

サイトカインによる新規抗有糸分裂剤AM-132の抗腫瘍活性増強に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16451

氏名	巽 康 彰
生年月日	
本籍	三重県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第472号
学位授与の日付	平成14年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	サイトカインによる新規抗有糸分裂剤AM-132抗腫瘍活性増強に関する研究
論文審査委員(主査)	正宗 行人(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一(医附属病院・教授) 田中 基裕(がん研究所・助教授) 横川 弘一(医附属病院・助教授) 清水 栄(自然科学研究科・助教授)

学 位 論 文 要 旨

Abstract

TK5048 and its derivatives, AM-132, AM-138, and AM-97 are recently developed antimetabolic (AM) compounds. A murine leukemia cell line resistant to a sulfonamide antimetabolic agent, E7010 which binds to colchicine-binding sites on tubulin, was cross-resistant to the *in vitro* growth-inhibitory effect of AM compounds. TK5048 induced cell cycle arrest at the G2/M phase of the cell cycle. TK5048 inhibited tubulin polymerization in human lung cancer PC-14 cells in a concentration-dependent manner. In a polymerization assay using bovine brain tubulin, AM-132 and AM-138 were quite strong, AM-97 was moderately strong, and TK5048 was a relatively weak inhibitor of tubulin polymerization. Inhibition of tubulin polymerization is therefore one of the mechanisms of action of these AM compounds against tumor cells. To profile the antitumor effect of AM compounds, the *in vivo* antitumor effect of AM-132 was evaluated against cytokine-secreting Lewis lung carcinoma (LLC). Tumor-bearing mice were treated with intravenous AM-132 using three different treatment schedules. LLC tumors expressing TNF- α or IL-6 were very sensitive to AM-132. In particular, LLC tumors expressing IL-6 were markedly reduced by AM-132 treatment, and showed colorization of the tumor surface and the unusual hemorrhagic necrosis. These results suggest that a combined effect of AM-132 and cytokines on the blood supply to tumors.

抗有糸分裂剤は、細胞質内にある細胞骨格の微小管を構成しているチューブリンに対して作用し、肺癌などの固形癌の化学療法に現在広く使われている薬剤の一種である。この微小管は、有糸分裂の際に複製された染色体を正確に 2 個の娘細胞に分配する分裂装置の主演として、きわめて重要な役割を果たしているため、従来より抗癌剤開発の標的分子として注目を集めてきた。

抗有糸分裂剤は、大きく二つのグループに分けられる。一つは、チューブリンに結合し、重合を阻害する薬剤。もう一方は、チューブリンに結合し、重合を促進し安定化させる薬剤である。前者には、ビンカ結合部位とコルヒチン結合部位に結合して作用する薬剤が含まれる。パクリタキセルやドキセタキセルなどのタキサン誘導体は、後者のグループに含まれる薬剤である。ビンカアルカロイド類とタキサン誘導体は、 β -チューブリンに特異的な結合部位を持っている。しかしながら現在のところ、コルヒチン結合部位に結合する化合物の中で臨床でより強力な抗癌剤として証明されたものは見られないようである。

本研究で用いた AM (Antimitotic) 化合物は、有糸分裂阻害作用による抗腫瘍活性を期待して協和発酵工業株式会社により開発された化合物群である。それらの詳細についてはいまだ明らかにはされていない。著者は、AM 化合物の抗腫瘍作用の基礎的検討において、マウス結腸癌細胞 colon26 担癌マウスに AM 化合物を投与すると、腫瘍が暗赤黒色に壊死して治癒するといった結果を得た。そこで、AM 化合物の抗腫瘍作用機序を明らかにすると共に、サイトカインが AM 化合物の抗腫瘍効果を増強しているのではないかとの仮説にもとずき、本研究を企画した。

1. *In vitro* における各種 AM 化合物の細胞増殖抑制作用機序の検討

各種 AM 化合物の *in vitro* 細胞増殖抑制作用、細胞周期、チューブリンにおよぼす影響の検討を行った。まず、AM 化合物の各種抗癌剤耐性細胞に対する作用を検討した。パクリタキセル、ビンデシンに耐性を有する H69/Tx1 細胞と H69/VDS 細胞は、AM 化合物に対して交叉耐性を示さなかった。これら細胞の耐性メカニズムは、排出ポンプ活性の亢進もしくは抗癌剤の細胞内蓄積量の減少を介さず、チューブリンの構造変化が薬剤耐性の要因のひとつと考えられている。パクリタキセルやビンデシンはチューブリンのコルヒチン結合部位とは異なる部位に作用して、それぞれチューブリンの重合促進や重合阻害作用を示すことが知られていることから、AM 化合物はチューブリン上でこれらとは異なる部位に作用することが示唆された。一方、E7010 に耐性を示す P388/4.0r-M 細胞は、これら AM 化合物に対して交叉耐性を示した。以上の結果から AM 化合物に対する作用と、E7010 の作用との間に類似性が見られた。よって、AM 化合物は、E7010 と同様にチューブリンのコルヒチン結合部位に作用する可能性が高いことが示唆された。さらに、コルヒチンやパクリタキセルは P-糖蛋白質の基質として知られているため、P-糖蛋白質を過剰発現している PC-14/TXT 細胞や SBC-3/ADM100 細胞に対する AM 化合物の作用を検討したところ、これらの耐性細胞はコルヒチンに対して明らかな耐性を示したが、AM 化合物に対してはそれほど強い耐性を示さなかった。さらに AM 化合物は P-糖蛋白質の基質としては認識されないことも示唆された。このように、AM 化合物は、E7010 と構造は異なるが作用機序が類似しており、その他の抗有糸分裂剤に対する耐性細胞や P-糖蛋白質を介した抗癌剤多剤耐性細胞に対しても、抗腫瘍効果を発揮することが期待される新規な抗癌剤となり得ることが示唆された。

次いで、AM 化合物が細胞周期に及ぼす影響を検討した結果、AM 化合物は PC-14 細胞を G2/M 期で停止させ、PC-14 細胞やウシ脳チューブリンに対して強力なチューブリン重合阻害作用を示した。 β -チューブリンにはサブタイプが存在しているため、これらの化合物がどの β -チューブリンアイソタイプに親和性を有するかを検討した。そこで、AM 化合物のなかで最も強い抗腫瘍効果及びチューブリン重合阻害作用を示した AM-132 を選

び、AM-132 とコルヒチンとの競合実験を行った。その結果、AM-132 は、コルヒチン結合部位の $\beta 4$ と $\beta 5$ チューブリン、特に、 $\beta 5$ チューブリンに対して高い親和性を有することが明らかとなった。

このように、AM 化合物は、現在臨床で汎用されている抗有糸分裂剤とは異なるコルヒチン結合部位に親和性を有する新規な抗有糸分裂剤であることが明らかとなった。そこで、*in vitro* において、AM-132 の細胞増殖抑制作用にサイトカインが関与するかどうかを知るために、サイトカイン産生 LLC (マウス肺癌細胞) 細胞に対する増殖抑制作用を検討した。その結果、AM-132 は TNF- α 遺伝子を導入した LLC/TNF や非遺伝子導入細胞に対しては同等の細胞増殖抑制作用を示し、IL-6 遺伝子を導入した IL-6 産生 LLC/IL6 細胞に対しては 2 倍程度強い増殖抑制作用を示すにとどまった。即ち、これらのサイトカインは AM 化合物の細胞増殖抑制作用を直接的に修飾している可能性が低いことが示唆された。

2. *In vivo* における AM-132 の抗腫瘍作用の検討

AM 化合物の中でも比較的 *in vitro* 細胞増殖抑制作用が強く、チューブリン重合阻害作用が最も強かった AM-132 を選び、*in vivo* における抗腫瘍効果を評価するとともに、抗腫瘍効果にサイトカインが関与しているかどうか、また、関与しているとしたらどのようなサイトカインであるのか検討した。まず、colon26 細胞 (マウス結腸癌細胞)、B16F10 細胞 (マウス黒色腫細胞) あるいは LLC 細胞に対して AM-132 25 mg/kg を 5 日間尾静脈より投与し、抗腫瘍効果を検討した。AM-132 は、いずれに対しても抗腫瘍効果を示したが、特に、サイトカイン産生能が知られている colon26 担癌マウスで強い抗腫瘍効果を示した。次いで、種々のサイトカイン遺伝子を導入した LLC 細胞 (LLC, LLC/neo, LLC/IL6, LLC/TNF, LLC/IL2, LLC/GMCSF, LLC/IGIF) をマウス背部皮内に移植し、25 mg/kg の AM-132 を 5 日間静脈より投与 (スケジュール 1) して、抗腫瘍効果を検討した。LLC/IL6 細胞担癌マウスは、親株である LLC 細胞や LLC/neo 細胞担癌マウスに比べ、著しい腫瘍サイズの減少をもたらした。しかしながら、薬物処置後 6 日目で死亡した。一方、LLC/TNF 細胞担癌マウスは、親株である LLC 細胞や LLC/neo 細胞担癌マウスに比べ、強力な腫瘍サイズの減少をもたらしたが、体重減少も見られた。この結果をさらに詳しく検討するために、抗腫瘍効果の見られたサイトカイン産生腫瘍に対して以下の投与スケジュールを計画し検討を加えた。

AM-132 50 mg/kg 1 回投与 (スケジュール 2) では、LLC/IL6 細胞を移植されたマウスはすべて day 0 で死亡した。LLC/TNF 細胞担癌マウスでは体重減少を起こすことなく腫瘍を退縮させた。次いで、AM-132 12.5 mg/kg 1 日 3 回 2 日ごとに投与 (スケジュール 3) したところ、LLC/IL6 細胞担癌マウスにおいても体重減少を伴うことなく著しい腫瘍縮小が認められた。

そこで、スケジュール 3 により AM-132 を担癌マウスに投与し、6 日目の腫瘍について病理組織学的・免疫組織学的検討を行った。ヘマトキシリン・エオジン染色において、LLC/IL6 腫瘍は赤血球漏えい像が観察されたが、LLC/TNF 腫瘍では観察されなかった。また、抗 CD31 抗体による染色では、腫瘍血管内皮細胞が線状に連続的に濃染されるが、このような染色像は、サイトカイン遺伝子非導入細胞 LLC/neo 腫瘍に比べて LLC/IL6 腫瘍や LLC/TNF 腫瘍で多い傾向であり、これらのサイトカインによって腫瘍血管の新生が促進されていることが伺えた。これらに AM-132 処置を施すと、LLC/neo 腫瘍では CD31 陽性部位は若干減少するものの連続的な線状構造は保たれていた。しかし、LLC/IL6 腫瘍では、連続性に欠けた CD31 陽性部位と白血球の集団と思われる染色像が観察された。LLC/TNF 腫瘍では、壊死組織が多いためか CD31 陽性像は著しく少なかった。これらの結果は、IL-6 や TNF- α によって腫瘍血管の新生が促進されるが、AM-132 が血管内皮細胞の増殖を抑制するため血球浸潤や漏出が起り、また、腫瘍組織への栄養補給が絶たれ

るため腫瘍壊死をきたした結果、腫瘍増殖が著しく抑制されたものと考えられた。即ち、IL-6 や TNF- α は腫瘍細胞において AM-132 と協力作用を示すのではなく、これらのサイトカインによって誘導される腫瘍血管の造成を AM-132 が抑制することにより強い抗腫瘍効果がもたらされたことが示唆された。

以上、本研究において、AM 化合物は、チューブリンのコルヒチン結合部位に作用するため、他の抗有糸分裂剤に耐性な癌細胞や、P-糖蛋白質を介した抗癌剤多剤耐性細胞に対しても抗腫瘍効果を発揮することが期待される新規な抗有糸分裂剤であることを示した。これらの化合物は、特に、IL-6 および TNF- α 産生腫瘍に対して強い抗腫瘍効果を示すことも明らかとなった。これらの結果は、今後、臨床において IL-6 や TNF- α のようなサイトカインが、抗有糸分裂剤との併用が有用である可能性をも示した。

学位論文審査結果の要旨

抗有糸分裂剤には、Vinca alkaloid のようにチューブリンに結合し、重合を阻害する薬剤と Taxan alkaloid のような重合を促進し安定化させる薬剤がある。さらに、これらのアルカロイドはそれぞれチューブリンに特異的な部位に結合する。しかしながら現在のところ、コルヒチン結合部位に結合する化合物のうち、臨床で強力な抗癌剤として証明されたものは無い。

AM (Antimitotic) 化合物は、有糸分裂阻害作用による抗腫瘍活性を期待して開発された化合物群であるが、本研究は、これらの抗腫瘍作用機序を詳細に検討したものである。種々の癌細胞およびそれらの抗癌剤耐性細胞に対する AM 化合物の *in vitro* 細胞増殖抑制作用の検討を行ったところ、Taxan や Vinca alkaloids 耐性細胞、P-糖蛋白質依存性の抗癌剤耐性癌細胞に対してもそれぞれの親株細胞と同等の細胞増殖抑制作用を示した。しかし、コルヒチン結合部位に作用する抗癌性物質 E7010 耐性細胞に対する作用は弱いものであった。一方、これらの化合物はコルヒチン結合部位の $\beta 4$ と $\beta 5$ チューブリンに結合して強力なチューブリン重合阻害作用を有しており、細胞周期の G2/M 期で細胞増殖を停止させることを示唆した。さらに、*in vivo* において各種癌細胞における AM-132 の抗腫瘍効果を検討したところ、AM-132 は、サイトカイン分泌能を有する colon26 細胞や TNF- α や IL-6 産生腫瘍 (LLC/TNF, LLC/IL6) に対して強い抗腫瘍効果が得られた。病理組織学および免疫組織学的検討から、TNF- α や IL-6 によって誘導される腫瘍血管の新生を AM-132 が阻害したため、腫瘍壊死が促進されたものと考えられた。

以上より、本論文は、AM 化合物が従来の有糸分裂阻害剤とは異なる作用機序の新規な抗癌剤となり得ることを示した。さらに、IL-6 および TNF- α 産生腫瘍に対しては特に強い抗腫瘍効果を示すことも明らかとした。そしてこれらの結果は、今後の臨床において、IL-6 や TNF- α のようなサイトカインは、抗有糸分裂剤との併用が有用である可能性を示すなど、今後の癌化学療法において意義ある研究と評価される。よって、本論文は博士（薬学）論文に値するものと判定した。