

博士（薬学）荒川浩治

学位論文題名

トポイソメラーゼ阻害活性を有する化合物の抗腫瘍活性および
臓器内増殖腫瘍に対する増殖抑制作用に関する研究

学位論文内容の要旨

トポイソメラーゼ (Topo) は、抗がん剤の新たな標的として近年注目されている酵素である。著者は、Topo I 阻害活性を有するインドロカルバゾール系化合物 ED-110、NB-506 および Topo II 阻害活性を有するキノロン系化合物を見いだし、in vitro および in vivo で抗腫瘍活性について検討を行い、Topo 阻害剤の抗がん剤としての可能性について検討を行った。

さらに、著者は、癌治療のもう一つの問題である癌転移についても着目した。著者は、新たに高転移細胞株 (IMC-HM) を分離し自然転移系を樹立した。さらに、本モデル系が、臓器内増殖腫瘍に対する抗がん剤の評価に用いられることを確認し、前述の NB-506 および数種の抗がん剤について臓器内増殖腫瘍に対する増殖阻害効果について検討を行った。

1. Topo 阻害剤の抗腫瘍活性

(1) インドロカルバゾール系化合物 ED-110 の抗腫瘍活性

ED-110 は、Topo I を選択的に阻害し、その活性は camptothecin と同等かややこれを上回った。In vivo の抗腫瘍評価では、腹腔内投与の ED-110 が P388、L1210 白血病細胞移植マウスに対し、2 倍以上の延命効果を示した。マウス腫瘍 colon 26 をマウス皮下に移植し、480 mg/m² の ED-110 を投与すると、83% と有意な固型腫瘍の増殖阻害効果を示した。さらにヒト胃癌細胞株 MKN-45 を移植したヌードマウスに ED-110 を投与すると、30 mg/m² の投与で 50% 以上の有意な増殖抑制効果を示した。

以上の結果より、インドロカルバゾール系物質であり、Topo I 阻害活性を有する ED-110 は、白血病のみならずヒト癌を含めた固型腫瘍に対して、強い効果を示すことを明らかにした。

(2) キノロン系化合物の抗腫瘍活性

キノロン系化合物の L1210 マウス細胞に対する DNA-Topo 複合体 (cleavable complex) 形成促進作用と腫瘍細胞増殖阻害効果との間に強い相関関係が認められ、キノロン系化合物の Topo 阻害活性と腫瘍細胞増殖阻害効果の関連性が明らかになった。さらに、ヒト乳癌 MX-1 に対する抗腫瘍評価の結果、キノロン系化合物の cleavable complex 形成促進作用 (=Topo 阻害活性) と抗腫瘍効果が相関していることが明らかになった。

2. インドロカルバゾール系物質 NB-506 の抗腫瘍活性および安全域

Topo I を選択的に阻害する NB-506 は、細胞レベルで RNA および DNA 合成を阻害する。しかし、他のインドロカルバゾール系化合物で報告されているプロテインキナーゼ阻害活性は有せず、RNA および DNA ポリメラーゼ阻害活性を示した。

マウスに移植した固型癌に対し NB-506 は、有意な増殖阻害効果を示した。さらに NB-506 の投与により、ヌードマウス移植ヒト大腸癌、ヒト肺癌およびヒト胃癌は退縮傾向を示した。

NB-506 の至適投与スケジュールの検討を MKN-45 固型癌を用いて行った結果、連続投与が腫瘍退縮効果、再増殖開始までの抑制期間について強い効果を示すことが明らかになった。さらに、連続投与による体重減少等も認められないことから、連続投与による治療が至適と考えられた。

LD₅₀ を指標とした毒性においても NB-506 は、単回投与および 10 回連続投与でそれぞれ

990 mg/m² および 810 mg/m²/day × 10 を示し、他の抗癌剤 (etoposide、adriamycin、cisplatin、irinotecan) と比べ、蓄積毒性は低いと考えられた。

以上の結果より NB-506 は、固型腫瘍に対し強い抗腫瘍活性を示し、且つ、蓄積毒性が低い薬剤と考えられた。

3. 新規癌自然転移系（臓器内増殖腫瘍）の構築

IMC carcinoma 細胞をマウス皮下に移植してもマウスは、50 日以上生存する。著者は、この IMC 細胞の中に転移能の高い sub-population があることを見いだした。これを IMC-HM 細胞とし、詳細な検討を行った。5 × 10⁴ 個の IMC-HM 細胞を CDF₁ マウスの皮下に移植すると細胞移植後 10 日目には肝に限局した転移巣が認められた。さらに、高転移細胞移植マウスは、細胞移植後 13 ~ 18 日で全例死亡することが観察された。13 日目で死亡したマウスでは、肝、リンパ節、肺、脾、等で転移巣が確認された。

IMC-HM 細胞移植後 3 日目に移植部位の腫瘍を摘出しても、その延命日数に変化は認められなかった。以上の結果より、この細胞の転移は、移植後 3 日以内に起こり、始めに肝、それから全身の臓器へと転移すると考えられた。

この転移モデルは、自然転移であるため原発巣からの遊離、拡散、浸潤、増殖の各ステップを含めての評価が可能であると考えられる。さらに、原発巣の手術切除により臓器内増殖腫瘍（特に肝）モデルとしても有用であると考えられる。早い時期の肝への転移、その後の全身転移と臨床における癌転移と類似しており、抗転移剤あるいは臓器内増殖腫瘍に対する薬剤の評価に適したモデルと考えられる。

4. まとめ

Topo I 選択性の阻害活性を示すインドロカルバゾール系化合物 ED-110、NB-506 および Topo II 阻害活性を有するキノロン系化合物を用い、Topo 阻害活性と抗腫瘍活性あるいは臓器内増殖腫瘍に対する阻害活性の検討を行うことにより以下の知見を得た。

- (1) インドロカルバゾール系化合物 ED-110 ならびに NB-506 が、Topo I を選択性に阻害し、マウス腫瘍およびヒト腫瘍に対し強い増殖抑制効果を示した。さらに、NB-506 は、ヒト固型腫瘍に対し退縮作用も示した。NB-506 は動物に対し低蓄積性を示し連続投与が可能であることも明らかにした。
- (2) キノロン系化合物においては、細胞レベルでの Topo 阻害活性と腫瘍細胞増殖抑制効果が強い相関を示し、さらに、ヒト乳癌 MX-1 に対し Topo 阻害活性と抗腫瘍活性の間に強い相関性があることを明らかにした。
- (3) 抗転移活性の評価を行うため、肝高転移株 IMC-HM 細胞を単離し、新たな自然転移モデルの構築を行った。この細胞は、皮下移植後 3 日以内に肝へ転移し、その後全身の臓器へ転移しマウスを腫瘍細胞移植後 13 ~ 19 日で致死せしめる。この系は、自然肝転移モデルであることから、化合物の抗転移活性評価モデル（特に肝転移）として有用であると考えられた。さらに、原発巣から腫瘍細胞移植 3 日以内に肝へ転移、肝で増殖することから、腫瘍移植後 3 日で原発巣を手術摘出することにより、臨床における腫瘍摘出手術後の組織内微小転移巣増殖モデルとしても有用性が高いことを明らかにした。
- (4) Topo I 阻害剤 NB-506 は、原発巣の増殖抑制のみならず、転移した腫瘍細胞の臓器内での増殖を抑制し、延命効果をもたらすことを明らかにした。

これらの知見を総合すると、Topo 阻害剤は、白血病のみならず、固型腫瘍の治療薬として有用であると考えられ、さらに、臓器内増殖腫瘍に対する増殖阻害をも持ち合わせており、癌化学療法に有用な薬剤になる可能性を示唆した。

学位論文審査の要旨

主査教授 大塚栄子
副査教授 松田彰
副査教授 井上英夫
副査助教授 周東智

学位論文題名

トポイソメラーゼ阻害活性を有する化合物の抗腫瘍活性および 臓器内増殖腫瘍に対する増殖抑制作用に関する研究

申請者はトポイソメラーゼ阻害活性を有する化合物抗腫瘍活性および臓器内増殖腫瘍に対する増殖抑制作用について研究を行ってきたが、インドロカルバゾール系化合物 ED-110、NB-506の作用および抗がん剤としての可能性について新知見を得た。癌転移についても着目し、新たに高転移細胞株系樹立し、本モデル系が、臓器内増殖腫瘍に対する抗がん剤の評価に用いられることが確認し、前述のNB-506 および数種の抗がん剤の評価に用いられることを見いだした。

1. Topo 阻害剤の抗腫瘍活性

(1) インドロカルバゾール系化合物 ED-110 の抗腫瘍活性

ED-110 は、Topo I を選択的に阻害し、その活性は camptothecin と同等かややこれを上回った。In vivo の抗腫瘍評価では、腹腔内投与の ED-110 が P388、L1210 白血病細胞移植マウスに対し、2 倍以上の延命効果を示した。マウス腫瘍 colon 26 をマウス皮下に移植し、480 mg/m² の ED-110 を投与すると、83% と有意な固型腫瘍の増殖阻害効果を示した。さらにヒト胃癌細胞株 MKN-45 を移植したヌードマウスに ED-110 を投与す

ると、 30 mg/m^2 の投与で 50% 以上の有意な増殖抑制効果を示した。

以上の結果より、インドロカルバゾール系物質であり、Topo I 阻害活性を有する ED-110 は、白血病のみならずヒト癌を含めた固型腫瘍に対して、強い効果を示すことを明らかにした。

(2) キノロン系化合物の抗腫瘍活性

キノロン系化合物の L1210 マウス細胞に対する DNA-Topo 複合体 (cleavable complex) 形成促進作用と腫瘍細胞増殖阻害効果との間に強い相関関係が認められ、キノロン系化合物の Topo 阻害活性と腫瘍細胞増殖阻害効果の関連性を明らかになった。さらに、ヒト乳癌 MX-1 に対する抗腫瘍評価の結果、キノロン系化合物の cleavable complex 形成促進作用 (=Topo 阻害活性) が抗腫瘍効果に反映していることが明らかになった。

2. インドロカルバゾール系物質 NB-506 の抗腫瘍活性 および安全域

Topo I を選択的に阻害する NB-506 は、細胞レベルで RNA および DNA 合成を阻害する。しかし、他のインドロカルバゾール系化合物で報告されているプロテインキナーゼ阻害活性は有せず、RNA および DNA ポリメラーゼ阻害活性を示した。

マウスに移植した固型癌に対し NB-506 は、有意な増殖阻害効果を示した。さらに NB-506 の投与により、ヌードマウス移植ヒト大腸癌、ヒト肺癌 PC-13 およびヒト胃癌 MKN-45 は退縮傾向を示した。

NB-506 の至適投与スケジュールの検討を MKN-45 固型癌を用いて行った結果、連続投与が腫瘍退縮効果、再増殖開始までの抑制期間について強い効果を示すことを明らかにした。さらに、連続投与による体重減少等も認められないことから、連続投与による、治療が可能であることを明らかにした。

3. 新規癌自然転移系（臓器内増殖腫瘍）の構築

IMC carcinoma 細胞をマウス皮下に移植してもマウスは、50日以上生存する。申請者は、この IMC 細胞の中に転移能の高い sub-population があることを見いだした。これを IMC-HM 細胞とし、詳細な検討を行った。 5×10^4 個の IMC-HM 細胞を CDF₁ マウスの皮下に移植すると細胞移植後 10 日目には肝に限局した転移巣が認められた。さらに、高転移細胞移植マウスは、細胞移植後 13 ~ 18 日で全例死亡することが観察された。13 日目で死亡したマウスでは、肝のみならずリンパ節、肺、脾、卵巣等で転移巣が確認された。

IMC-HM 細胞移植後 3 日目に移植部位の腫瘍を摘出しても、その延命日数に変化は認められなかった。以上の結果より、この細胞の転移は、移植後 3 日以内に起こり、始めに肝、それから全身の臓器へと転移することを示し、この転移モデルは、自然転移であるため原発巣からの遊離、拡散、浸潤、増殖の各ステップを含めての評価が可能であると考えられる。さらに、原発巣の手術切除により臓器内増殖腫瘍（特に肝）モデルとしても有用であると考えられる。早い時期の肝への転移、その後の全身転移と臨床における癌転移と類似しており、抗転移剤あるいは臓器内増殖腫瘍に対する薬剤の評価に適したモデルであることを見いだした。

以上の研究は博士（薬学）の学位を受けるのに十分値するものと認めた。