

学 位 論 文 題 名

合成 RGDS 関連ペプチドおよび RGDS ペプチド誘導体
によるがん転移の抑制効果とその作用機序に関する研究

学位論文内容の要旨

悪性のがんは、周辺組織や遠隔臓器に浸潤・転移を起こし、患者を死に至らしめる。悪性化したがんには集学的治療が行なわれているが、通常抵抗性を示し治療成績は良くない。分子生物学の発展により、がん細胞の細胞形質が分子レベルで理解されつつあり、浸潤、転移にかかわる分子の解析も進められている。がんの転移に関する基礎的研究は、高転移性細胞株を用いたがん転移モデルが確立して以来研究が進み、転移は複雑な過程から成り立っていることが知られてきた。これら解明された基礎的な知見に基づく分子機構を臨床応用に結び付けていく試みは、極めて価値のある課題と考えられる。

本研究では、この転移過程に関係する、細胞接着分子に着目し、がん細胞と宿主間の接着相互作用を合成化合物で阻害することによるがん転移抑制の検討を行った。これまでに、Humphries らによる、合成GRGDS ペプチドを用いた転移抑制の報告や、Saikiらによる、RGD 配列の繰り返しペプチド[poly(RGD)]を用いた実験的転移や自然転移の抑制に関する一連の報告があり、これらの転移抑制は細胞接着阻害に基づくことが示された。そこで本研究では、がん細胞の浸潤阻害あるいは転移抑制という点で、これまでにほとんど報告されていない、RGDS 配列のG を他のアミノ酸へ置換したペプチドとそのN末端を修飾したペプチドを用いたがん転移の抑制効果、ならびにRGDS 配列を含む新規合成化合物を用いたがん転移の抑制効果、およびその作用機序を解析した。さらに、非ペプチド型RGD 疑似化合物を設計、合成し、その転移抑制効果を検討した。

本論文の要旨は、以下の5点である。

1. マウスのメラノーマまたはリンパ腫を用いた実験的転移の結果から、RGDSと同程度以上に肺または肝への転移を減少させるペプチドとして、GをL体あるいはD体のLeuに置換したR-X-DS(X=LあるいはI) ペプチドを見い出した。N末端修飾ペプチド(スクシニル-RGDSおよびAcD-RGDS)は、より顕著な転移抑制効果が認められ、AcDR-L-DS および AcDR-I-DS についても、同様な転移抑制の増強効果が認められた。

メラノーマ細胞の基底膜浸潤実験において、AcDRGDS ペプチドがマトリジェル/フィブロネクチンコートフィルターへの浸潤にのみ阻害効果を示したのに対し、AcDR-L-DS および AcDR-I-DS はマトリジェル/フィブロネクチンのみならずマトリジェル/ラミニンコートフィルターへの浸潤を有意に阻害した。また、これらペプチドは、フィブロネクチンのみならずラミニンに対する接触移動阻害の効果も観察された。AcDR-L-DS ペプチドは、フィブロネクチンおよびビトロネクチンへのがん細胞の接着を阻害したのに加え、ラミニンへの接着も阻害した。フィブロネクチン分子内の細胞接着部位(RGD 配列、CS1領域)と、がん細胞との接着相互作用を検討した結果、AcDRGDS は、がん細胞のRGDS-IgG への接着にのみ阻害効果を示したのに対

し、AcDR-L-DS は、RGDS-IgG およびCS1-IgG の両基質に対する接着を有意に阻害した。

これらの結果より、AcDR-L-DS (または AcDR-I-DS) ペプチドは、AcDRGDS ペプチドとは異なったメカニズムで接着相互作用を阻害している可能性が示され、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_1$ レセプターと親和性をもち得ることが示唆された。

AcDR-L-DS は、血小板凝集の阻害効果がRGDSの1/55と弱いことが明らかとなった。一方、新鮮ヒト血漿成分中で、RGDS とRLDS は等しく加水分解されるが、R-I-DS、AcDR-G-DS、AcDR-L-DS は、6時間のインキュベーションで、ほとんど分解されなかった。これらペプチドの転移抑制活性の増強は、安定性の向上による活性保持時間の延長によることが示唆された。

2 Poly(CEMA-RGDS) は、マウスのメラノーマまたはリンパ腫細胞の実験的転移において、顕著な転移抑制効果を示し、メラノーマ細胞の自然肺転移モデルにおいても治療効果が認められた。Poly(CEMA-R-X-DS) (X=LあるいはI)も同様な治療効果を示した。Poly(CEMA-RGDS)、RGDS、poly(CEMA-RGDS)と同量のpolyCEMA とRGDS を含有する混合物は、RGDS の濃度に依存して浸潤を抑制し、この効果は、RGDS 残基に依存していることが示唆された。

3 SCM-chitin-RGDS は、リンパ腫細胞の肝浸潤転移において、正常肝重量レベルまで肝浸潤転移を抑制した。また、マウスの生存期間を有意に延命した。結腸がん細胞の実験的肺転移でSCM-chitin-RGDS は強い肺転移抑制を示し、浸潤実験においても同様の阻害結果を得た。

4 RGDS誘導体FC-243[THF(RGDS₃)]は、異なる3種類のがん細胞（メラノーマ、リンパ腫、結腸がん）の実験的転移における肺または肝への転移を抑制し、自然肺転移においても治療効果を示した。制がん剤 (DOX) との併用により抑制効果はさらに増強され、マウスの生存期間を延長した。FC-243 は、肺への転移結節数を顕著に減少させたが、そのサイズは対照群と同等であった。DOX は転移結節のサイズを著しく縮小させ、その結果として転移結節数の減少も観察された。両薬物の転移結節数、サイズにおよぼす効果の差異は、薬物の作用機序（殺細胞効果あるいは浸潤抑制作用）の差によるものと考えられた。

FC-243 は、がん細胞のフィブロネクチンへの移動、マトリジェル／フィブロネクチンコートフィルターへの浸潤を阻害した。浸潤抑制の機序として、FC-243 はがん細胞の接着相互作用 (特に運動)の阻害、一方、DOX はがん細胞に対する直接的な殺細胞効果に基づくことが示唆された。

5 R-G 間のアミド結合を反転したレトロ型RGD ペプチド(FC-63) は、メラノーマ細胞の実験的転移モデルにおける肺転移を抑制した。さらに非ペプチド化を進めたカルボニルエチレン型RGD 疑似ペプチド(FC-303)は、FC-63よりも強い転移抑制効果を示した。2分子のFC-303を1分子中に有する化合物(FC-336) は、FC-303よりも効果的にメラノーマ細胞の肺転移を阻害しその効果は用量依存的であった。さらに、メラノーマ細胞の自然転移モデルにおいて、原発巣切除前、後にわたるFC-336 頻回投与は、肺転移を有意に抑制し治療効果を示した。

本研究で見出した新規な合成RGDペプチド誘導体は、がん細胞および正常細胞に対する直接的な増殖抑制効果を示さず、がん細胞膜上のインテグリンレセプターとそのリガンドである細胞接着分子との接着相互作用などを阻害することにより、がん転移形成過程におけるがん細胞の運動性などの細胞機能を制御するものである。これは、これまでの療法と全く異なる作用機序に基づくものであり、また、全く新たな分子構造を有する接着分子阻害剤などの点から、本研究は、がん転移治療の新しい可能性を示したと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 東 市 郎

副 査 教 授 菊 池 九二三

副 査 教 授 矢 澤 道 生

副 査 講 師 劉 永 春

学 位 論 文 題 名

合成 RGDS 関連ペプチドおよび RGDS ペプチド誘導体 によるがん転移の抑制効果とその作用機序に関する研究

がんの転移に関する基礎的研究の進展により、がんの転移は複雑な過程から成り立っていることが解明されてきた。これら基礎的な知見に基づく分子機構を臨床応用に結び付けていく試みは、極めて価値のある課題と考えられる。本研究では、この転移過程に関係する、細胞接着分子に着目し、がん細胞と宿主間の接着相互作用を合成化合物で阻害することによるがん転移抑制の検討を行った。本論文では、がん細胞の浸潤あるいは転移抑制という点で、これまでにほとんど報告されていない、フィブロネクチン由来の細胞接着配列 (RGDS 配列) の G を他のアミノ酸へ置換したペプチドとその N 末端を修飾したペプチドを用いたがん転移の抑制効果、ならびに RGDS 配列を含む新規合成化合物を用いたがん転移の抑制効果、およびその作用機序を解析した。さらに、非ペプチド型 RGD 疑似化合物を設計、合成し、その転移抑制効果を検討した。

本論文の要旨は、以下の 5 点である。

1. マウスの実験転移を減少させるペプチドとして、R-X-DS(X=L 体 Leu(L) あるいは D 体 Leu(I)) を見出した。N 末端修飾ペプチド、(スクシニル化-RGDS、アセチル-D-RGDS (AcDRGDS)) は、顕著な抑制効果が認められ、この修飾効果は、Ac-DR-L-DS および Ac-DR-I-DS についても、同様に認められた。

AcDR-L-DS および AcDR-I-DS はマトリジェル／フィブロネクチンのみならずマトリジェル／ラミニンコートフィルターへの浸潤を阻害した。また、フィブロネクチン、ラミニンに対する接触移動阻害の効果も示した。AcDR-L-DS ペプチドは、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンへのがん細胞の接着を阻害した。また、AcDR-L-DS は、がん細胞の RGDS-IgG、CS1-IgG への接着を阻害した。AcDR-L-DS は、AcDR-G-DS とは異なったメカニズムで接着相互作用を阻害している可能性が示され、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_1$ レセプターとの親和性が示唆された。

AcDR-L-DS は、血小板凝集阻害効果の弱いことが示された。新鮮ヒト血漿成分中で AcDR-G-DS、AcDR-L-DS は分解されにくいことから、N 末端修飾ペプチドによる転移抑制活性の増強は、血漿成分中での安定性の向上による可能性が示唆された。

2. Poly(CEMA-RGDS) は、マウスの自然肺転移モデルにおいて治療効果が認められた。

Poly(CEMA- R-X-DS) (X=LまたはI)も同様な治療効果を示した。Poly(CEMA-RGDS)はRGDSに依存した浸潤抑制効果を示した。

3. SCM-chitin-RGDS は、顕著に肝浸潤転移を抑制し、マウスの生存期間を有意に延長した。実験的肺転移でSCM-chitin-RGDS は、RGDSやSCM-chitinより強い転移抑制を示し、浸潤実験でも同様の結果を得た。

4. 3分子のRGDSを有するFC-243は、3種類のがん細胞の実験的転移を抑制し、自然転移モデルでも治療効果を示した。制がん剤(DOX)との併用により転移抑制効果は増強され、マウスの生存期間を延長した。FC-243は転移結節数を顕著に減少させたが、サイズは対照群と同等であった。DOXは結節のサイズを著しく縮小させ、数の減少も観察された。FC-243は、がん細胞のフィブロネクチンへの移動、マトリジェル/フィブロネクチンコートフィルターへの浸潤を阻害した。FC-243の作用機序は、がん細胞の接着相互作用の阻害、DOXはがん細胞に対する殺細胞効果に基づくことが示唆された。

5. R-G間のアミド結合を反転したレトロ型RGDペプチド(FC-63)、さらに非ペプチド化したカルボニルエチレン型RGD疑似ペプチド(FC-303)は実験的転移を抑制した。2分子のFC-303を有するFC-336は、より効果的に肺転移を阻害し、自然転移モデルにおいても治療効果を示した。

本論文で見い出された新規な合成RGDペプチド誘導体は、細胞に直接的な増殖抑制効果を示さず、インテグリンレセプターとそのリガンドである細胞接着分子との相互作用を阻害することなどにより、がん転移形成過程におけるがん細胞の細胞機能を制御するものである。これは、これまでのがん療法と全く異なる作用機序に基づくものであり、また、全く新たな分子構造を有する接着分子阻害剤などの点から、本研究は、がん転移治療の新しい可能性を示唆したものである。この成果は、新たな抗腫瘍薬を研究、設計する上で重要な知見を提供するものと考えられる。

よって、申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。