化を経時的に分析した。

Caspase-9, -8, および -3 の経時的变化は、ウェスタンブロット法による活性型 caspase の発現レベルの変化と蛍光法による酵素活性の検出により評価した。

Fig. 3A および 3B に示すように、活性型 caspase-9 は H2452 細胞では cSBL 処理後 6 時間から、MSTO 細胞では 処理後 1 時間から観察され始めた。

その後、それぞれの細胞で 24 時間後あるいは 6 時間後より 活性型

caspase-8 が出現し、48 時間後ならびに 24 時間後には活性型 caspase-3 が出現した。

同様に、caspase-9 の酵素活性は両細胞で cSBL 処理後 1 時間から有意に上昇し始め、

caspase-8 および caspase-3/7 はほぼ同じタイミングで活性が上昇した (H2452, 48 h ; MSTO, 24 h) (Fig 3C, D)。

以上の結果から、caspase-9 は caspase-8 および -3 より先行して活性化されることが明らかとなり、cSBL

誘導アポトーシスにおける内在性経路の関与が示唆された。

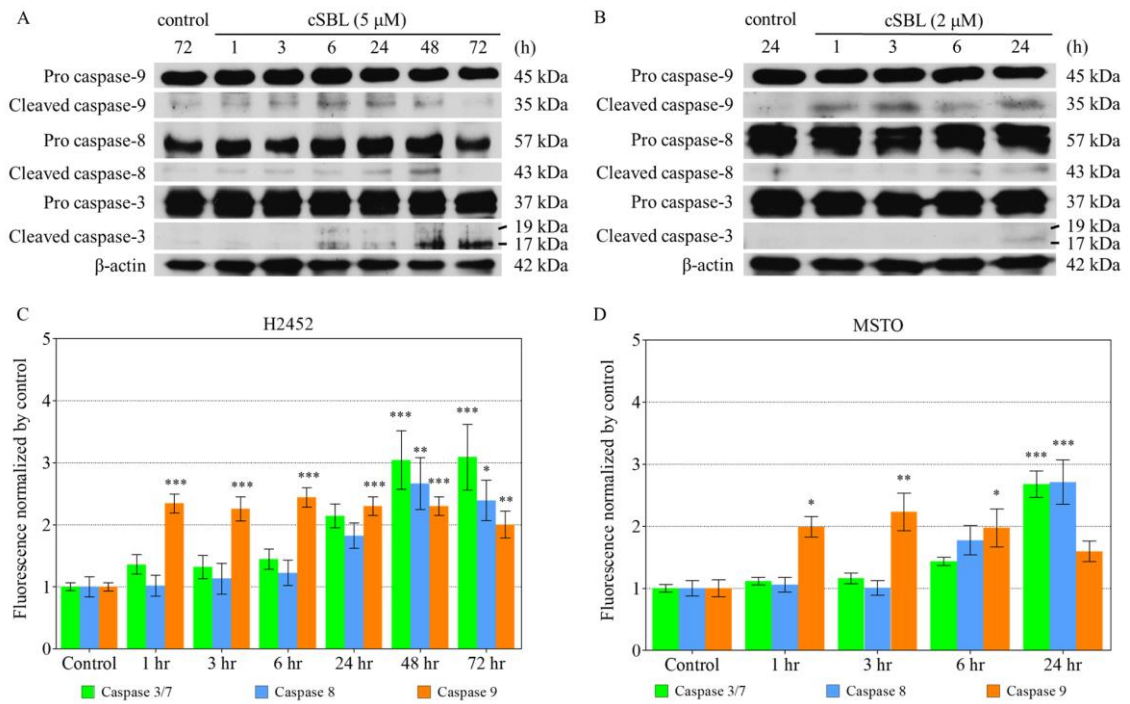


Fig 3. cSBL induced apoptosis in H2452 and MSTO cells via activation of the caspase pathway.

Caspase-3, -8, and -9 activation was detected by western blotting (A, B) or fluorimetry (C, D). Fluorimetry was performed independently three times and data are expressed as the mean \pm SD. The statistical significance of these experiments compared with the control is shown as follows: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3. 異種移植モデルマウスにおける cSBL の抗腫瘍作用の検討

In vivo における cSBL の抗腫瘍効果を検討するため、H2452 および MSTO 細胞を移植したヌードマウスを作製した。Fig. 1 に示した投与スケジュールに従い、3 群 (コントロール群, pemetrexed 投与群, および cSBL 投与群) のマウスに薬剤投与を行い、体重および腫瘍体積をモニターした。Fig. 4A および 4B に示したように、投与期間中の体重変化はどの群でも観察されなかった。H2452 移植マウスでは cSBL および pemetrexed 投与群でコントロール群と比較して有意な腫瘍増殖抑制が観察された。また、cSBL 投与群 (36 日目) の腫瘍増殖抑制作用は pemetrexed 投与群 (47 日目) より早い時期より観察され始めた (Fig. 4C)。一方、MSTO 移植マウスでは、cSBL 投与群のみ 29 日目に有意な腫瘍増殖抑制が確認された (Fig. 4D)。

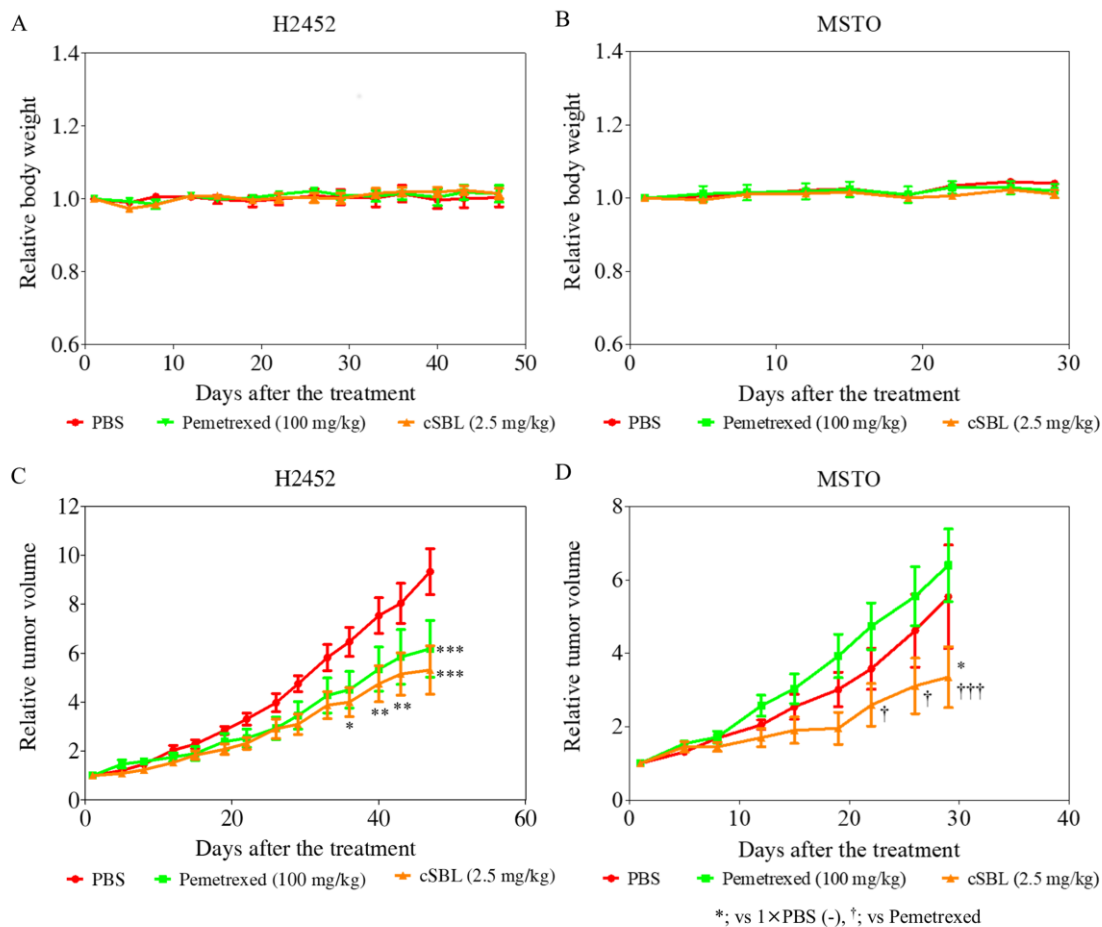


Fig 4. cSBL showed *in vivo* cytotoxicity without inducing loss of body weight.

Mice were randomly divided into 3 groups with 10 mice in each group. Groups 1, 2, and 3 were injected PBS, pemetrexed (100 mg/kg, intraperitoneally), and cSBL (2.5 mg/kg, intratumorally), respectively. Body weights and tumor sizes were measured twice per week. Tumor volumes were calculated as follows: $0.4 \times A \times B^2$, where A and B represent the long and short diameters (in mm) of the tumor, respectively. Relative body weight (A, B) and relative tumor volume (C, D) are plotted as the mean of each group \pm SD at each timepoint. The statistical significance of these experiments compared with PBS (*) or pemetrexed (†) is shown as follows: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, †P<0.01, †††P<0.001

4. 併用効果の比較検討

H2452 あるいは MSTO 細胞における pemetrexed, cisplatin, および cSBL より 2 剤を併用した際の *in vitro* での薬物相互作用は第一章, 第三節, 第 2 項と同様の方法により検討した. 各薬剤の併用時の処理濃度は, 第一章, 第三節, 第 1 項で算出した IC_{50} 値を基に決定した. 両細胞における薬剤単独あるいは併用処理時の用量-反応曲線を Fig. 5 に示した. H2452 細胞では, 単独処理と比較すると, すべての併用処理において, 生存率が大きく低下することが検討した全濃度範囲で示された. 一方, MSTO 細胞でもほとんどの濃度範囲で同様の傾向が得られたが, 高濃度側では併用効果に頭打ちが認められた. また, CI を算出したところ (Fig. 6A), H2452 細胞ではすべての併用レジメンで $CI < 1$ となり, 相乗性を示すことが示唆された. 特に, cSBL + pemetrexed が全処理濃度で他の併用レジメンよりも高い相乗性を示した. 一方で, MSTO 細胞では高濃度側の 2 点でどの併用レジメンでも拮抗的 ($CI > 1$) であったが, cSBL を含む併用 (cSBL + pemetrexed あるいは cSBL + cisplatin) では低~中程度の濃度域で, 高い相乗性を示した. また, MSTO 細胞に対し, pemetrexed + cisplatin は相乗性を示す場合もあるが, ばらつきが大きいことが明らかになった. 相乗効果をもたらす併用の場合, 一定レベルの効果を得るために必要な各薬剤の用量は, 単独処理時の各薬剤の用量と比較し, 著しく減少させることができ, この薬剤用量減少効果は DRI を算出することにより評価できる. すなわち DRI は, 併用による各薬剤の用量が, 単独処理時と比べ, 何倍軽減できるかという尺度を表している. 各併用レジメンにおける各薬剤の DRI を Fig. 6B に示した. H2452 細胞ではすべての併用レジメンで高い DRI が算出さ

れ、MSTO 細胞では cSBL を含むレジメンで低～中程度の濃度域において高い DRI が算出されたが、pemetrexed + cisplatin では全体的に低い値となった。

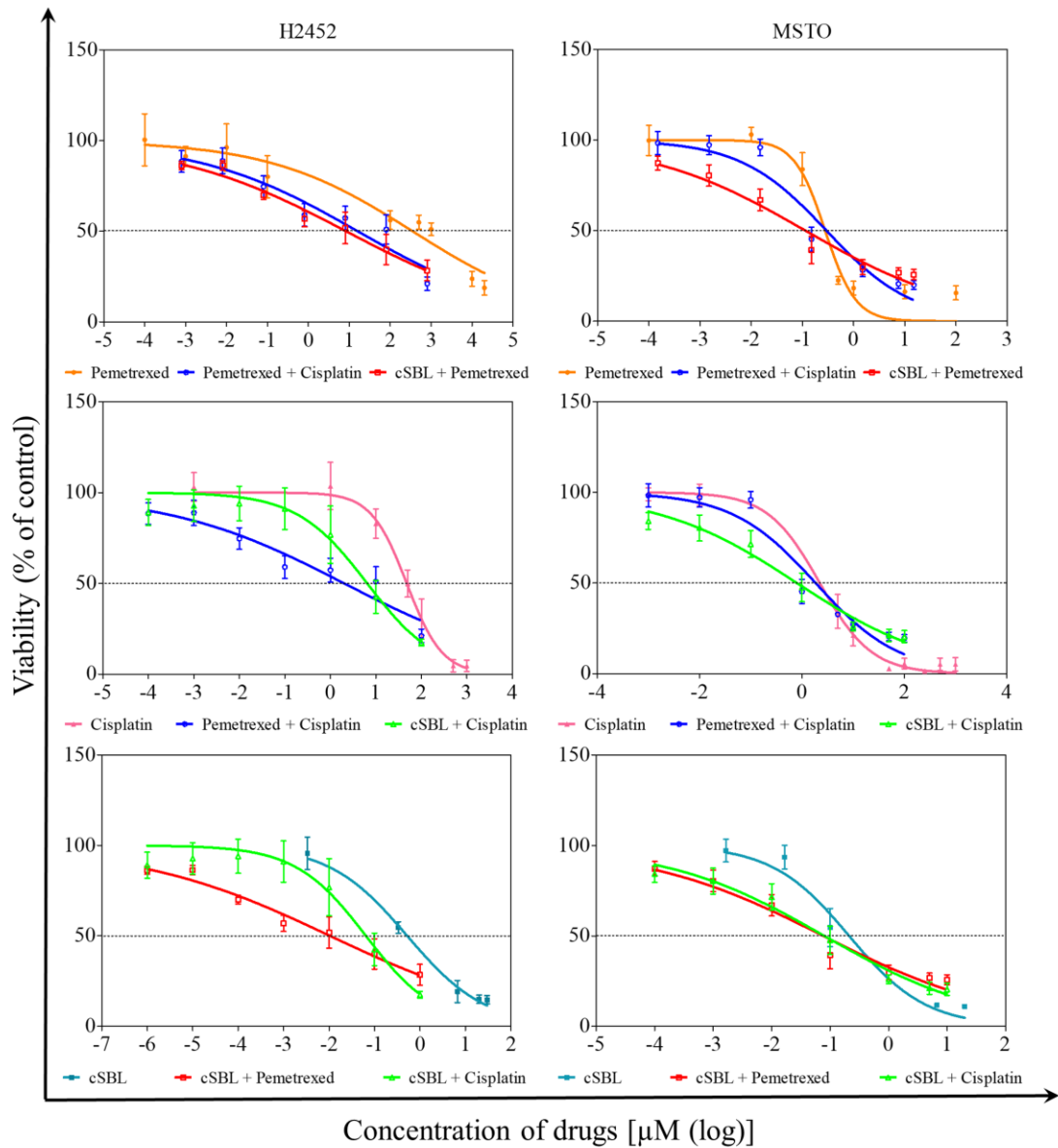


Fig 5. Viability curves of H2452 and MSTO cells treated with pemetrexed, cisplatin, and cSBL, either alone or in combination.

Each group of cells was treated with fixed concentration ratios of pemetrexed:cisplatin:cSBL as follows: 800:100:1 (for H2452 cells) or 3:20:2 (for MSTO cells). Each data point represents the mean \pm SD of at least three independent WST-8 assays. Each sample was plated in triplicate. The y-axis indicates the viability of cells. The x-axis indicates the concentration of pemetrexed (upper), cisplatin (middle), or cSBL (lower).

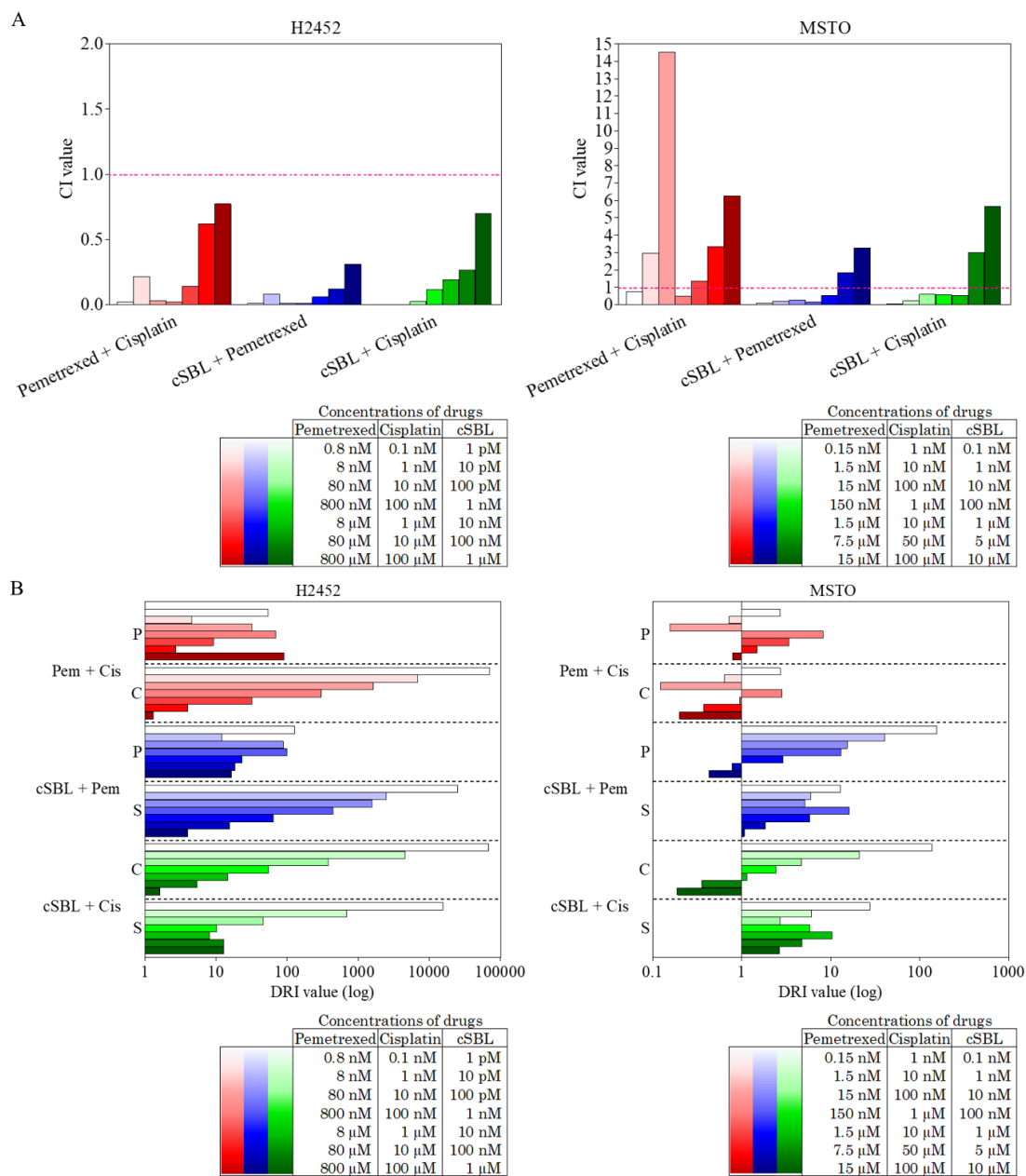


Fig 6. Pharmacological interactions between pemetrexed, cisplatin and cSBL in H2452 and MSTO cells.

(A) CI values of each combination (CI=1 indicates an additive effect; CI<1 indicates a synergistic effect; and CI>1 indicates an antagonistic effect).

(B) DRI values of each reagent (DRI=1 indicates no dose reduction; whereas DRI >1 and <1 indicate favorable and unfavorable dose-reductions, respectively). Pem or P, pemetrexed; Cis or C, cisplatin; S, cSBL.

第四節 考察

当研究室におけるこれまでの研究で、悪性中皮腫細胞株である H28, MESO-1, および MESO-4 に対して cSBL 処理を行うと、アポトーシス誘導率を反映するアネキシン V 陽性細胞率が増加することを報告しており、⁴⁰⁾ また第一章では、前述の 3 種の細胞に加え、H2452 および MSTO 細胞を用いた実験から、cSBL の細胞増殖抑制効果が pemetrexed や cisplatin と比較して高いがん細胞選択性を示すことを明らかにした。⁹³⁾ 悪性中皮腫細胞に対する cSBL のアポトーシス誘導メカニズムは、H28 細胞を用いてよく検討しており、cSBL 処理によって、caspases 経路、アポトーシス促進性の Bcl-2 ファミリータンパク質 Bik および Bim, ならびに MAPK である JNK および p38 が活性化することなどを報告している。⁴⁰⁾ しかし、*in vivo* における悪性中皮腫への cSBL の効果は今日まで検討されておらず、本章では生体を用いた検討を行った。

H28, MESO-1, および MESO-4 細胞は、ヌードマウスにおいて腫瘍を形成しなかったため、移植可能であった H2452 および MSTO 細胞を用いて異種移植モデルマウスを作製した。先にこの 2 種の細胞における cSBL の抗腫瘍効果を *in vitro* 実験系で検討した。その結果、両細胞で生化学的および形態学的なアポトーシス変化である、ホスファチジルセリンの表出および核の凝縮・断片化が時間依存的に観察された (Fig. 2)。さらに、caspase-9 の活性化が、caspase-8 の活性化より早期かつ強く起こることから、内在性経路によるアポトーシスの誘導が示唆された (Fig. 3)。*In vivo* における検討では、いずれの投与群でも実験期間中に顕著な毒性や体重変化は観察されなかった (Fig. 4A, 4B)。また、どちらの細胞を移植したマウスでも、未処理群と比較すると cSBL 投与群で有意な腫瘍増殖の抑制が観察された。さらに、H2452 移植マウスでは、

cSBL 投与群の腫瘍増殖抑制効果が pemetrexed 投与群と比較し早期に観察され、MSTO 移植マウスでは pemetrexed 投与による腫瘍増殖の抑制は観察されなかった (Fig. 4C, 4D). MSTO 移植マウスにおいて pemetrexed による腫瘍増殖抑制が観察されなかった理由は不明であるが、MSTO 細胞の *in vivo* における高い増殖能が関連しているのではないかと考えられる。本研究では、cSBL (腫瘍内投与) と pemetrexed (腹腔内投与) の投与経路は異なるが、一般的に *in vivo* の研究で用いられている pemetrexed の投与条件で、腫瘍増殖抑制効果が弱いかまたはほとんど得られなかった、すなわち、生体の薬剤に対する感受性が低いと思われる状況においても、cSBL は毒性を示すことなく腫瘍増殖を抑制した。以上のことから、cSBL は生体に対しても安全に使用できる可能性が示唆されたが、今後さらに最大耐容量や適切な投与経路の検討などが必要になると考えられる。

2 剤以上の薬剤による併用療法は、治療薬剤への耐性獲得や副作用の発現リスクの低減、および抗がん剤の治療効果を十分に発揮させることを目的とした、今日のがん治療の要であり、⁹⁴⁾ 悪性中皮腫治療の標準レジメンである pemetrexed + cisplatin をはじめとする様々ながん治療レジメンが存在する。H28 細胞におけるこれら既存治療薬と cSBL の併用効果については第一章で述べたが、本章ではさらに異種移植に用いた H2452 および MSTO 細胞における相乗効果ならびに薬剤用量減少効果を評価した。その結果、両細胞株で cSBL + pemetrexed が最も高い相乗性を示すことが明らかになった (Fig. 5B)。また、驚くべきことに、本研究により、MSTO 細胞に対して既存レジメンが拮抗的に作用する可能性が示された。さらに DRI に関しても、MSTO 細胞に対する pemetrexed + cisplatin 以外の併用では高い効果が得られた (Fig. 5C)。以上の結果から、cSBL + pemetrexed は様々なタイプの悪性中皮腫に対し有効な併用レ

ジメンと考えられる。一方で、悪性中皮腫化学療法ゴールドスタンダードとなっている *pemetrexed + cisplatin* は、その効果が細胞の表現型に依存し、患者背景次第では有害作用を起こす可能性があるものと考えられる。

すでに述べたように、*pemetrexed + cisplatin* 療法により生存期間中央値、および奏効率の改善が報告されているが、²⁶⁾ 約半数の症例で治療終了後早期に、最終的にはほぼすべての症例で耐性化が生じることが知られている。⁹⁵⁾ そのため、悪性中皮腫治療の改善を目指す研究が積極的に試みられている。その一例として、*carboplatin + pemetrexed* あるいは *gemcitabine + cisplatin* と既存レジメンの比較を行った第 II 相試験では、これらの組み合わせが良好な結果をもたらすことが報告されている。⁹⁶⁻⁹⁸⁾ さらに、抗 EGFR 剤や programmed cell death 1 (PD-1) receptor 抗体などの分子標的薬、免疫療法剤を用いた治験も現在進行中である。⁹⁸⁾ 本研究では、*cSBL* が *in vitro* において複数種の悪性中皮腫細胞に対し、内在性経路によるアポトーシスを誘導すること、*in vivo* において異種移植モデルでの腫瘍増殖を抑制することを示した。*cSBL* は、RNA を標的とした新規作用メカニズムの治療薬候補であり、今後は化学療法を行う上で問題となっている *pemetrexed* 耐性への知見を得るため、耐性株に対する *cSBL* の効果の検討が研究課題の一つとして挙げられる。

第三章

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

第一節 序

第一章および第二章でも述べたように、悪性中皮腫の化学療法の選択肢は限られている。しかし、このがんは多くの化学療法剤に対して高い抵抗性を示し、放射線療法や手術療法に対しても抵抗性を示すことが知られている。^{26,99)} Pemetrexed + cisplatin 併用療法を行った患者のほとんどで、がんの増悪または再発、^{28,29)} あるいは薬剤耐性が問題となっている³⁰⁾ が、薬剤耐性の詳細なメカニズムは未だ不明な点も多い。いくつかの報告で、pemetrexed の主要な標的分子であるチミジル酸シンターゼ (TS)^{30,100,101)} や多剤耐性に関与する ABCC ファミリータンパク質¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾ の発現増加が耐性獲得の原因となっていることが示唆されている。近年では、非臨床試験あるいは臨床試験で上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKIs) や抗体医薬品の単独または併用療法が悪性中皮腫に効果を示すことが報告されており、^{14,105-109)} 切除不能例に対する pemetrexed + cisplatin + bevacizumab 3 剤併用療法などが期待を集めているが、¹⁰⁸⁾ 未だ悪性中皮腫に対して安定で高い治療効果を発揮する薬剤はなく、新たな治療薬の開発が望まれている。

cSBL の機能および現在明らかになっているメカニズムの詳細は、緒論および第一・二章において述べたが、このタンパク質はレクチン活性と RNase 活性を介した抗腫瘍活性を併せ持つ多機能性タンパク質であることから“レクザ

イム”とも呼ばれている。cSBL は、RNA を標的としたこれまでにない抗腫瘍メカニズムを介することから、新規がん治療薬の候補になり得ると考えられており、これまでに、悪性中皮腫を含む多くのがん細胞株に対し、アポトーシス誘導を介した細胞傷害作用を示すことが報告されている。⁴⁰⁾ さらに、緒論および第一章で論じたように、*in vitro* において TRAIL,⁴⁰⁾ pemetrexed⁹³⁾ あるいは IFN- γ ⁴²⁾ など数種の薬剤との併用で、cSBL はいずれも高い相乗性をもつ細胞傷害作用を示すことが報告されている。

本章では、新しい悪性中皮腫治療薬の候補として cSBL, TRAIL および EGFR-TKIs (erlotinib, gefitinib, vandetanib) に着目し、それらの有効性を検討した。また、臨床で治療を行う際の障壁の一つとなる悪性中皮腫の pemetrexed 耐性に対する知見を得るため、この薬物に対する耐性細胞を新規に樹立、または入手し、耐性化した細胞に対する各薬剤の効果についても確認した。さらに 2 剤あるいは 3 剤併用時の細胞増殖抑制効果および併用効果についても検討を行い、相乗性・作用機序の観点から合理的な多剤併用に関する考察を行った。

第二節 実験材料および実験方法

1. 細胞培養

細胞は悪性中皮腫細胞株 H28, H2452 および不死化正常中皮細胞株 MeT5A を使用した. Pemetrexed 耐性 H2452 細胞 (H2452-PR) は, 千葉大学大学院医学研究院 先端化学療法学 滝口裕一教授より譲渡されたものを用いた. 各細胞は, 第一章, 第二節, 第1項で述べた方法で培養した.

2. 材料

本章で用いた cSBL はすべて大腸菌発現系を用いたリコンビナント体であり, 既報³⁹⁾ に従い作製, 精製したものを用いた. 表記はすべて cSBL とした. Pemetrexed disodium salt heptahydrate, cisplatin, 抗 caspase-3 抗体, 抗 p21 抗体 (12D1), HRP 標識抗マウス IgG 抗体, HRP 標識抗ラビット IgG 抗体, 抗 cyclin A 抗体 (H-432), 抗 β -actin 抗体は第一章, 第二節, 第 2 項にあるものと同様のものを用いた. Erlotinib hydrochloride は和光純薬工業より, gefitinib および vandetanib は SYNkinase より抗 Bid 抗体は Cell Signaling Technology より購入した.

3. Pemetrexed 耐性 H28 細胞株 (H28-PR) の樹立

6-well plate に H28 細胞を 1×10^5 cells/well になるように播種し, pemetrexed を加え 72 時間培養した. その後, 培地および pemetrexed を除去, 細胞表面を洗浄し, 新鮮な培地を加え薬剤耐性化した細胞を含むコロニーが得られるまで, さらに 10-14 日培養した. その後, このコロニーを回収し, pemetrexed の濃度を段階的に増加させた. この操作は約 12 ヶ月継続して行い, pemetrexed の濃度は $0.1 \mu\text{g/mL}$ より開始, 漸増し, 終濃度は H28 細胞の IC_{50} に相当する $7.0 \mu\text{g/mL}$ とした.

4. 細胞生存率の測定

細胞生存率は、第一章、第二節、第 3 項で述べた WST-8 法を用いて決定した。各薬剤は以下の濃度域で培地中に加え、72 時間培養した。Pemetrexed, 1 nM–10 mM ; cisplatin, 1 nM–100 μ M ; cSBL, 1 nM–30 μ M ; TRAIL, 1 pg/mL–100 ng/mL ; erlotinib, 10 nM–100 μ M ; gefitinib, 10 nM–50 μ M ; vandetanib, 10 nM–100 μ M. 450 nM および 600 nM の吸光度の測定は、Infinite™ 200 PRO および i-control™ software (Tecan Japan 社製) を用いて行った。IC₅₀ は GraphPad Prism 5.0 software を用いて算出した。

5. 薬剤併用効果の検討

薬剤併用時の生存率の測定は、第一章、第二節、第 4 項の方法で行った。2 剤併用処理には H28 および H28-PR 細胞を用い、3 剤併用処理には H28 細胞を用いた。薬剤は pemetrexed, cisplatin, cSBL, TRAIL, および erlotinib より任意の 2 種あるいは 3 種を同時に処理した。濃度は 2 剤処理時は IC₅₀ を基に処理濃度比を固定したものを、また 3 剤処理時は IC₅₀ より算出した IC₂₀ (GraphPad QuickCalcs: EC_{anything} from EC₅₀ を用いて算出) を基に処理濃度比を固定したものを、72 時間培養後に吸光度を測定した。各併用時の処理濃度比は以下の通りである: pemetrexed + cisplatin (1:1), pemetrexed + erlotinib (1:1.5), cSBL + pemetrexed (1:20), cSBL + erlotinib (1:30), cSBL + TRAIL (1:5), pemetrexed + cisplatin + cSBL (0.03:4:0.03), pemetrexed + cisplatin + TRAIL (0.03:4:1.3), pemetrexed + cisplatin + erlotinib (0.03:4:5.6), pemetrexed + cSBL + TRAIL (0.03:0.03:3.1)。併用効果の指標である CI と併用時の薬物用量の減少効果の指標である Dose Reduction Index (DRI) の算出は既報⁴⁵⁾ を参考に CompuSyn software (ComboSyn 社製) を用いて行った。CI および DRI の算出は第一章、第二節、第 4 項および第二章、第二節、第 6 項と同様の方法で行った。

6. ウェスタンブロット法

60 mm dish に H28 および H28-PR 細胞を 2×10^5 cells/well になるように播種し, pemetrexed, cisplatin, cSBL, TRAIL, および erlotinib を終濃度がそれぞれ 30 nM, 4 μ M, 30 nM, 1.3 ng/mL, および 5.6 μ M となるように加えた. 48 時間後, 第一章, 第二節, 第 6 項に述べた方法で whole cell lysate の作製, タンパク質濃度の測定およびウェスタンブロットを行い, タンパク質バンドを検出した.

第三節 結果

1. 抗腫瘍効果および細胞選択性の比較.

まず初めに, 悪性中皮腫の治療薬として承認されている pemetrexed, cisplatin と cSBL, TRAIL, および EGFR-TKIs (erlotinib, gefitinib, vandetanib) の細胞増殖抑制効果を, WST-8 法により測定した. Fig. 1 に示すように, いずれの薬剤も悪性中皮腫細胞 H28 および H2452 に対して増殖抑制効果を示すが, cSBL, TRAIL, および EGFR-TKIs は正常細胞 MeT5A に対し本研究で用いた最大濃度でも 50% 程度の生存率を維持しており, 正常細胞に対する増殖抑制効果が低いことが示された. 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く, がん細胞選択性が高いことが示されたが, 一方で pemetrexed, cisplatin, および TRAIL の H2452 細胞に対する作用は, H28 細胞と比較して低いことが明らかとなった.

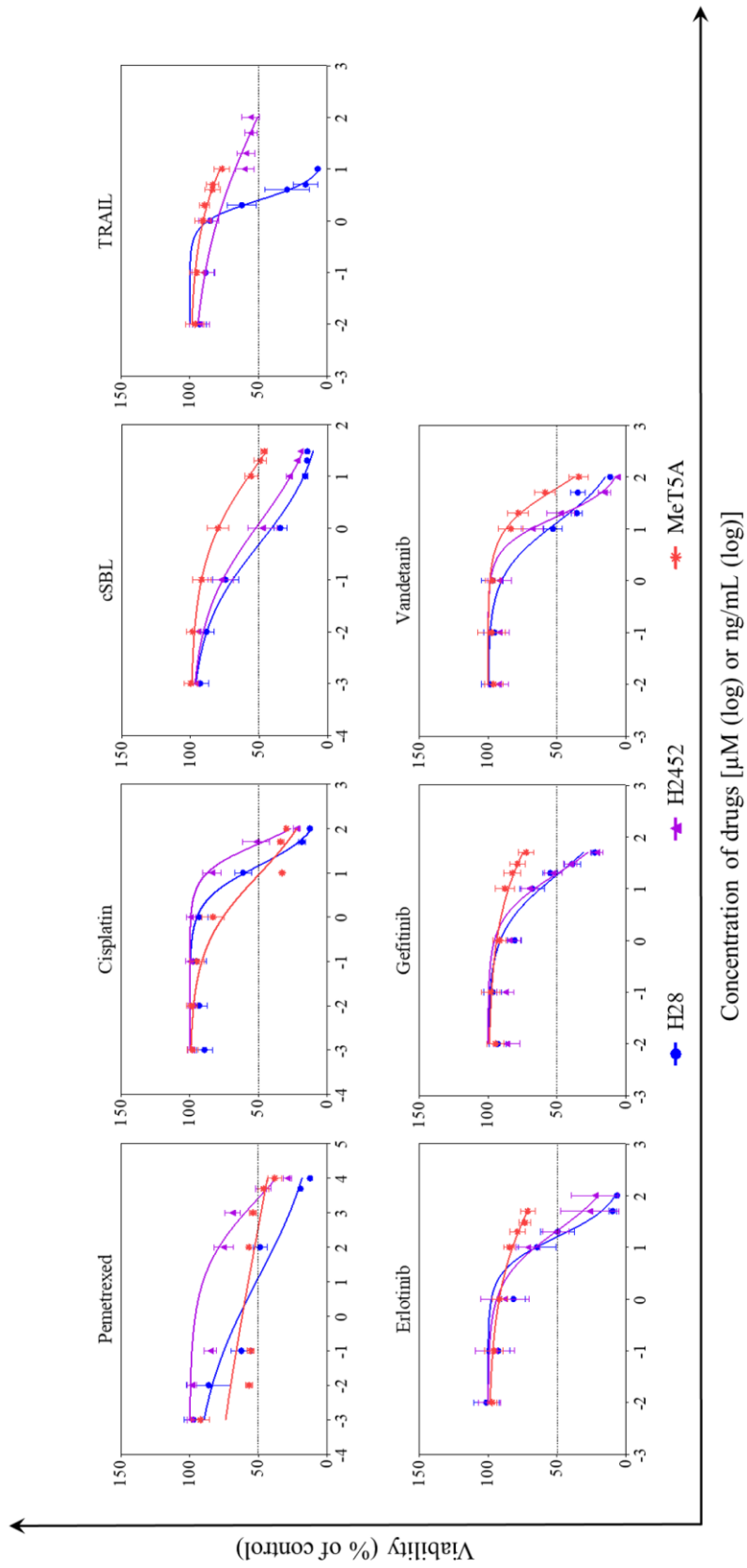


Fig. 1 Dose-response curves in the malignant mesothelioma cell lines H28 and H2452, and the mesothelial cell line MeT5A treated with pemetrexed, cisplatin, cSBL, TRAIL, erlotinib, gefitinib or vandetanib.

Cells were treated with pemetrexed (1 nM–10 mM), cisplatin (1 nM–100 μ M), cSBL (1 nM–30 μ M), TRAIL (10 pg/mL–100 ng/mL), erlotinib (10 nM–100 μ M), gefitinib (10 nM–50 μ M) or vandetanib (10 nM–100 μ M) for 72 h. The dots and bars represent the mean and SD, respectively. Dose-response curves are depicted as lines.

2. Pemetrexed 耐性株に対する抗腫瘍効果の比較

次に、現在化学療法を行う上で問題となっている pemetrexed 耐性株に対する各薬剤の効果を、H28-PR および H2452-PR を用いて比較した。その結果を Fig. 2 に示す。どちらの耐性株も親株と比較すると、pemetrexed に対して耐性を示し、その耐性度 (Resistance Rate: RR) は、それぞれ H28-PR が 4.99, H2452-PR が 3.97 となった (Table 1)。他の薬剤に対する感受性は、細胞株ごとに異なるが、H28-PR は cisplatin および cSBL に対しては親株と比べて感受性が増加し、TRAIL, erlotinib, および vandetanib への感受性は親株とほとんど変わらず、gefitinib に対してはわずかに感受性が低下することが明らかになった。一方、H2452-PR は cisplatin, cSBL, gefitinib, および vandetanib に対して交叉耐性を示すが、erlotinib および TRAIL に対しては交叉耐性を示さず、特に TRAIL に著しく高い感受性を示した。

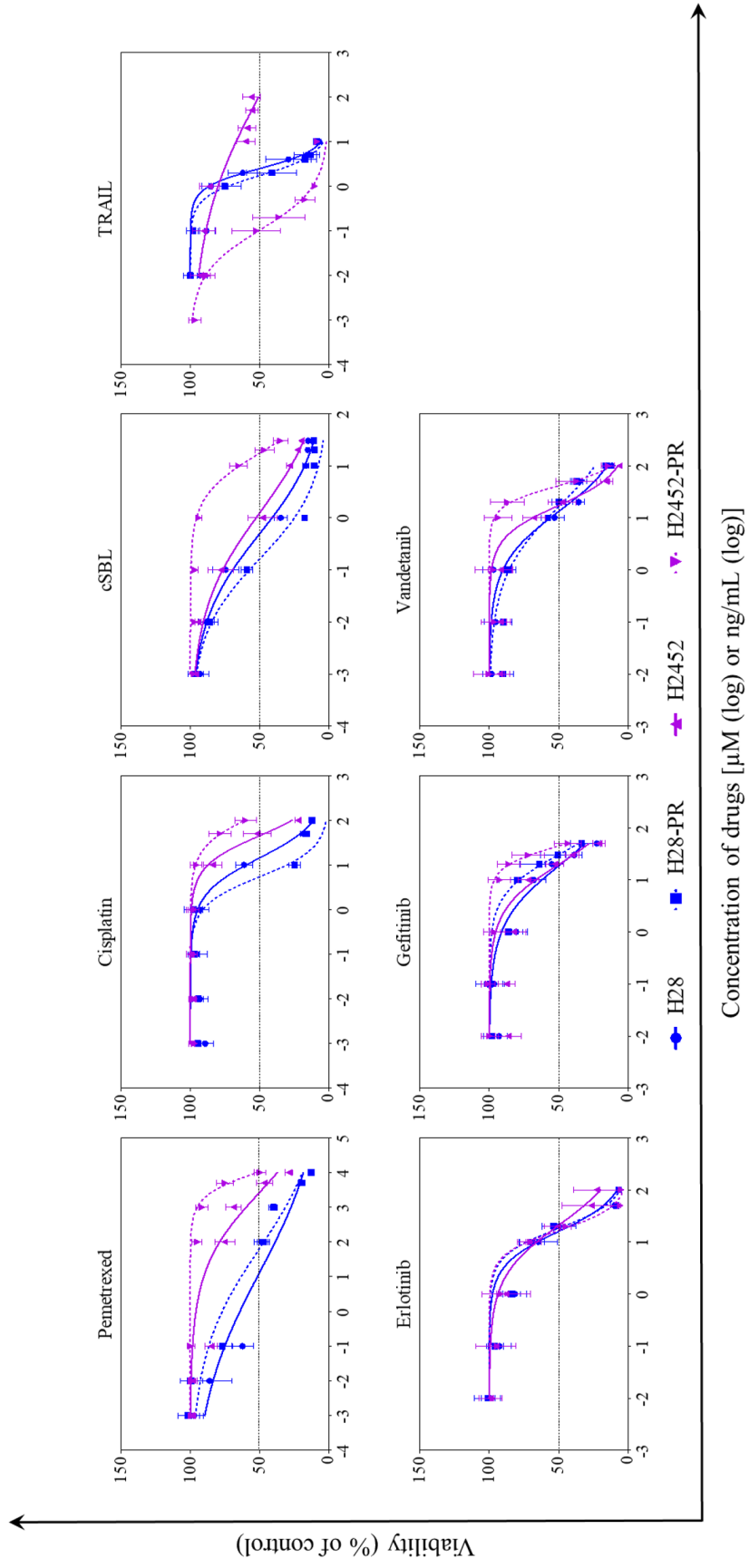


Fig. 2 Dose-response curves in the mesothelioma cell lines H28 and H2452, and their pemetrexed-resistance cell lines H28-PR and H2452-PR treated with pemetrexed, cisplatin, cSBL, TRAIL, erlotinib, gefitinib or vandetanib.

Cells were treated with pemetrexed (1 nM–10 mM), cisplatin (1 nM–100 μ M), cSBL (1 nM–30 μ M), TRAIL (1 pg/mL–100 ng/mL), erlotinib (10 nM–100 μ M), gefitinib (10 nM–50 μ M) or vandetanib (10 nM–100 μ M) for 72 h. The dots and bars represent the mean and SD, respectively. Dose-response curves are depicted as lines or dotted lines.

Table 1 IC₅₀ values (μ M) and resistance rate of drugs in malignant mesothelioma cells

Drugs		H28	H28-PR	H2452	H2452-PR	MeT5A	Target
Pemetrexed	IC ₅₀	13.04	65.03	2658.00	10551.00	ND	TS DHFR GRAFT
		5.85 to 29.07	40.00 to 105.7	1925 to 3670	9526 to 11685		
	RR		4.99		3.97		
Cisplatin	IC ₅₀	14.37	5.44	45.02	141.30	8.92	DNA
		12.32 to 16.76	4.45 to 6.64	41.10 to 49.33	119.4 to 167.3	6.82 to 11.68	
	RR		0.38		3.14		
cSBL	IC ₅₀	0.49	0.16	1.23	17.32	19.04	RNA
		0.40 to 0.60	0.13 to 0.19	1.01 to 1.49	16.12 to 18.61	16.04 to 22.60	
	RR		0.33		14.10		
TRAIL	IC ₅₀	2.48	1.73	108.30	0.10	202.10	TRAIL-R
		2.26 to 2.72	1.57 to 1.90	67.52 to 173.6	0.08 to 0.13	58.95 to 692.6	
	RR		0.70		0.0010		
Erlotinib	IC ₅₀	15.88	18.28	20.82	16.60	ND	EGFR
		13.51 to 18.68	16.39 to 20.40	16.13 to 26.87	15.68 to 17.58		
	RR		1.15		0.80		
Gefitinib	IC ₅₀	18.38	30.34	19.70	44.85	ND	EGFR
		15.71 to 21.51	25.85 to 35.60	16.67 to 23.29	41.24 to 48.77		
	RR		1.65		2.28		
Vandetanib	IC ₅₀	13.18	16.20	17.18	41.49	60.95	EGFR VEGFR-2/3 RET
		11.21 to 15.48	13.63 to 19.27	15.37 to 19.20	37.16 to 46.32	53.31 to 69.68	
	RR		1.23		2.42		

The 95% confidence intervals for each IC₅₀ value are shown in bottom row. The RR value was calculated as the IC₅₀ value of each agent in resistance cells divided by the IC₅₀ value in each parent cell line. ND: not determined

3. 2 剤併用時の併用効果の検討

次に、他剤に対する交叉耐性がほとんど見られなかった H28-PR と親株の H28 細胞を用いて、2 剤併用時の併用効果について検討した。EGFR-TKIs は細胞株による効果の差が最も小さかった erlotinib を用いた。Pemetrexed を含む併用では、いずれの組み合わせでも H28 および H28-PR で用量-反応曲線が左へシフトし、併用により細胞増殖抑制効果が高くなることが示された (Fig. 3 上)。一方で、cSBL との併用では、H28 および H28-PR どちらの細胞株でも、erlotinib との併用による細胞増殖抑制効果の増強はほとんど見られず、TRAIL との併用でも、低濃度側では増殖抑制効果の増強は起こらないことが示された (Figure3 下)。また、これらの薬剤の組み合わせにおける CI を算出したものを Fig. 4 に示した。この結果から、pemetrexed + cisplatin (PC) および cSBL + pemetrexed (SP) が高い相乗性を示す組み合わせであることが示された。また、pemetrexed + erlotinib (PE) の増殖抑制効果は PC とほとんど変わらないが相乗性は低いこと、cSBL + erlotinib (SE) は増殖抑制効果も相乗性も低い組み合わせであり、cSBL + TRAIL (ST) は、濃度ごとの相乗効果にばらつきが生じることが明らかになった。

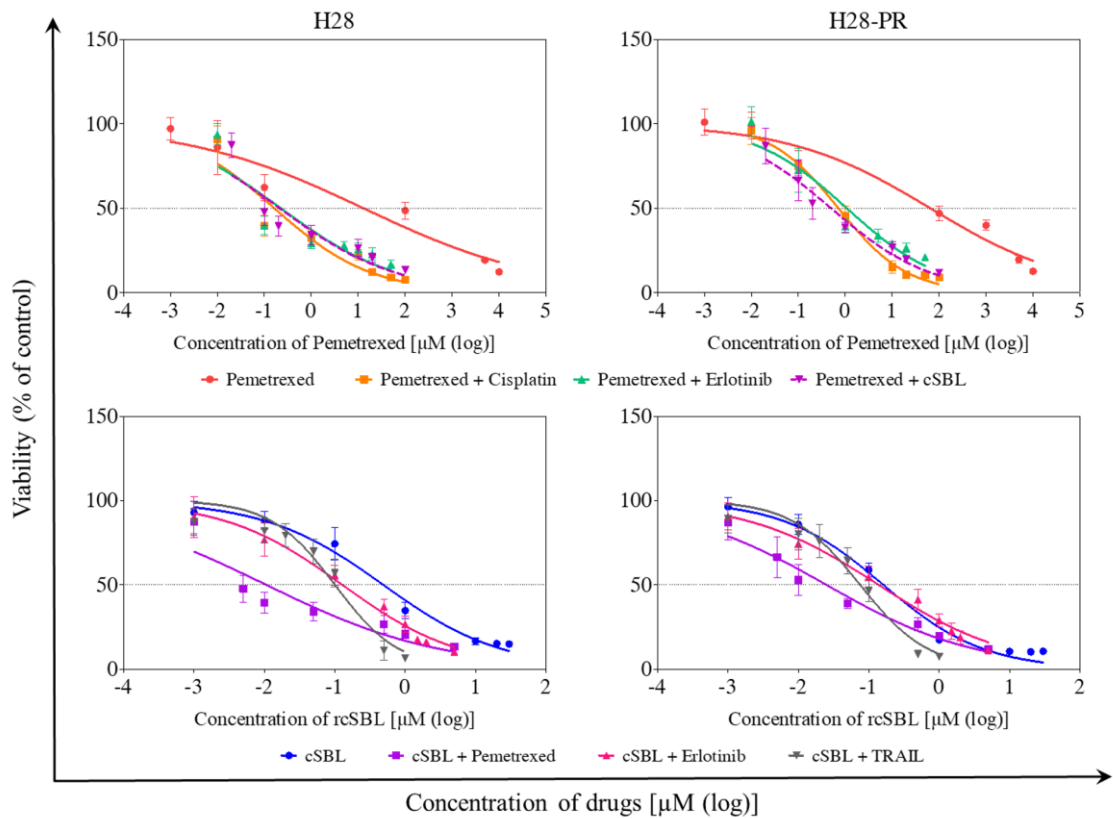


Fig. 3 Dose-response curves in H28 and H28-PR cells in dual combination therapy.

Cells were treated with pemetrexed + cisplatin, pemetrexed + cSBL, pemetrexed + erlotinib, cSBL + erlotinib or cSBL + TRAIL for 72 h. X-axis of upper panels or lower panels show concentration of pemetrexed or cSBL, respectively. The dots and bars represent the mean and SD, respectively. Dose-response curves are depicted as lines or dotted lines.

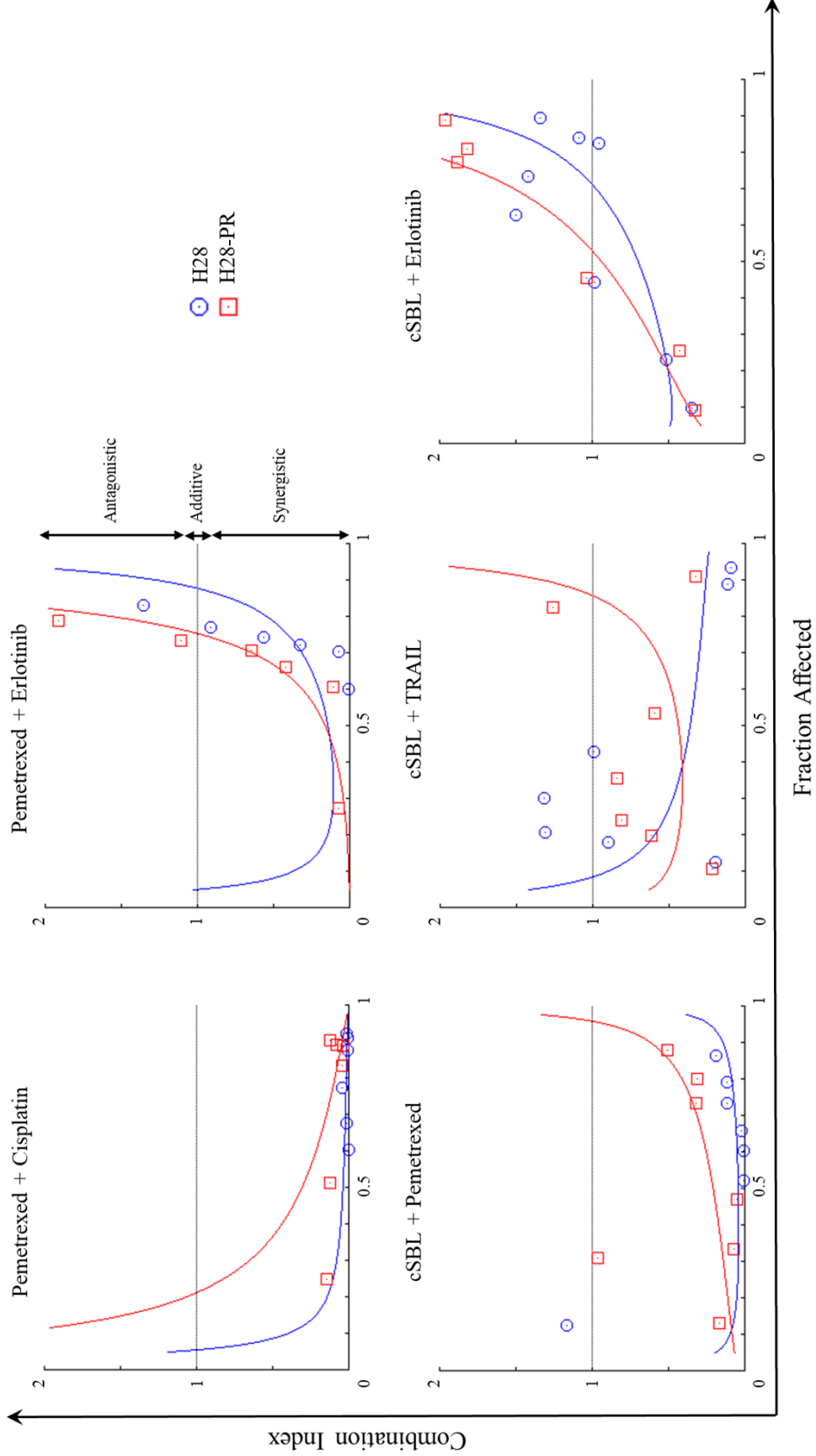


Fig. 4 CI-Fa curves for H28 and H28-PR cells in dual combination therapy.

The drug concentration ratios were as follows: pemetrexed + cisplatin (1:1), pemetrexed + erlotinib (1:1.5), cSBL + pemetrexed (1:20), cSBL + erlotinib (1:30) or cSBL + TRAIL (1:5). Cells were treated with pemetrexed (10 nM–100 μ M), cisplatin (10 nM–100 μ M), cSBL (1 nM–10 μ M), TRAIL (5 pg/mL–50 ng/mL) or erlotinib (15 nM–150 μ M) for 72 h. CI values less than 1 indicate a synergistic effect, CI values greater than 1 indicate an antagonistic effect and CI values equal to 1 indicate an additive effect.

4. 3 剤併用時の併用効果の検討

現在、欧米諸国を中心に、pemetrexed + cisplatin の現行レジメンに TKIs や抗体医薬品を組み込んだ新規レジメンが承認されるかあるいは治験が進行している。本章、第三節、第 3 項において併用効果を検討した 5 種の薬剤から 3 剤を選び、それぞれの組合せにおける併用効果について検討を行った。本研究では、3 剤併用レジメンとして、pemetrexed + cisplatin + cSBL (PCS), pemetrexed + cisplatin + TRAIL (PCT), pemetrexed + cisplatin + erlotinib (PCE), および pemetrexed + cSBL + TRAIL (PST) の 4 パターンでの解析を行った。Pemetrexed 単独処理と比較すると、いずれの併用パターンでも用量-反応曲線が大きく左にシフトすることが示された (Fig. 5 左)。また、相乗性に関して解析を行ったところ、すべての併用で高濃度側でしか相乗性が認められなかったものの、PCS が比較的高い相乗性を示した (Fig. 5 右)。さらに、ウェスタンブロット法により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) について検討を行った。各タンパク質については、p21 は cisplatin あるいは erlotinib 処理により発現が増加し G1 期における停止に関わること、^{46,110)} cyclin A は pemetrexed 処理により持続的な活性化が引き起こされ S 期における細胞周期の停止に関わること、⁴⁷⁾ Bid は TRAIL 処理により切断が増強されミトコンドリア障害を介した

細胞死を増強すること、⁴⁰⁾ caspase 3 は cSBL 単独処理あるいは TRAIL との併用時に断片化が増強しアポトーシスが誘導される⁴⁰⁾ ことが、それぞれ報告されている。Fig. 6 に示したように、単独処理では、cyclin A が pemetrexed, cisplatin で増加, cSBL, TRAIL, および erlotinib で減少した。p21 は pemetrexed ではほとんど変化せず, cisplatin, erlotinib で顕著に増加, cSBL, TRAIL で顕著に減少した。Bid は単独処理では顕著な変化は観察されなかった。Cleaved caspase 3 は, cSBL, TRAIL, および erlotinib でわずかに発現が認められた。併用時には, cyclin A は PCE を除いた組み合わせでの増加が確認された。p21 は cisplatin を含む併用で顕著に増加し, 反対に PST では顕著に減少した。Bid は, PCE でわずかに, また PST で顕著に減少した。Cleaved caspase 3 は, 単独処理時に比べすべての併用処理で顕著に増加し, 特に PCE で強い活性化が認められた。

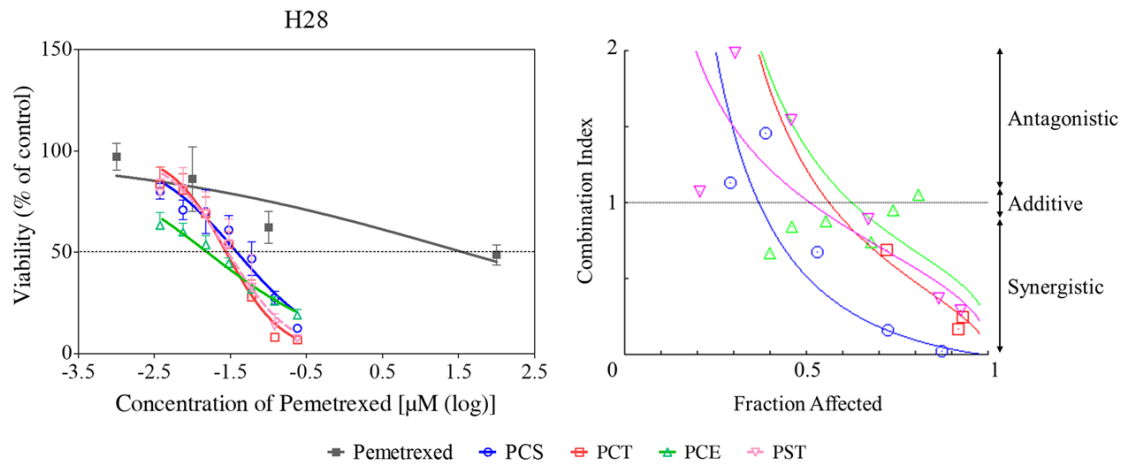


Fig. 5 Dose-response curves and CI-Fa curves for H28 cells in triple combination therapy.

Cells were treated with pemetrexed + cisplatin + cSBL (0.03:4:0.03), pemetrexed + cisplatin + TRAIL (0.03:4:1.3), pemetrexed + cisplatin + erlotinib (0.03:4:5.6) or pemetrexed + cSBL + TRAIL (0.03:0.03:3.1). Cells were treated with pemetrexed (3.75 nM–240 nM), cisplatin (500 nM–32 μM), cSBL (3.75 nM–240 nM), TRAIL (162.5 pg/mL–10.4 ng/mL) or erlotinib (700 nM–44.8 μM) for 72 h. Left panel shows viability of H28 cell lines. Right panel shows CI-Fa curves of each combination in H28 cell lines. The dots and bars represent the mean and SD, respectively. Dose-response curves are depicted as lines or dotted lines.

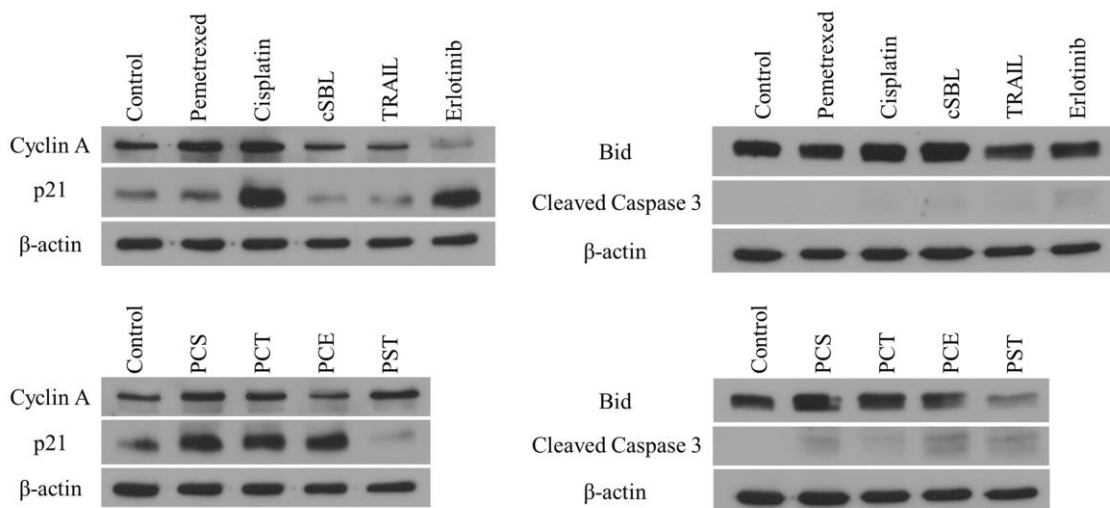


Fig. 6 Western blot analysis of proteins related to anti-tumor activities of each drug.

H28 cells were treated with IC_{20} values of each drug (pemetrexed: 0.03 μM , cisplatin: 4 μM , cSBL: 0.03 μM , TRAIL: 1.3 ng/mL and erlotinib: 5.6 μM) in single or triple treatment for 48 h.

5. 薬剤用量減少効果の比較

第二章，第三節，第 5 項と同様の方法で，H28 細胞および H28-PR に対する既存レジメン PC と，本研究において有用性が示唆された cSBL を含む併用レジメン (SP, PCS, および PST) における各薬剤の DRI を， $Fa = 0.5$ において算出した (Table 2). H28 細胞における用量減少効果は，PC で pemetrexed, 94.9 ; cisplatin, 31.7, SP で cSBL, 28.5 ; pemetrexed, 88.2 と算出され，その効果は PC と SP で同程度であった．一方で，H28-PR においては，PC で pemetrexed, 43.7 ; cisplatin, 3.5, SP で cSBL, 5.0 ; pemetrexed ; 95.5 となり，PC と比較すると SP で 2 倍以上 pemetrexed の用量減少効果が期待できることが示された．また，3 剤併用時はいずれの併用においても，各薬剤で 1 以上の DRI が算出され，良好な減少効果を示した．特に pemetrexed の用量減少効果は PCS で 893 倍，PST で 1185 倍となり，PC または SP と比較しても 10 倍以上の高い用量減少効果が示された．

Table 2 CI and DRI values of H28 and H28-PR cells in dual or triple combination therapy

Combination regimen		CI value	DRI value			
			Pemetrexed	Cisplatin	cSBL	TRAIL
H28	PC	0.04	94.85	31.67	–	–
	SP	0.05	88.20	–	28.48	–
	PCS	0.52	893.01	2.24	14.42	–
	PST	1.02	1185.88	–	19.14	1.03
H28-PR	PC	0.31	43.68	3.47	–	–
	SP	0.21	95.50	–	4.98	–

The CI and DRI values at $Fa = 0.5$ were calculated as indicated in methods section. Pemetrexed + cisplatin; PC, cSBL + pemetrexed; SP, Pemetrexed + cisplatin + cSBL; PCS, Pemetrexed + cSBL + TRAIL; PST

第四節 考察

本章では、cSBL, TRAIL, および EGFR-TKI を含む新規悪性中皮腫治療薬候補と、悪性中皮腫に対する治療薬として現在使用されている、pemetrexed および cisplatin の細胞増殖抑制効果について比較し、さらに多剤併用効果についても検討を行った。また、肉腫性中皮腫細胞株 H28 と上皮性中皮腫細胞株 H2452, およびそれぞれの pemetrexed 耐性細胞株を用い、既存治療薬および治療薬候補物質の耐性細胞への効果を検討した。その結果、本研究で用いた候補薬剤は、現行の治療薬と比較して高いがん細胞選択性を示した (Fig. 1, Table 1)。また、化学療法を行う上での問題となっている pemetrexed 耐性に対しては、細胞種および各薬剤によって反応性に差異があり、交叉耐性を示すもの (H2452-PR に対する cisplatin, cSBL など) もあったが、pemetrexed 耐性株でより強い細胞増殖抑制効果が認められた (H28-PR に対する cisplatin, cSBL, および H2452-PR に対する TRAIL など) (Fig. 2) ケースもあることから、耐性克服への糸口がつかめる有用な知見が得られた。さらに、種々の組合せによる 2 剤併用効果を検討したところ、pemetrexed + cisplatin および cSBL + pemetrexed の 2 種の組合せが高い相乗性を示す一方で、erlotinib を含む組合せでは相乗性が低く、前者 2 つの組合せの有用性が確認された (Fig. 3, 4)。さらに、3 剤併用による細胞増殖抑制効果を観察したところ、本研究で検討した組合せの中では pemetrexed + cisplatin + cSBL で最も高い相乗効果が得られた (Fig. 5)。各薬剤の作用機序に関わるタンパク質の挙動をウェスタンブロット法により観察したところ、既報^{93,111)}と一致して pemetrexed が cyclin A の発現を安定化する一方で、erlotinib がその発現を減少させることや、cisplatin が p21 の発現を上昇させる一方、cSBL や TRAIL ではその発現を減少させるな

ど、相反する作用が確認された。各薬剤の作用機序に着目すると pemetrexed + cSBL + TRAIL の合理性が示唆された (Fig. 6)。DRI を指標に薬剤用量減少効果を評価した結果、H28 細胞に対する用量減少効果は、PC と SP は同程度であったが、腎障害などの様々な副作用を生じうる cisplatin¹¹²⁾ を、正常細胞に対して作用しづらい cSBL に置換することで、より有害作用の少ない治療を行える可能性があると考えられる。また、3 剤併用時にはより高い pemetrexed の用量減少効果が認められた。さらに、耐性細胞に対しては、PC よりも SP で高い DRI が示され、pemetrexed 耐性を獲得した細胞に対しても、cSBL を含む併用が有効な治療法となる可能性が示された。

その曝露が悪性中皮腫の要因とされるアスベスト繊維は、EGFR への直接的な作用または mRNA レベルでの発現上昇作用により、MAPK や Akt など EGFR の下流シグナルを活性化することが明らかになっている。^{113,114)} 悪性中皮腫の発生に EGFR の発現上昇が寄与することも示唆されており、これらのことから EGFR を標的とした治療薬の開発が検討されている。EGFR-TKI である erlotinib が EGFR に変異を有する患者を対象に、¹¹⁵⁾ また EGFR に対するモノクローナル抗体である cetuximab と cisplatin または carboplatin および pemetrexed との 3 剤併用が EGFR タンパク質を過剰発現している患者を対象¹¹⁶⁾ として臨床試験が行われている。一方、gefitinib や imatinib と cisplatin および gemcitabine との併用では、相乗的または相加的な効果が得られないことが悪性中皮腫細胞株 IST-Mes2 を用いた *in vitro* の実験で報告されている。¹¹⁷⁾ 本研究では、上記報告と同様に、pemetrexed + erlotinib と cSBL + erlotinib の 2 剤併用では有用な併用効果は得られなかった。ウェスタンブロットの結果から、erlotinib の cyclin A 発現低下作用と p21 発現増加作用が、pemetrexed と cSBL のそれぞれの作用と相反しており、相乗性が低い結果が得られたと考え

られる。EGFR-TKIs は、EGFR の発現状況や変異状況によりその効果に差異があることが知られており、細胞種によっては有用な治療薬になる可能性があることから、今後、EGFR の表現型を含めたさらなる検討が必要と考えられる。

TRAIL は TNF リガンドファミリーに属し、がん細胞選択的に細胞傷害作用を示すタンパク質で、がん細胞膜上に特異的に発現する DR4, DR5 に結合して、外因性経路によるアポトーシスを誘導する。いくつかのがんでは TRAIL に対する耐性発現が報告されているものの、TRAIL レセプター標的薬の効果をより強くする試みなど、TRAIL を基礎とした治療法の開発が現在も精力的に行われている。¹¹⁸⁾ 我々はこれまでに、TRAIL と cSBL の併用が、悪性中皮腫細胞に対し、Bid 切断の増強を介したアポトーシスの亢進による相乗的な細胞傷害作用を示すことを報告している。⁴⁰⁾ また近年では、TRAIL と Murine Double Minute 2 (MDM2) 阻害剤¹¹⁹⁾ やプロテアソーム阻害剤¹²⁰⁾ との併用によってもアポトーシスが增強されることが報告され、さらには TRAIL + carboplatin + pemetrexed の 3 剤併用が、carboplatin + pemetrexed の 2 剤併用に比べより強い細胞傷害作用を示すことが *in vitro* および *in vivo* で明らかになっている。

¹²¹⁾ 本研究では、TRAIL を含む 3 剤併用の組合せとして pemetrexed + cisplatin + TRAIL および pemetrexed + cSBL + TRAIL の検討を行った。その結果、いずれにおいても強い細胞増殖抑制効果が観察されたが、pemetrexed + cSBL + TRAIL で、cyclin A や Bid に対する作用が相反しないことから、これら 3 剤併用が有効であると考えられる。

実効性の高い化学療法に向け課題となるのは、副作用（正常細胞に対する毒性）と薬剤耐性である。多剤併用は、異なる作用機序により強い抗腫瘍効果を誘導し、また各薬剤の使用量を減らすことで、それらの課題を克服しうる合理

的な治療戦略である。本研究で試験した cSBL, TRAIL, および EGFR-TKIs はいずれも高いがん細胞選択性を示し、既存の薬剤よりも副作用を低減できる可能性がある。しかしながら、薬剤耐性に関しては、TKIs に対して抵抗性を示す悪性中皮腫の事例が報告されており、それらには EGFR 変異のレアリティ、シグナル伝達に関与するがん抑制遺伝子 PTEN の欠損や EGFR 阻害を代償する MET レセプターの発現および COX2/PGE2 を介したトランス活性化、さらには薬剤排出ポンプなどの関与が示唆されている。¹²²⁻¹²⁵⁾ また、TRAIL に関しては、TRAIL レセプターの変異や発現低下、またはデコイレセプターである DcR1 および DcR2 の発現などによる耐性獲得が種々のがんで確認されている。^{126,127)} cSBL を含む抗腫瘍性リボヌクレアーゼに対するがん細胞の耐性獲得に関してはほとんど知見が得られていないが、細胞内への取り込み阻害などが関与していることが予測される。⁵⁷⁾ 以上のようにがん細胞は、各薬剤の作用機序に依存し、標的分子や代償機構の発現変異などを介して薬剤抵抗性を獲得し得るが、合理的な多剤併用により、耐性の克服が期待できる。特に cSBL は、RNase 活性により細胞内 RNA の切断をするため、多剤併用時において、遺伝子発現を介した耐性変異を抑制する可能性もある。さらに、本研究の結果から、耐性細胞株によっては他の薬剤がより強い細胞増殖抑制効果を示す場合が見いだされ、現行の薬物療法の課題克服に向け有用な知見が得られたと考えられる。

現在の悪性中皮腫の新規治療薬開発研究においては、上述の EGFR-TKIs や血管新生を標的とした bevacizumab の他、FAK を標的とした defactinib や、メソテリンを標的とした amatuximab などの新規分子標的薬、さらには PD-1 を標的とした pembrolizumab などのがん免疫療法薬なども臨床試験が行われている。¹²⁸⁻¹³⁰⁾ 本研究では、*in vitro* における細胞増殖抑制作用に着目して検討

を行い，cSBL 単独あるいは cSBL を含む併用処理の有効性が示されたが，他剤との相互作用を *in vivo* を含めた実験系により精査することが今後の課題と考えている．これらの知見をもとに，悪性中皮腫のより効果的な治療法の開発につながることを期待される．

総 括

本研究では、薬物治療の選択肢が限られ、新規治療薬の開発が望まれている悪性中皮腫を対象に、*in vitro* における既存の治療薬を中心とする他の薬剤との併用を含めた cSBL の有効性の検討ならびに抗腫瘍作用機序の解明を行った。

第一章では、*in vitro* における数種の悪性中皮腫細胞株に対する 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、種々の悪性中皮腫細胞株に対して、既存治療薬と比較して cSBL が強い細胞増殖抑制効果および高いがん細胞選択性を示すことが明らかとなった。また、H28 細胞を用い、2 剤併用時の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性を持つことが示唆された。この相乗効果は、pemetrexed の持つ cyclin A の持続的活性化による細胞周期の停止作用と 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することで引き起こされると考えられる。

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製し、*in vivo* における cSBL の抗腫瘍効果の検討を試みた。まず、*in vitro* における殺細胞メカニズムの解析を行ったところ、既報⁴⁰⁾ 同様に caspase-9, -8, -3 が順次活性化され、アポトーシスが誘導されることが示唆された。*in vivo* における cSBL の有効性の検討では、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、同時にこの濃度においてマウスの有意な体重変化が生じず、cSBL は腫瘍増殖抑制効果が引き起こされる濃度においても生体への影響 (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性を示すことが明らかとなった。

第三章では、さらなる新規治療レジメンの検討のため、悪性中皮腫細胞に対する効果が報告されているあるいは治験が進行している薬剤と cSBL の併用効

果の検討ならびに治療を行う際の障壁の一つとなっている pemetrexed 耐性株への各薬剤および併用レジメンの効果を比較した。本研究で pemetrexed および cisplatin と比較し、cSBL, TRAIL, および EGFR-TKIs は、いずれも高いがん細胞選択性を有することが示された。Pemetrexed 耐性株に対しては、細胞ごと、あるいは薬剤ごとに反応性の差異が生じ、中には交叉耐性を示すものも見られたが、耐性株に対しより強い細胞増殖抑制効果を示す薬剤も存在し、耐性克服に向けた知見が得られた。2 剤併用時には、第一章と同様に、pemetrexed + cSBL が既存レジメンと同程度の抗腫瘍作用および相乗性を示し、耐性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 剤併用時には、pemetrexed + cisplatin + cSBL および pemetrexed + cSBL + TRAIL が、抗腫瘍作用、相乗効果、薬剤用量減少効果、および抗腫瘍メカニズムの観点から、有望な治療レジメンとなりうる可能性が示された。

レクチンは特定の糖鎖を認識するタンパク質である。また、糖鎖とはタンパク質や脂質に結合して主に細胞表面に存在している物質であり、細胞間の情報伝達やタンパク質の機能に多様性を与えている。糖鎖は細胞のがん化により、質的・量的に大きく変化することから、糖鎖性腫瘍マーカーとして、CA19-9 やシアリル Le^x 抗原 (SLX), および AFP レクチン分画 (AFP-L3%) などが臨床診断に用いられている。¹³¹⁻¹³³⁾ がん治療への応用がよく研究されているレクチンにヤドリギ (*viscum album*) 由来のレクチンが知られている。このレクチンは複数のグループにより単離されているため、viscumin, ML-1, VAA など様々な呼称を持っている。ヤドリギエキスの効果は古代ローマ時代より知られ、当時はいわゆる「万能薬」として認識されており、がん、てんかん、喘息、あるいは高血圧など様々な疾患の治療に用いられていたことが書物に記されている。本格的にがん治療への応用へ向け関心がもたれたのは 1920 年代以降といわれている。1980-90 年代に行われた研究により、ヤドリギエキスは免疫系の増強作用および標的細胞のタンパク質合成の阻害を介したアポトーシス誘導により細胞傷害作用を発揮することが示唆されている。¹³⁴⁻¹³⁶⁾ さらに、エキス中の成分を分析したところ、ML-1, -2, -3, およびキチン結合性アグルチ

ニンの 4 種のレクチンが同定されている。このうち、ML-1 を選択的に枯渇させた場合、ヤドリギエキスの持つ免疫賦活作用および細胞傷害作用が顕著に減弱したことから、ML-1 がヤドリギの薬理活性において重要な役割を担っていると考えられている。^{137,138)} ヤドリギエキスおよびレクチン関連製剤は日本国内においては認可されていないが、iscador, isorel, vysorel, helixor, あるいはiscusin などの製剤がヨーロッパを中心に使用されている。しかし、臨床試験の結果に対する疑問点や重度のアナフィラキシーショックなどの有害作用の報告もあり、¹³⁹⁻¹⁴³⁾ レクチン製剤として一般的に使用されるにはいくつもの障壁が存在すると考えられる。一方で近年、糖鎖を介したがん治療薬の開発が複数進行しており、¹⁴⁴⁾ 乳がんにも過剰発現している糖タンパク質である human epidermal growth factor receptor type 2 (HER-2) をターゲットとした trastuzumab¹⁴⁵⁾ のように臨床応用されている医薬品も既に存在している。また、2017 年 9 月には、筑波大学と国立研究開発法人産業技術総合研究所の共同研究により、難治がんの一つである膵がんにも高発現している糖鎖およびそれを特異的に認識するレクチンの発見、その特異的レクチンと抗がん剤の融合体 (Lectin Drug Conjugate; LDC) の有効性がマウス膵がんモデルを用いた実験系で報告されている。¹⁴⁶⁾ この報告でも述べられているように、レクチンを用いた医薬品は微生物を用いて生産することが可能であり (大腸菌発現系など)、動物細胞を利用する抗体医薬と比較すると圧倒的安価であるというメリットを有する。そのため、近年のレクチン工学の急速な発展に後押しされ、レクチンはがんを始めとする様々な疾患の治療・診断ツールとなりうると考えられている。

さらに著者が扱うレクチンは、すでに述べたように RNase としての活性も有する多機能性タンパク質である。cSBL と同様に RNase A superfamily に属し、抗腫瘍活性を持つ RNase としてヒョウガエル (*Rana pipiens*) 卵より単離された onconase (または ranpirnase) と呼ばれる RNase があり、様々な知見が得られている。¹⁴⁷⁾ Onconase の機能については未だ不明な部分も存在するが、その抗腫瘍活性は RNA 分解を介して引き起こされていることが報告されている。^{147,148)} すなわち、がん細胞内に取り込まれたのち、主に tRNA を分解する

ことでタンパク合成阻害や G1 期における細胞周期停止を引き起こし、がん細胞に対してアポトーシスを誘導する。¹⁴⁹⁻¹⁵²⁾ さらに NF- κ B 転写因子をコードする mRNA の直接分解あるいはそのターンオーバーに関連する mRNA の分解^{151,153)} や、遺伝子発現調節に関わっている ncRNA の分解¹⁵⁴⁻¹⁵⁶⁾ を行うという報告もある。このように RNase 活性により引き起こされる抗腫瘍活性から新規経路を有する抗がん剤として期待されていた onconase だが、米国で行われた臨床試験において既存薬との有意差が見出されなかったこと、¹⁵⁷⁾ 開発企業の権利譲渡などの影響で、未だ治療薬としては使用されていないのが現状である。

また、がんと RNA (特に miRNA) の関係についても近年報告が増加してきている。がん遺伝子やがん抑制遺伝子など、ゲノムレベルでの異常や機能異常が、細胞のがん化やがんの進展に関与することはこれまでも広く知られていることではあるが、同様の考え方が miRNA へ応用可能だということが分かっている。すなわち、がん抑制性 miRNA の発現減少や、がん促進性 miRNA の発現増加により、標的因子の発現制御が起こり、がんの発生・進展が引き起こされることが慢性リンパ性白血病患者のゲノム解析により明らかとなっている。^{158,159)} また、反対に p53 や Myc などに代表的されるがん関連因子により miRNA の発現調節が行われていることも分かっており、¹⁶⁰⁾ これまで知られているがん遺伝子と miRNA との間に密接な関係があることが示唆されている。さらに、細胞増殖能の維持、耐性の獲得に関与する miR-15, miR-16 や浸潤・転移などに関わる miR-200 など、機能が明らかとなっている miRNA も多く存在し、miRNA もまた、バイオマーカーや治療標的として今後の進展が期待されている分子である。

本研究で用いた cSBL は、細胞膜表面のシアル酸を含む複合糖質を認識するレクチンであり、がん細胞の RNA を分解することで細胞を死に至らしめる抗腫瘍性の多機能タンパク質である。そのため、現在がん薬物治療の分野で注目されつつある前述の糖鎖および miRNA の両方を標的として作用することができる物質である。一方、miRNA を含めた RNA 干渉を治療応用するには、ド

ラッグデリバリーの面で問題点があり、未だ解決すべき問題が多いといわれている。しかし、こちらも未だ詳細なメカニズムは不明ではあるが、独自の細胞内移行機構をもち、それ自身が RNA を標的として作用する cSBL であれば、ドラッグデリバリーの問題点もすでに一部解決しており、RNA 分解を介してがんの増殖や耐性化、転移など様々な問題に立ち向かうことができると考えられる。これまでの研究より、cSBL は正常細胞よりがん細胞に優先的に結合することが明らかになっており、³²⁾ 細胞内に取り込まれることで RNase 活性に起因した細胞毒性を示すと考えられている。³⁹⁾ また、cSBL 耐性を獲得させたマウス P-388 細胞株を用いた研究では、細胞表面への cSBL の結合は観察されたが、cSBL の細胞内への取り込みが減少し、細胞毒性は認められなかった。⁵⁷⁾ そのため、正常細胞では cSBL の取り込み機構の欠如により毒性を示さない可能性などが考えられている。しかし、cSBL の抗腫瘍効果や腫瘍選択性が、細胞のがん化に伴う糖鎖末端のシアル酸の質的および量的変化と関連するか否か、また通常細胞外に存在する miRNA はエクソソームと呼ばれる小胞に内包され存在するが (exosomal miRNA)、これら exosomal miRNA に対して cSBL が作用できるか否か、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となると考えられる。

本研究により、悪性中皮腫および pemetrexed 耐性株に対する cSBL と既存薬剤との相乗的抗腫瘍効果が示唆された。今後 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、また 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。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり，終始御懇篤なるご指導，ご鞭撻を賜りました恩師，細野 雅祐 教授に衷心より感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり，御校閲，御助言を賜りました，細胞制御学教室 顧建国 教授ならびに薬物治療学教室 原 明義 教授に深く感謝申し上げます。

有益なる御助言，多大なる御協力を頂きました分子認識学教室 前教授 仁田一雄 先生，立田 岳生 助教に深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり，pemetrexed 耐性悪性中皮腫細胞株を譲渡してくださいました千葉大学大学院医学研究院 先端化学療法学 滝口 裕一 教授に心より感謝申し上げます。

また，有益な御教示ならびに御教授を頂きました分子認識学教室 菅原 栄紀 講師，高橋 耕太 博士 (現 ヘルシンキ大学医学部解剖学部門)，山本 晃司 先生 (現 埼玉医科大学保健医療学部臨床検査学科 助教)，石川 幼尋 氏ならびに薬物治療学教室 菅野 秀一 准教授，蓬田 伸 准教授，冨澤 亜也子 助手に感謝するとともに，本研究に御協力いただきました分子認識学教室諸氏に厚く感謝いたします。

本研究において，終始御激励ならびに御支援を賜りました理事長・学長 高柳 元明 博士に深く感謝の意を表します。

最後に，本研究を行うにあたり終始支えてくださいました家族，友人をはじめとする皆様に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 緒方 知三郎, 三田村 篤志郎, 緒方 富雄., “病理学総論 (中の巻),” 南山堂, 東京, 1931
- 2) Combellack E.J., Jessop Z.M., Naderi N., Griffin M., Dobbs T., Ibrahim A., Evans S., Burnell S., Doak S.H., Whitaker I.S., *Gland Surg.* **5**, 227–241 (2016)
- 3) Ades F., Tryfonidis K., Zardavas D., *Ecancermedicalscience* **11**, 746 (2017)
- 4) Shih Y.-N., Chiu C.-H., Tsai C.-M., Perng R.-P., *J. Chin. Med. Assoc.* **68**, 183–186 (2005)
- 5) Takahashi R., Prieto-Vila M., Hironaka A., Ochiya T., *Clin. Chem. Lab. Med.* **55**, 648–656 (2017)
- 6) Aravind L., Koonin E. V., *Methods Enzymol.* **341**, 3–28 (2001)
- 7) Deshpande R.A., Shankar V., *Crit. Rev. Microbiol.* **28**, 79–122 (2002)
- 8) Fang E.F., Ng T.B., *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1815**, 65–74 (2011)
- 9) Fang E.F., Zhang C.Z.Y., Fong W.P., Ng T.B., *Apoptosis* **17**, 377–387 (2012)
- 10) D’Alessio G., “The Superfamily of Vertebrate-Secreted Ribonucleases,” ed. by Nicholson, A. W., Ed., *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011, pp. 1-34
- 11) Titani K., Takio K., Kuwada M., Nitta K., Sakakibara F., Kawauchi H., Takayanagi G., Hakomori S., *Biochemistry* **26**, 2189–2194 (1987)
- 12) Kamiya Y., Oyama F., Oyama R., Sakakibara F., Nitta K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Titani K., *J Biochem* **108**, 139–143 (1990)
- 13) Nitta K., Oyama F., Oyama R., Sekiguchi K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Hakomori S., Titani K., *Glycobiology* **3**, 37–45 (1993)

- 14) Tsao A.S., Wistuba I., Roth J.A., Kindler H.L., *J. Clin. Oncol.* **27**, 2081–2090 (2009)
- 15) Robinson B.W.S., Lake R.A., *N. Engl. J. Med.* **353**, 1591–1603 (2005)
- 16) Ruffie P., Feld R., Minkin S., Cormier Y., Boutan-Laroze A., Ginsberg R., Ayoub J., Shepherd F.A., Evans W.K., Figueredo A., *J. Clin. Oncol.* **7**, 1157–1168 (1989)
- 17) Chailleux E., Dabouis G., Pioche D., Lajartre M. de, Lajartre A.-Y. de, Rembeaux A., Germaud P., *Chest* **93**, 159–162 (1988)
- 18) Adams V.I., Unni K.K., Muhm J.R., Jett J.R., Ilstrup D.M., Bernatz P.E., *Cancer* **58**, 1540–1551 (1986)
- 19) OWEN W.G., *Br. Med. J.* **2**, 214–218 (1964)
- 20) Matsuzaki H., Lee S., Maeda M., Kumagai-Takei N., Nishimura Y., Otsuki T., *J. Immunotoxicol.* **13**, 620–627 (2016)
- 21) Mensi C., De Matteis S., Dallari B., Riboldi L., Bertazzi P.A., Consonni D., *Occup. Environ. Med.* **73**, 607–613 (2016)
- 22) Albin M., Magnani C., Krstev S., Rapiti E., Shefer I., *Environ. Health Perspect.* **107 Suppl**, 289–298 (1999)
- 23) Lanphear B.P., Buncher C.R., *J. Occup. Med.* **34**, 718–721 (1992)
- 24) Selikoff I.J., Hammond E.C., Seidman H., *Cancer* **46**, 2736–2740 (1980)
- 25) Niklinski J., Niklinska W., Chyczewska E., Laudanski J., Naumnik W., Chyczewski L., Pluygers E., *Lung Cancer* **45 Suppl 1**, S7–S15 (2004)
- 26) Vogelzang N.J., Rusthoven J.J., Symanowski J., Denham C., Kaukel E., Ruffie P., Gatzemeier U., Boyer M., Emri S., Manegold C., Niyikiza C., Paoletti P., *J. Clin. Oncol.* **21**, 2636–2644 (2003)

- 27) Krug L.M., *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **19**, 1117–1136 (2005)
- 28) Leon L.G., Gemelli M., Sciarrillo R., Avan A., Funel N., Giovannetti E., *Curr. Drug Targets* **15**, 1331–1340 (2014)
- 29) Hazarika M., White R.M., Booth B.P., Wang Y.-C., Ham D.Y.L., Liang C.Y., Rahman A., Gobburu J.V.S., Li N., Sridhara R., Morse D.E., Lostritto R., Garvey P., Johnson J.R., Pazdur R., *Clin. Cancer Res.* **11**, 982–992 (2005)
- 30) Kitazono-Saitoh M., Takiguchi Y., Kitazono S., Ashinuma H., Kitamura A., Tada Y., Kurosu K., Sakaida E., Sekine I., Tanabe N., Tagawa M., Tatsumi K., *Oncol. Rep.* **28**, 33–40 (2012)
- 31) Nitta K., Takayanagi G., Kawauchi H., Hakomori S., *Cancer Res.* **47**, 4877–4883 (1987)
- 32) 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)
- 33) Tatsuta T., Hosono M., Miura Y., Sugawara S., Kariya Y., Hakomori S., Nitta K., *Int. J. Oncol.* **43**, 1799–1808 (2013)
- 34) Tatsuta T., Hosono M., Sugawara S., Kariya Y., Ogawa Y., Hakomori S., Nitta K., *Int. J. Oncol.* **43**, 1402–1412 (2013)
- 35) 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 R.A., Kawsar S.M.A., Ozeki Y., *Glycoconj. J.* **31**, 171–184 (2014)
- 36) Tang C.-H.A., Hu C.-C.A., Wei C.-W., Wang J.-J., *FEBS Lett.* **579**, 265–270 (2005)
- 37) Tseng H.-H., Yu Y.-L., Chen Y.-L.S., 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)
- 38) Hu C.C., Tang C.H., Wang J.J., *FEBS Lett.* **503**, 65–68 (2001)
 - 39) Kariya Y., Tatsuta T., Sugawara S., Kariya Y., Nitta K., Hosono M., *Int. J. Oncol.* **49**, 1334–1342 (2016)
 - 40) Tatsuta T., Hosono M., Takahashi K., Omoto T., Kariya Y., Sugawara S., Hakomori S., Nitta K., *Int. J. Oncol.* **44**, 377–384 (2014)
 - 41) Liao Y.D., Huang H.C., Chan H.J., Kuo S.J., *Protein Expr. Purif.* **7**, 194–202 (1996)
 - 42) Hu C.C., Lee Y.H., Tang C.H., Cheng J.T., Wang J.J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1229–1236 (2001)
 - 43) Lee Y.-H., Wei C.-W., Wang J.-J., Chiou C.-T., *Antiviral Res.* **89**, 193–198 (2011)
 - 44) Vert A., Castro J., Ribó M., Benito A., Vilanova M., *Oncotarget* **7**, 18309–18324 (2016)
 - 45) Chou T.-C., *Cancer Res.* **70**, 440–446 (2010)
 - 46) Qu K., Lin T., Wei J., Meng F., Wang Z., Huang Z., Wan Y., Song S., Liu S., Chang H., Dong Y., Liu C., *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **33**, 1253–1259 (2013)
 - 47) Chen K.-C., Yang T.-Y., Wu C.-C., Cheng C.-C., Hsu S.-L., Hung H.-W., Chen J.-W., Chang G.-C., *PLoS One* **9**, e97888 (2014)
 - 48) Wu D., Zhang P., Xu G., Tong A., Zhou C., Lang J., Wang C., *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **16**, 1507–1513 (2015)
 - 49) Buqué A., Muhialdin J.S., Muñoz A., Calvo B., Carrera S., Aresti U., Sancho A., Rubio I., López-Vivanco G., *Mol. Cancer* **11**, 25 (2012)

- 50) Jia Y., Sun H., Wu H., Zhang H., Zhang X., Xiao D., Ma X., Wang Y., *PLoS One* **11**, e0149120 (2016)
- 51) Vandermeers F., Hubert P., Delvenne P., Mascaux C., Grigoriu B., Burny A., Scherpereel A., Willems L., *Clin. Cancer Res.* **15**, 2818–2828 (2009)
- 52) Indovina P., Marcelli E., Di Marzo D., Casini N., Forte I.M., Giorgi F., Alfano L., Pentimalli F., Giordano A., *Cancer Biol. Ther.* **15**, 380–388 (2014)
- 53) Kataoka Y., Yamamoto Y., Otsuki T., Shinomiya M., Terada T., Fukuma S., Yamazaki S., Hirabayashi M., Nakano T., Fukuhara S., *Jpn. J. Clin. Oncol.* **45**, 562–568 (2015)
- 54) Ortolan E., Giacomino A., Martinetto F., Morone S., Lo Buono N., Ferrero E., Scagliotti G., Novello S., Orecchia S., Ruffini E., Rapa I., Righi L., Volante M., Funaro A., *Oncotarget* **5**, 6191–6205 (2014)
- 55) Tatsuta T., Sugawara S., Takahashi K., Ogawa Y., Hosono M., Nitta K., *Biomed Res. Int.* **2014**, 421415 (2014)
- 56) Tatsuta T., Sugawara S., Takahashi K., Ogawa Y., Hosono M., Nitta K., *Front. Oncol.* **4**, 139 (2014)
- 57) Nitta K., Ozaki K., Tsukamoto Y., Furusawa S., Ohkubo Y., Takimoto H., Murata R., Hosono M., Hikichi N., Sasaki K., *Cancer Res.* **54**, 928–934 (1994)
- 58) Chang B.D., Broude E. V., Dokmanovic M., Zhu H., Ruth A., Xuan Y., Kandel E.S., Lausch E., Christov K., Roninson I.B., *Cancer Res.* **59**, 3761–3767 (1999)
- 59) Ding H., Han C., Guo D., Wang D., Chen C.-S., D'Ambrosio S.M., *Int. J. cancer* **123**, 2923–2930 (2008)
- 60) Adachi S., Ito H., Tamamori-Adachi M., Ono Y., Nozato T., Abe S., Ikeda Ma, Marumo F., Hiroe M., *Circ. Res.* **88**, 408–414 (2001)

- 61) Zhan Z., He K., Zhu D., Jiang D., Huang Y.-H., Li Y., Sun C., Jin Y.-H., *PLoS One* **7**, e44923 (2012)
- 62) Pestell R.G., Albanese C., Reutens a T., Segall J.E., Lee R.J., Arnold A., *Endocr. Rev.* **20**, 501–534 (1999)
- 63) Cheng M., Olivier P., Diehl J.A., Fero M., Roussel M.F., Roberts J.M., Sherr C.J., *EMBO J.* **18**, 1571–1583 (1999)
- 64) Flores-Rozas H., Kelman Z., Dean F.B., Pan Z.Q., Harper J.W., Elledge S.J., O'Donnell M., Hurwitz J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8655–8659 (1994)
- 65) Niculescu A.B., Chen X., Smeets M., Hengst L., Prives C., Reed S.I., *Mol. Cell. Biol.* **18**, 629–643 (1998)
- 66) Ogryzko V. V, Wong P., Howard B.H., *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4877–4882 (1997)
- 67) Radhakrishnan S.K., Feliciano C.S., Najmabadi F., Haegebarth A., Kandel E.S., Tyner A.L., Gartel A.L., *Oncogene* **23**, 4173–4176 (2004)
- 68) Ramirez J.M., Ocio E.M., San Miguel J.F., Pandiella A., *Leukemia* **21**, 797–804 (2007)
- 69) Baldi A., Piccolo M.T., Boccellino M.R., Donizetti A., Cardillo I., La Porta R., Quagliuolo L., Spugnini E.P., Cordero F., Citro G., Menegozzo M., Calogero R.A., Crispi S., *PLoS One* **6**, e23569 (2011)
- 70) Lazzarini R., Moretti S., Orecchia S., Betta P.-G., Procopio A., Catalano A., *Clin. Cancer Res.* **14**, 5099–5107 (2008)
- 71) Inoue H., Hwang S.H., Wecksler A.T., Hammock B.D., Weiss R.H., *Cancer Biol. Ther.* **12**, 827–836 (2011)
- 72) Robinson B.M., *Ann. Cardiothorac. Surg.* **1**, 491–496 (2012)
- 73) Musk A.W., Olsen N., Alfonso H., Reid A., Mina R., Franklin P., Sleith J.,

- Hammond N., Threlfall T., Shilkin K.B., de Klerk N.H., *Eur. Respir. J.* **38**, 1420–1424 (2011)
- 74) Brims F.J.H., Meniawy T.M., Duffus I., de Fonseca D., Segal A., Creaney J., Maskell N., Lake R.A., de Klerk N., Nowak A.K., *J. Thorac. Oncol.* **11**, 573–582 (2016)
- 75) Billé A., Krug L.M., Woo K.M., Rusch V.W., Zauderer M.G., *J. Thorac. Oncol.* **11**, 249–255 (2016)
- 76) Muruganandan S., Alfonso H., Franklin P., Shilkin K., Segal A., Olsen N., Reid A., de Klerk N., Musk A. (Bill), Brims F., *Br. J. Cancer* **116**, 703–708 (2017)
- 77) Campbell N., Kindler H., *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **32**, 102–110 (2011)
- 78) Davidson B., *Hum. Pathol.* **46**, 789–804 (2015)
- 79) Nelson D.B., Rice D.C., Niu J., Atay S., Vaporciyan A.A., Antonoff M., Hofstetter W.L., Walsh G.L., Swisher S.G., Roth J.A., Tsao A., Gomez D., Giordano S.H., Mehran R., Sepesi B., *J. Clin. Oncol.* **35**, 3354–3362 (2017)
- 80) de Perrot M., Feld R., Cho B.C.J., Bezjak A., Anraku M., Burkes R., Roberts H., Tsao M.S., Leigh N., Keshavjee S., Johnston M.R., *J. Clin. Oncol.* **27**, 1413–1418 (2009)
- 81) Krug L.M., Pass H.I., Rusch V.W., Kindler H.L., Sugarbaker D.J., Rosenzweig K.E., Flores R., Friedberg J.S., Pisters K., Monberg M., Obasaju C.K., Vogelzang N.J., *J. Clin. Oncol.* **27**, 3007–3013 (2009)
- 82) Bölükbas S., Manegold C., Eberlein M., Bergmann T., Fisseler-Eckhoff A., Schirren J., *Lung Cancer* **71**, 75–81 (2011)
- 83) Weder W., Stahel R.A., Bernhard J., Bodis S., Vogt P., Ballabeni P., Lardinois D., Betticher D., Schmid R., Stupp R., Ris H.B., Jermann M., Mingrone W., Roth

- A.D., Spiliopoulos A., Swiss Group for Clinical Cancer Research., *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **18**, 1196–1202 (2007)
- 84) Friedberg J.S., Simone C.B., Culligan M.J., Barsky A.R., Doucette A., McNulty S., Hahn S.M., Alley E., Sterman D.H., Glatstein E., Cengel K.A., *Ann. Thorac. Surg.* **103**, 912–919 (2017)
- 85) Pryme I.F., Bardocz S., Pusztai A., Ewen S.W.B., *Histol. Histopathol.* **21**, 285–299 (2006)
- 86) Ochoa-Alvarez J.A., Krishnan H., Shen Y., Acharya N.K., Han M., McNulty D.E., Hasegawa H., Hyodo T., Senga T., Geng J.G., Kosciuk M., Shin S.S., Goydos J.S., Temiakov D., Nagele R.G., Goldberg G.S., *PLoS One* **7** (2012)
- 87) Liu B., Zhang B., Min M. wei, Bian H. jiao, Chen L. fei, Liu Q., Bao J. ku., *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1790**, 840–844 (2009)
- 88) Yang X., Wu L., Duan X., Cui L., Luo J., Li G., *Mar. Drugs* **12**, 3994–4004 (2014)
- 89) Liao Y. di., *Nucleic Acids Res.* **20**, 1371–1377 (1992)
- 90) Irie M., Nitta K., Nonaka T., *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 775–784 (1998)
- 91) Kawabata S., Chiang C.-T., Tsurutani J., Shiga H., Arwood M.L., Komiya T., Gills J.J., Memmott R.M., Dennis P.A., *Oncotarget* **5**, 1062–1070 (2014)
- 92) Tonkinson J.L., Worzalla J.F., Teng C.H., Mendelsohn L.G., *Cancer Res.* **59**, 3671–3676 (1999)
- 93) Satoh T., Tatsuta T., Sugawara S., Hara A., Hosono M., *Oncotarget* **8**, 42466–42477 (2017)
- 94) Mokhtari R.B., Homayouni T.S., Baluch N., Morgatskaya E., Kumar S., Das B., Yeger H., Mokhtari R.B., Homayouni T.S., Baluch N., Morgatskaya E., Kumar

- S., Das B., Yeger H., *Oncotarget* **8**, 38022–38043 (2015)
- 95) Røe O.D., Szulkin A., Anderssen E., Flatberg A., Sandeck H., Amundsen T., Erlandsen S.E., Dobra K., Sundstrøm S.H., *PLoS One* **7**, e40521 (2012)
- 96) Castagneto B., Botta M., Aitini E., Spigno F., Degiovanni D., Alabiso O., Serra M., Muzio A., Carbone R., Buosi R., Galbusera V., Piccolini E., Giaretto L., Rebella L., Mencoboni M., *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **19**, 370–373 (2008)
- 97) Jänne P.A., Simon G.R., Langer C.J., Taub R.N., Dowlati A., Fidias P., Monberg M., Obasaju C., Kindler H., *J. Clin. Oncol.* **26**, 1465–1471 (2008)
- 98) Levin P.A., Dowell J.E., *Onco. Targets. Ther.* **10**, 2057–2066 (2017)
- 99) Goudar R.K., *Curr. Oncol. Rep.* **7**, 260–265 (2005)
- 100) Ozasa H., Oguri T., Uemura T., Miyazaki M., Maeno K., Sato S., Ueda R., *Cancer Sci.* **101**, 161–166 (2010)
- 101) Obata T., Tanaka M., Suzuki Y., Sasaki T., *J. Cancer Ther.* **4**, 1052–1059 (2013)
- 102) Uemura T., Oguri T., Ozasa H., Takakuwa O., Miyazaki M., Maeno K., Sato S., Ueda R., *Cancer Sci.* **101**, 2404–2410 (2010)
- 103) Hooijberg J.H., De Vries N.A., Kaspers G.J.L., Pieters R., Jansen G., Peters G.J., *Cancer Chemother. Pharmacol.* **58**, 1–12 (2006)
- 104) Tompa P., Emori Y., Sorimachi H., Suzuki K., Friedrich P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1333–1339 (2001)
- 105) Monica V., Lo Iacono M., Bracco E., Busso S., Di Blasio L., Primo L., Peracino B., Papotti M., Scagliotti G., *Oncotarget* **7**, 76577–76589 (2016)
- 106) Giovannetti E., Zucali P.A., Assaraf Y.G., Leon L.G., Smid K., Alecci C., Giancola F., Destro A., Gianoncelli L., Lorenzi E., Roncalli M., Santoro A.,

- Peters G.J., *Br. J. Cancer* **105**, 1542–1553 (2011)
- 107) Bonelli M.A., Fumarola C., La Monica S., Alfieri R., *Biochem. Pharmacol.* **123**, 8–18 (2017)
- 108) Zalcman G., Mazieres J., Margery J., Greillier L., Audigier-Valette C., Moro-Sibilot D., Molinier O., Corre R., Monnet I., Gounant V., Rivière F., Janicot H., Gervais R., Locher C., Milleron B., Tran Q., Lebitasy M.-P., Morin F., Creveuil C., Parienti J.-J., Scherpereel A., *Lancet* **387**, 1405–1414 (2016)
- 109) Scherpereel A., Mazieres J., Greillier L., Dô P., Bylicki O., Monnet I., Corre R., Audigier-Valette C., Locatelli-Sanchez M., Molinier O., Thiberville L., Urban T., Ligeza-poisson C., Planchard D., Amour E., Morin F., Moro-Sibilot D., Zalcman G., *J. Clin. Oncol.* **35**, LBA8507-LBA8507 (2017)
- 110) Sutter A.P., Höpfner M., Huether A., Maaser K., Scherübl H., *Int. J. cancer* **118**, 1814–1822 (2006)
- 111) Yang T.-Y., Chang G.-C., Chen K.-C., Hung H.-W., Hsu K.-H., Sheu G.-T., Hsu S.-L., *Eur. J. Pharmacol.* **663**, 17–26 (2011)
- 112) Dasari S., Bernard Tchounwou P., *Eur. J. Pharmacol.* **740**, 364–378 (2014)
- 113) Zanella C.L., Posada J., Tritton T.R., Mossman B.T., *Cancer Res.* **56**, 5334–5338 (1996)
- 114) Pache J.C., Janssen Y.M., Walsh E.S., Quinlan T.R., Zanella C.L., Low R.B., Taatjes D.J., Mossman B.T., *Am. J. Pathol.* **152**, 333–340 (1998)
- 115) National Library of Medicine., “Erlotinib Hydrochloride in Treating Patients With Malignant Peritoneal Mesothelioma” :<<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01592383>> (アクセス日 2017年 11 月 20 日)

- 116) National Library of Medicine., “Study of Cetuximab Combined With Cisplatin or Carboplatin/Pemetrexed as First Line Treatment in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma. (MesoMab)” :<<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00996567>> (アクセス日 2017年 11 月 20 日)
- 117) Barbieri F., Würth R., Favoni R.E., Pattarozzi A., Gatti M., Ratto A., Ferrari A., Bajetto A., Florio T., *Biochem. Pharmacol.* **82**, 1467–1477 (2011)
- 118) de Miguel D., Lemke J., Anel A., Walczak H., Martinez-Lostao L., *Cell Death Differ.* **23**, 733–747 (2016)
- 119) Urso L., Cavallari I., Silic-Benussi M., Biasini L., Zago G., Calabrese F., Conte P.F., Ciminale V., Pasello G., *Oncotarget* **8**, 44232–44241 (2017)
- 120) Yuan B.-Z., Chapman J., Ding M., Wang J., Jiang B., Rojanasakul Y., Reynolds S.H., *BMC Cancer* **13**, 140 (2013)
- 121) Pasello G., Urso L., Silic-Benussi M., Schiavon M., Cavallari I., Marulli G., Nannini N., Rea F., Ciminale V., Favaretto A., *J. Thorac. Oncol.* **9**, 1008–1017 (2014)
- 122) Cortese J.F., Gowda A.L., Wali A., Eliason J.F., Pass H.I., Everson R.B., *Int. J. cancer* **118**, 521–522 (2006)
- 123) Lippman S.M., Gibson N., Subbaramaiah K., Dannenberg A.J., *Clin. Cancer Res.* **11**, 6097–6099 (2005)
- 124) Bronte G., Incorvaia L., Rizzo S., Passiglia F., Galvano A., Rizzo F., Rolfo C., Fanale D., Listì A., Natoli C., Bazan V., Russo A., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **107**, 20–32 (2016)
- 125) Noguchi K., *Yakugaku Zasshi* **137**, 151–160 (2017)

- 126) Jin Z., El-Deiry W.S., *Cancer Biol. Ther.* **4**, 139–163 (2005)
- 127) Trivedi R., Mishra D.P., *Front. Oncol.* **5**, 69 (2015)
- 128) National Library of Medicine., “Window of Opportunity Study of VS-6063 (Defactinib) in Participants With Surgical Resectable Malignant Pleural Mesothelioma.” :<<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02004028>> (アクセス日 2017年 11 月 20 日)
- 129) National Library of Medicine., “Study of the Safety and Efficacy of Amatumimab in Combination With Pemetrexed and Cisplatin in Subjects With Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma (MPM) (ARTEMIS)” :<<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02357147>> (アクセス日 2017年 11 月 20 日)
- 130) Frenel J.-S., Le Tourneau C., O’Neil B., Ott P.A., Piha-Paul S.A., Gomez-Roca C., van Brummelen E.M.J., Rugo H.S., Thomas S., Saraf S., Rangwala R., Varga A., *J. Clin. Oncol.* JCO2017745471 (2017)
- 131) Jalanko H., Kuusela P., Roberts P., Sipponen P., Haglund C. a, Mäkelä O., *J. Clin. Pathol.* **37**, 218–222 (1984)
- 132) Kadota J., *Tohoku J. Exp. Med.* **161**, 171–183 (1990)
- 133) Kawai K., Kojima T., Miyanaga N., Hattori K., Hinotsu S., Shimazui T., Akaza H., *Int. J. Urol.* **12**, 284–289 (2005)
- 134) Samtleben R., Hajto T., Hostanska K., Wagner H., “Mistletoe lectins as immunostimulants (chemistry, pharmacology and clinic),” ed. by Wagner, H., Ed., Birkhäuser Basel, Basel, 1999, pp. 223-241
- 135) Büssing A., Suzart K., Bergmann J., Pfüller U., Schietzel M., Schweizer K., *Cancer Lett.* **99**, 59–72 (1996)

- 136) Mengs U., Göthel D., Leng-Peschlow E., *Anticancer Res.* **22**, 1399–1407 (2002)
- 137) Beuth J., Stoffel B., Ko H.L., Jeljaszewicz J., Pulverer G., *Arzneimittelforschung.* **45**, 1240–1242 (1995)
- 138) Janssen O., Scheffler A., Kabelitz D., *Arzneimittelforschung.* **43**, 1221–1227 (1993)
- 139) Kaegi E., *CMAJ* **158**, 1157–1159 (1998)
- 140) Hutt N., Kopferschmitt-Kubler M.C., Cabalion J., Purohit A., Alt M., Pauli G., *Allergol. Immunopathol. (Madr).* **29**, 201–203 (2001)
- 141) Stauder H., Kreuser E.D., *Onkologie* **25**, 374–380 (2002)
- 142) Kienle G.S., Grugel R., Kiene H., *BMC Complement. Altern. Med.* **11**, 72 (2011)
- 143) Ernst E., Schmidt K., Steuer-Vogt M.K., *Int. J. Cancer* **107**, 262–267 (2003)
- 144) Service R.F., *Science* **291**, 2340–2341 (2001)
- 145) Baselga J., Albanell J., *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **12 Suppl 1**, S35-41 (2001)
- 146) Shimomura O., Oda T., Tateno H., Ozawa Y., Kimura S., Sakashita S., Noguchi M., Hirabayashi J., Asashima M., Ohkohchi N., *Mol. Cancer Ther.* molcanther.0232.2017 (2017)
- 147) Ardelt W., Mikulski S.M., Shogen K., *J. Biol. Chem.* **266**, 245–251 (1991)
- 148) Wu Y., Mikulski S.M., Ardelt W., Rybak S.M., Youle R.J., *J. Biol. Chem.* **268**, 10686–10693 (1993)
- 149) Smith M.R., Newton D.L., Mikulski S.M., Rybak S.M., *Exp. Cell Res.* **247**, 220–232 (1999)
- 150) 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)

- 151) Tsai S.Y., Ardelt B., Hsieh T.-C., Darzynkiewicz Z., Shogen K., Wu J.M., *Int. J. Oncol.* **25**, 1745–1752 (2004)
- 152) Suhasini A.N., Sirdeshmukh R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363**, 304–309 (2007)
- 153) Deptala A., Halicka H.D., Ardelt B., Ardelt W., Mikulski S.M., Shogen K., Darzynkiewicz Z., *Int. J. Oncol.* **13**, 11–16 (1998)
- 154) Ardelt B., Ardelt W., Darzynkiewicz Z., *Cell Cycle* **2**, 22–24 (2003)
- 155) Zhao H., Ardelt B., Ardelt W., Shogen K., Darzynkiewicz Z., *Cell Cycle* **7**, 3258–3261 (2008)
- 156) Saxena A., Saxena S.K., Shogen K., *Anticancer Res.* **29**, 1067–1072 (2009)
- 157) Costanzi J., Sidransky D., Navon A., Goldsweig H., *Cancer Invest.* **23**, 643–650 (2005)
- 158) Calin G.A., Croce C.M., *Nat. Rev. Cancer* **6**, 857–866 (2006)
- 159) Croce C.M., *Nat. Rev. Genet.* **10**, 704–714 (2009)
- 160) Lujambio A., Lowe S.W., *Nature* **482**, 347–355 (2012)

論文目録

本論文の第一章から第三章の内容は、それぞれ以下の雑誌に公表した。

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