

滑膜肉腫に対するキナーゼ阻害薬の抗腫瘍効果 及びその分子機構に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】滑膜肉腫は全軟部悪性腫瘍の7-10%を占め、悪性線維性組織球症、脂肪肉腫に次いで多い軟部悪性腫瘍である。標準的治療として広範切除術や四肢切断術などの外科的切除に加え、化学療法および放射線療法が併用される。しかし肺や骨などへの転移や再発が高率に認められ、5年生存率は24%~76%、10年生存率は11%~57%と予後不良である。一方、滑膜肉腫では様々な受容体型チロシンキナーゼの発現亢進が認められることから、これらに対する分子標的治療も試みられているものの、有効な治療効果を得られるには至っていない。

Src ファミリーキナーゼ (SFK) は非受容体型チロシンキナーゼであり、様々な腫瘍細胞において発現亢進や活性化が報告されている。SFK は腫瘍微小環境 (増殖因子・サイトカイン・細胞外基質・細胞間接着など) の影響を受けて活性化し、細胞増殖や運動・浸潤、腫瘍血管新生等に対して促進的に働くことが明らかになっている。このため、腫瘍細胞に対する SFK の抑制効果を正当に評価するためには、腫瘍微小環境、すなわち生体内腫瘍組織における検討が必要不可欠となる。

我々はこれまでに、培養細胞株を用いて SFK が滑膜肉腫細胞の増殖・運動に促進的に関与すること、また古典的 SFK 阻害薬 PP2 がこれらを劇的に抑制することを報告してきたが、生体内腫瘍環境における SFK 抑制による抗腫瘍効果については未だ不明であった。そこで本研究では、滑膜肉腫の異種移植片モデルを作製し、マウスへの全身投与が可能な SFK 阻害薬 SU6656 を用いてその腫瘍抑制効果と抑制の分子メカニズムを検討した。

【材料と方法】動物実験は北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。ヌードマウスの皮下にヒト滑膜肉腫細胞株 Fuji を接種し、5日後あるいは擬似臨床モデルとして14日後から SU6656 を週3回または3日投与-2日休薬のサイクルで腹腔内投与した。42日後にマウスを安楽死させて腫瘍を摘出し、腫瘍重量および体積を測定した。また病理学的検索により、SU6656 による腫瘍形成、周囲組織への浸潤、腫瘍血管新生への抑制効果を検討した。SU6656 による抗腫瘍効果の詳細な機序は、*in vitro* 実験系 (増殖能：増殖・生存実験、イムノプロットティング、フローサイトメトリーによる細胞周期解析、細胞分裂期のライブイメージング、運動能：創傷治癒試験、浸潤実験、プルダウン法による活性化型 Rac1 の検出、MMP のザイモグラフィ、細胞接着斑の免疫染色、腫瘍血管新生：RT-PCR および ELISA による VEGF 発現量解析、血管内皮細胞の走化性試験) により解析した。また、PyMOL ソフトウェアを用いて *in silico* での蛋白質立体構造解析を行い、SU6656 とキナーゼ間の結合の有無とその結合様式を解析した。

【結果】異種移植片モデルでは SU6656 により腫瘍形成や周囲組織への浸潤の有意な抑制が認められ、腫瘍形成確認後から投薬を開始した擬似臨床モデルにおいても、SU6656 は全身状態に影響を与えることなく腫瘍の進展阻害を達成した。*In vitro* の実験系においても、SU6656 は滑膜肉腫細胞株の細胞増殖と生存を有意に抑制した。さらに特徴的所見として、

SU6656 処理によって G2/M 期の蓄積と分裂溝の形成不全による細胞質分裂の障害が生じ、それにより多核細胞とアポトーシスの誘導が観察された。しかし、これらの現象は PP2 処理では再現されず、SU6656 が SFK 以外の分子を標的としている可能性が示唆された。SU6656 処理により、細胞分裂の主要制御因子オーロラキナーゼの基質蛋白質ヒストン H3 のリン酸化が抑制されたことから、SU6656 のオーロラキナーゼへの抑制効果が示唆されたためイムノブロットにて検討した。SU6656 の 6 時間処理ではオーロラキナーゼ B および C の酵素活性に重要なスレオニン残基のリン酸化が阻害され、72 時間処理ではオーロラキナーゼ A および B の蛋白質自体の発現量が低下することが明らかとなった。さらに、PyMOL を用いた立体構造解析において、SU6656 はオーロラキナーゼ B の触媒部位に 4 個の水素結合を介して安定的に結合し得ることが確認され、その阻害作用は直接的であると示唆された。一方、同構造解析において、PP2 のオーロラキナーゼ B への安定した結合は結合様式上困難であった。SU6656 は MMP の発現や活性を抑制しなかったものの、低分子量 G 蛋白質 Rac1 の活性化や細胞接着斑の成熟を抑制し、細胞運動能を有意に低下させた。また、SU6656 は腫瘍細胞の SFK を阻害することによって腫瘍細胞からの VEGF 産生を抑制すると同時に、血管内皮細胞の生存、遊走、細胞質分裂を直接抑制して腫瘍血管新生を抑制した。PP2 とオーロラキナーゼ阻害薬 VX-680 の併用によって単独処理時に比べて有効な増殖抑制効果が認められた。

【考察】本研究により、これまで SFK 特異的阻害薬として汎用されてきた SU6656 が、SFK と同時に、オーロラキナーゼ B および C の活性も阻害すること、またこれら両キナーゼの同時抑制が単独抑制時よりもより有効な腫瘍抑制効果をもたらすことが明らかとなった。オーロラキナーゼは A、B、C の 3 つのサブタイプから構成され、A は中心体の成熟や紡錘体構築、紡錘体チェックポイント、B は染色体の凝縮や微小管-動原体の接着、中央紡錘体構築や細胞質分裂に関与することが報告されている。本研究により、SU6656 がまずオーロラキナーゼ B の酵素活性を阻害することによって細胞周期の G2/M 期が遅延し、その後オーロラキナーゼ A と B の蛋白質発現量が低下する結果いずれの機能も損なわれ、細胞分裂の様々な段階において障害が生じ、mitotic slippage や倍数体細胞の形成、アポトーシスが引き起こされて劇的な腫瘍形成抑制効果が発揮されたと示唆された。一方、SU6656 による腫瘍細胞の運動・浸潤能抑制機構については、SU6656 は MMP の発現量やその活性化に影響を及ぼさなかったことから、Src の抑制によって Rac1 の活性が阻害され細胞骨格の適正な再構築が阻害された結果、腫瘍細胞の運動能が抑制されたものと示唆される。また、腫瘍血管新生の抑制においては、SU6656 は腫瘍細胞の SFK を阻害して HIF-1 α や STAT3 による VEGF 発現亢進を抑制すると同時に、血管内皮細胞の SFK とオーロラキナーゼを阻害することによって増殖、生存、遊走を抑制すると推察された。イムノブロット法では SU6656 によるオーロラキナーゼ A の活性阻害効果は認められなかったが、*in silico* 解析では SU6656 がオーロラキナーゼ A にも結合し得る可能性が示されており、今後実際のタンパク質と SU6656 との熱力学的解析や結晶構造解析を行う必要があると考えられた。

【結論】本研究により、SFK 特異的阻害薬として頻用されてきた SU6656 がオーロラキナーゼに対する阻害効果も併有していることを明らかにした。SFK とオーロラキナーゼは滑膜肉腫悪性化に独立して寄与することから、これらの二重阻害は本腫瘍の治療上相乗的抗腫瘍効果を発揮すると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	濱 田 淳 一
副 査	准教授	丸 尾 聖 爾
副 査	教 授	佐 邊 壽 孝
副 査	教 授	三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

滑膜肉腫に対するキナーゼ阻害薬の抗腫瘍効果 及びその分子機構に関する研究

滑膜肉腫は全軟部悪性腫瘍の 7-10% を占める腫瘍である。広範切除術や四肢切断術などの外科的切除に加え、化学療法および放射線療法が併用される。しかし転移や再発が高率に認められ、5 年生存率は 24%~76%、10 年生存率は 11%~57% と予後不良である。一方、滑膜肉腫では様々な受容体型チロシンキナーゼの発現亢進が認められ、これらに対する分子標的治療も試みられているものの、有効な治療効果を得られるには至っていない。

Src ファミリーキナーゼ (SFK) は非受容体型チロシンキナーゼであり、様々な腫瘍細胞において発現亢進や活性化が報告されている。SFK は腫瘍微小環境の影響を受けて活性化し、細胞増殖や運動・浸潤、腫瘍血管新生等に対して促進的に働くことが明らかになっている。このため、腫瘍細胞に対する SFK の抑制効果を正当に評価するためには、腫瘍微小環境、すなわち生体内腫瘍組織における検討が必要不可欠となる。申請者らはこれまでに、培養細胞株を用いて SFK が滑膜肉腫細胞の増殖・運動に促進的に関与すること、また古典的 SFK 阻害薬 PP2 がこれらを劇的に抑制することを報告してきた。しかしながら、生体内腫瘍環境における SFK 抑制による抗腫瘍効果については未だ不明であった。そこで本研究では、滑膜肉腫の免疫不全マウスへの移植モデルを作製し、マウスへの全身投与が可能な SFK 阻害薬 SU6656 の腫瘍抑制効果とその抑制の分子メカニズムを検討した。

移植モデルでは SU6656 により腫瘍形成や周囲組織への浸潤の有意な抑制が認められ、腫瘍形成が確認された後から投薬を開始した擬似臨床モデルにおいても、SU6656 は全身状態に影響を与えることなく腫瘍の増殖・浸潤を抑制した。*In vitro* の実験系においても、SU6656 は滑膜肉腫細胞株の細胞増殖と生存を有意に抑制した。さらに特徴的所見として、SU6656

処理によって G2/M 期の蓄積と細胞質分裂の障害が生じ、それにより多核細胞とアポトーシスの誘導が観察された。SU6656 処理により、細胞分裂の主要制御因子オーロラキナーゼの基質蛋白質ヒストン H3 のリン酸化が抑制され、p53 の分解抑制が認められたことから、SU6656 のオーロラキナーゼへの抑制効果が示唆された。事実、SU6656 処理はオーロラ B および C の酵素活性に重要なスレオニン残基のリン酸化を阻害することが明らかとなった。さらに、PyMOL を用いて立体構造解析を行ったところ、SU6656 はオーロラ B の触媒部位に 4 個の水素結合を介して安定的に結合し得ることが確認され、その阻害作用は直接的であると示唆された。SU6656 はマトリックスメタロプロテイナーゼの発現や活性を抑制しなかったものの、低分子量 G 蛋白質 Rac1 の活性化を抑制し、細胞運動能を有意に低下させた。また SU6656 は、腫瘍細胞の SFK を阻害し VEGF の産生を抑制するとともに、血管内皮細胞にも直接作用してその生存、遊走、細胞質分裂を抑制して腫瘍血管新生阻害作用を発揮した。

発表後、丸尾准教授から、生存試験で細胞増殖を考慮すべきとの指摘があった。滑膜肉腫でしばしばみられる染色体転座に伴い産生される融合タンパク SYT-SSX の治療上の有用性について質問がなされた。この質問に対して、申請者から同タンパク質を標的とした治療では有効な抗腫瘍効果が得られなかったことが回答された。

佐邊教授から、滑膜肉腫細胞における p53 の発現量や変異、SU によるカゼインキナーゼ等の抑制効果について質問がなされた。p53 の変異は確認されなかったこと、カゼインキナーゼ等に対する活性抑制作用については今後検討する旨の回答がなされた。

三浪教授から、SU の副作用について質問がなされた。滑膜肉腫細胞では SU が標的とするキナーゼの発現や活性が亢進しており、適切な投与量により正常細胞への影響を最小限に抑えることが可能との回答があった。滑膜肉腫以外の腫瘍細胞への SU 使用についての質問があり、様々な細胞株への使用が現在検討されているとの回答がなされた。

濱田准教授は、移植モデルでの他臓器への転移について質問した。本実験では全群において肉眼的な転移巣を認めなかったが、観察期間を延長すれば転移抑制効果もみられたであろうとの回答がなされた。また、SFK とオーロラキナーゼを二重阻害する際の副作用について質問し、骨髄抑制を中心とした副作用の可能性について回答がなされた。

申請者は、本研究において、これまで SFK 特異的阻害薬として汎用されてきた SU6656 が、SFK だけでなく、オーロラ B および C の活性をも阻害し、腫瘍の増殖・浸潤を抑制することを明らかにした。この SU6656 のユニークな阻害活性の発見は、本剤を基盤とした新規薬剤の開発や臨床応用への展開に繋がるものと期待される。

審査員一同はこれらの成果を評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受ける資格を有すると判定した。