

学位論文題名

新規シチジン誘導体 1-(3-C-ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)
cytosine (ECyd) の抗癌効果と薬物動態,
及び感受性規定因子に関する基礎研究

学位論文内容の要旨

RNA 合成を阻害する代謝拮抗剤として見出された新規シチジン誘導体 1-(3-C-ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (エチニルシチジン; ECyd) は、細胞内に取り込まれた後ウリジン-シチジンキナーゼ (UCK; EC 2.7.1.48) によって一リン酸体に代謝され、さらにリン酸化を受け活性代謝物の三リン酸体 ECTP となり、この ECTP が RNA ポリメラーゼ活性を阻害して RNA 合成を阻害すると考えられている。このように、ECyd は既存の DNA 合成阻害を主作用とする代謝拮抗剤とは異なる作用機序を持ち、有用な抗癌剤になり得るものと期待される。しかし、従来の抗癌剤は他の疾患の臨床薬に比較して毒性が強いことや、治療有効投与量域と毒性発現投与量域が近接しているため十分な臨床効果が得られないことが問題となる場合が多く、今後の抗癌剤は高い癌選択性に基づいた抗癌活性を有し、治療成績向上のために至適投与法を確立することが重要であり、さらに抗癌剤感受性規定因子を考慮した治療計画も必要となる。そこで著者は、ECyd の抗癌効果に及ぼす投与スケジュールの影響と薬物動態を検討して ECyd の至適投与法と癌選択性を明らかにし、さらに、ECyd の感受性規定因子を明確にして ECyd の効果予測因子を提示することを目的として本研究を行った。

1. ECyd の至適投与法と癌選択性に関する検討

(1) ヒト固形癌細胞を用い ECyd の接触時間と細胞増殖抑制効果の関係を調べたところ、ECyd の *in vitro* 殺細胞様式は“濃度×時間 (AUC)” 依存的で、ECyd は細胞周期非依存性の薬剤に分類されると考えられた。このことより、ECyd の抗癌効果を最大限に発揮させるためには必ずしも長時間の薬剤持続接触は必要ではないことが示唆され、また、細胞周期依存的な既存の抗癌剤が効きにくい癌腫に対しても、ECyd は効果が期待できるものと思われた。

(2) ECyd の *in vivo* 抗癌効果に対する投与スケジュールの影響をヒト固形癌株ヌードラット皮下移植モデルを用い 3 種類の投与スケジュールで比較検討した。その結果、ECyd は投与スケジュールに依存せず 3 種類すべての投与スケジュールでほぼ同等の強い抗癌効果が認められ、間欠投与でも重篤な毒性を示すことなく強い抗癌効果を発揮することが明らかとなった。このことはまた、効果と毒性が投与スケジュールに左右される既存の抗癌剤と異なり、ECyd が細胞内代謝の面で優れた特徴を有していることを示唆するものであった。

(3) ヒト固形癌株皮下移植ヌードラットに [3 H]ECyd を単回投与し、経時的に種々の組織を摘出して各組織への放射能分布を測定したところ、ECyd 由来の放射能は正常組織

に比べて癌組織に高濃度で長時間持続する傾向が認められた。さらに、癌組織内における ECyd の代謝動態を測定したところ、活性代謝物 ECTP を主とすると考えられる ECyd ヌクレオチド (ECyd のリン酸化体) が癌組織内に高濃度で長時間持続することが示され、この ECyd ヌクレオチドの癌組織内蓄積が ECyd の癌選択的な組織分布に繋がっているものと考えられた。したがって、ECyd が投与スケジュールに依存せず、間欠投与でも重篤な毒性を示すことなく強い抗癌効果を発揮するのは、このような ECyd の薬力学的な特徴、すなわち、ECyd ヌクレオチドの癌選択的な組織分布特性が反映されているためだと考えられた。そしてこのような ECyd ヌクレオチドの癌選択的な組織分布は、正常組織よりも癌組織における ECyd リン酸化活性 (UCK 活性) が高く、それだけ癌組織において ECyd がより多くリン酸化されることが大きな要因になっていると考えられた。

2. ECyd の感受性規定因子に関する検討

(1) 2 種類のヒト固形癌細胞から ECyd に対する耐性株を樹立し、耐性株の生物学的性質、特に ECyd の細胞内代謝動態を中心に親株と比較し、ECyd に対する耐性機序、すなわち ECyd の感受性を規定する因子について検索した。その結果、UCK による ECyd リン酸化の低下が活性代謝物 ECTP の細胞内蓄積量を減少させ、ECyd による RNA 合成阻害活性を抑制し、その結果として ECyd に対する耐性の大きな要因となること、すなわち、UCK 活性が ECyd の感受性規定因子の一つであることが明らかとなった。

(2) ヒト固形癌細胞の ECyd に対する感受性と UCK 活性、及び UCK の二種類のアイソザイム UCK1 及び UCK2 の mRNA 及びタンパク発現量の関係について調べ、細胞レベルにおいて、UCK1 及び UCK2 が ECyd の効果予測因子となり得るかどうかの検討を行った。その結果、まず、ECyd に対する感受性と UCK 活性との間には高い相関関係が認められ、UCK1 については mRNA 及びタンパク発現量ともに UCK 活性との間に相関が認められなかったのに対し、UCK2 については mRNA 及びタンパク発現量ともに UCK 活性との間に相関関係が認められた。さらに、ヒト UCK1 及び UCK2 タンパクを大腸菌で発現させ、ECyd を基質に用いて ECyd リン酸化反応速度の解析を行ったところ、ECyd リン酸化酵素としての触媒効率は UCK2 が UCK1 よりも約 2000 倍高く、UCK2 が ECyd リン酸化の責任酵素であることが明らかにされた。以上のことより、ECyd は主に UCK2 によりリン酸化され、UCK2 が ECyd 感受性規定因子の一つであり、UCK2 の mRNA およびタンパク発現量が ECyd の効果予測因子となることが明らかとなった。

(3) ヌードラットモデルにおいて ECyd が高い癌選択性を示すのは癌組織における UCK 活性が高いためであり、それはすなわち癌組織における UCK2 発現量が高いためと考えられる。そこで、臨床においても ECyd に高い癌選択性が期待できるかどうかを調べるために、数種類の市販ヒト組織由来の細胞質タンパク溶液を用い、UCK2 タンパク発現量をヒトの癌組織とそれに対応する正常組織と比較した。調べたヒト正常組織由来細胞質タンパク溶液ではすべて UCK2 の発現が認められなかったが、ヒト癌組織由来細胞質タンパク溶液では 5 癌腫中 4 癌腫において UCK2 の発現が認められた。このヒト組織における UCK2 タンパク発現量の分布特性から、臨床においても ECyd の癌選択的リン酸化が期待され、ECyd が癌選択性の高い治療薬となる可能性が示唆された。

以上、本研究において、ECyd が高い癌選択性を持ち、間欠投与でも重篤な毒性を示さず強い抗癌効果を発揮すること、そして、それが ECyd の薬物体内動態の特徴に基づくことを明らかにした。また、ECyd リン酸化酵素 UCK のアイソザイム UCK2 が ECyd 感受性規定因子の一つであり、UCK2 の mRNA 及びタンパク発現量が ECyd の効果予測因子となることを明らかにし、臨床においても ECyd が癌選択性の高い治療薬となる可能性を示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 彰
副 査 教 授 鎌 滝 哲 也
副 査 助 教 授 山 崎 浩 史
副 査 助 教 授 周 東 智

学 位 論 文 題 名

新規シチジン誘導体 1-(3-C-ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl) cytosine (ECyd) の抗癌効果と薬物動態, 及び感受性規定因子に関する基礎研究

RNA 合成を阻害する代謝拮抗剤として見出された新規シチジン誘導体 1-(3-C-ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd) は、細胞内に取り込まれた後ウリジン-シチジンキナーゼ (UCK; EC 2.7.1.48) によって一リン酸体に代謝され、さらにリン酸化を受けた活性代謝物の三リン酸体 ECTP が RNA ポリメラーゼを阻害し RNA 合成を阻害すると考えられている。ECyd は既存の DNA 合成阻害を主作用とする代謝拮抗剤とは異なる作用機序を持ち、有用な抗癌剤になり得るものと期待される。そこで申請者は、ECyd の抗癌効果に及ぼす投与スケジュールの影響と薬物動態を検討し ECyd の至適投与方法と癌選択性を明らかにすること、さらに、ECyd の感受性規定因子を明確にして ECyd の効果予測因子を提示することを目的として本研究を行った。

1. ECyd の至適投与方法と癌選択性に関する検討

(1) ECyd の *in vitro* 殺細胞様式は“濃度×時間 (AUC)” 依存的で、細胞周期非依存性の薬剤に分類された。このことより、ECyd の抗癌効果を最大限に発揮させるためには必ずしも長時間の薬剤持続接触は必要ではないことが示唆され、また、細胞周期依存的な既存の抗癌剤が効きにくい癌腫に対しても、効果が期待できるものと考えられた。

(2) ECyd の *in vivo* 抗癌効果に対する投与スケジュールの影響をヒト固形癌由来株ヌードラット皮下移植モデルを用いて比較検討した。その結果、ECyd は投与スケジュールに依存せずほぼ同等の強い抗癌効果を示し、間欠投与でも重篤な毒性を示すことなく強い抗癌効果を発揮することが明らかとなった。

(3) ヒト固形癌株皮下移植ヌードラットに ^3H ECyd を単回投与し、経時的に種々の組織を摘出して各組織への放射能分布を測定したところ、ECyd 由来の放射能は正常組織に比べて癌組織に高濃度で長時間持続する傾向が認められた。さらに、癌組織内における ECyd の代謝動態を測定したところ、ECyd ヌクレオチドの癌組織内蓄積が ECyd の癌選択的な組織分布に繋がっているものと考えられた。したがって、ECyd ヌクレオチドの癌選択的な組織分布は、正常組織よりも癌組織における ECyd リン酸化活性 (UCK 活性) が高く、それだけ癌組織において ECyd がより多くリン酸化されることが大きな要因になっていると考えられた。

2. ECyd の感受性規定因子に関する検討

(1) ヒト固形癌由来細胞から ECyd に対する耐性株を樹立し、ECyd の感受性規定因子について検索した。その結果、UCK による ECyd リン酸化の低下が活性代謝物 ECTP の細胞内蓄積量を減少させ、RNA 合成阻害活性を抑制し、その結果として ECyd に対する耐性の大きな要因となることを明らかにした。

(2) ヒト固形癌由来細胞の ECyd に対する感受性と二種類の UCK アイソザイム UCK1 及び UCK2 の mRNA およびタンパク発現量の関係について調べた。その結果、ECyd に対する感受性と UCK 活性との間には高い相関関係が認められ、UCK1 については mRNA およびタンパク発現量ともに UCK 活性との間に相関が認められなかったのに対し、UCK2 については mRNA およびタンパク発現量ともに UCK 活性との間に相関関係が認められた。さらに、ヒト UCK1 および UCK2 タンパクを大腸菌で発現させ、ECyd リン酸化反応速度の解析を行ったところ、触媒効率は UCK2 が UCK1 よりも約 2000 倍高く、UCK2 が ECyd リン酸化の責任酵素であることが明らかになった。以上のことより、UCK2 が ECyd 感受性規定因子の一つであり、UCK2 の mRNA およびタンパク発現量が ECyd の効果予測因子となることを明らかにした。

(3) ヌードラットモデルにおいて ECyd が高い癌選択性を示すのは癌組織における UCK2 活性が高いためであると考えられる。そこで、臨床においても ECyd に高い癌選択性が期待できるかどうかを調べるために、数種類の市販ヒト組織由来細胞質タンパク溶液を用い、UCK2 タンパク発現量をヒト癌組織とそれに対応する正常組織で比較した。調べたヒト正常組織由来細胞質タンパク溶液ではすべて UCK2 の発現が認められなかったが、ヒト癌組織由来細胞質タンパク溶液では 5 癌腫中 4 癌腫において UCK2 の発現が認められた。このヒト組織における UCK2 タンパク発現量の分布特性から、臨床においても ECyd の癌選択的リン酸化が期待され、ECyd が癌選択性の高い治療薬となる可能性が示唆された。

以上のように本研究は、RNA 合成阻害剤である ECyd が高い癌選択性を持ち、間欠投与でも重篤な毒性を示さず強い抗癌効果を発揮することを明らかにし、それが、ECyd のリン酸化酵素 UCK2 の発現量に依存することを明らかにした。現在、ECyd は米国で Phase I 試験が進行中であり、癌選択性の高い治療薬となることが期待されており、博士 (薬学) の学位を授与するに足る内容を持つものと認定した。