

(論文内容の要旨)

抗体医薬に代表される分子標的薬の開発により癌化学療法は急速に進歩したが、依然として癌の根治には程遠く、癌化学療法による延命効果は平均2,3ヶ月に過ぎないことが示されている。治療効果が不十分な理由としては、癌細胞の不均一性が指摘されており、これが癌細胞を標的とする抗癌剤あるいは分子標的薬による治療に限界をもたらすと考えられる。一方、癌の進展には癌細胞に加えて宿主細胞が複雑に関与することから、宿主細胞あるいは両者の相互作用を標的とすることで、癌種を問わず適応範囲の広い治療法が開発できる可能性がある。こうした考えに基づき、これまでに過酸化水素を効率よく消去する *catalase* を利用した癌転移抑制に関する検討が行なわれ、*catalase* の体内動態を厳密に制御することで効率的な癌転移抑制が可能であることが示されてきた。しかしながら、癌転移過程における過酸化水素の生成、ならびにその転移亢進に関する機構については十分には明らかにされておらず、一方、酸化ストレスは、種々の癌治療法の効果を左右する免疫機能を抑制することも示唆されており、*catalase* の併用による癌免疫療法の効果増強も期待される。そこで本研究では、癌転移に関与する分子の発現を促進する転写因子 *NF-κB* に焦点を当て、転移初期過程における細胞間相互作用に基づく *NF-κB* 活性変動を定量的に評価し、癌転移および転移抑制メカニズムの解明を試みた。また、*catalase* 誘導体投与による全身レベルでの酸化ストレスの低減が、これによる免疫療法の効果に与える影響を検討した。

I. 癌転移初期過程における *NF-κB* 活性の定量的解析および細胞選択的 *catalase* デリバリーによる活性化の抑制

癌転移過程における *NF-κB* の関与を明らかにすることを目的に、*in vivo* イメージング手法を応用してマウスを用いて *NF-κB* 活性を定量的かつ経時的に評価するシステムを開発した。まず、*in vivo* 遺伝子導入法として開発されたハイドロダイナミクス法を用い、*NF-κB* 活性に依存してホタルルシフェラーゼを発現するプラスミドベクターをマウス肝臓に導入して新規な評価モデルを構築した。この評価モデルマウスに、マウス結腸癌細胞 *colon26* を門脈内に移植した結果、肝臓中ルシフェラーゼ活性の増大が観察された。次に、*NF-κB* 活性に依存してルシフェラーゼを発現する *colon26* 細胞株を樹立して、正常マウス門脈内に注入したところ、培養条件下と比較して有意に高いルシフェラーゼ活性が検出された。また、いずれの場合にも、肝臓非実質細胞指向型であるスクシニル化 *catalase* を投与することでルシフェラーゼ活性の増大は顕著に抑制された。従って、肝転移過程では、肝臓構成細胞および癌細胞のいずれにおいても *NF-κB* が活性化されること、さらに *catalase* 誘導体によりこの活性化を抑制可能であることが明らかとなった。一方、 GdCl_3 処理により *Kupffer* 細胞を除去したマウスでは、いずれの細胞でも *NF-κB* の活性化は認められなかった。以上のことから、*Kupffer* 細胞と癌細胞が相互作用することで、サイトカインや活性酸素などの産生量が増大し、これによる肝臓構成細胞および癌細胞での *NF-κB* 活性化を介して癌転移が亢進することが推察された。

II. 宿主細胞－癌細胞間相互作用による活性酸素を介した癌転移亢進機構の解析

前章で得られた知見についてさらに詳細に検討するために、宿主細胞－癌細胞間相互作用が癌転移に及ぼす影響に関して培養細胞を用いて検討した。単独で培養した際にはほとんど活性酸素が検出されなかったマウスマクロファージと colon26 細胞を共培養したところ、活性酸素の生成量が増大するとともに、癌細胞内 NF- κ B および matrix metalloproteinases (MMP) 活性が有意に増大した。この NF- κ B・MMP の活性化は、catalase あるいは N-アセチルシステインの添加により抑制された。従って、マクロファージと colon26 細胞との相互作用により活性酸素が生成し、これが NF- κ B の活性化を介して MMP の活性化を引き起こす可能性が示された。次に、colon26 細胞を NF- κ B 活性依存的にルシフェラーゼを発現するプラスミドを導入したマウス血管内皮細胞株と共培養し、細胞接着における NF- κ B 活性変動について検討した。その結果、癌細胞と血管内皮細胞の培養時には内皮細胞の NF- κ B 活性には顕著な変化が認められなかったが、これにマクロファージを添加した場合には内皮細胞での NF- κ B 活性化が認められた。以上の結果から、癌転移初期過程においては、癌細胞と Kupffer 細胞の相互作用により、近傍の血管内皮細胞で NF- κ B が活性化し、接着分子などの転写亢進を介して癌細胞の血管内皮細胞への接着が促進するものと考えられた。

III. catalase 誘導体による未分化ミエロイド細胞の分化誘導による免疫療法の効果増強

担癌状態では、癌の進行とともに未分化ミエロイド細胞が増加し、これが細胞障害性 T 細胞の機能を抑制することによって癌免疫療法の治療効果を減弱する要因となることが示されている。未分化ミエロイド細胞では活性酸素レベルが高く、これが抗原提示細胞への分化を抑制することから、活性酸素の消去により未分化ミエロイド細胞の分化を促進することで癌免疫療法による治療効果増強を得ることが期待される。そこで、血中滞留性に優れる PEG 修飾 catalase を繰り返し投与し、未分化ミエロイド細胞の分化、および癌免疫療法の治療効果に及ぼす影響を検討した。正常マウスから骨髓細胞を単離し抗原提示細胞への分化を評価したところ、高濃度活性酸素条件下では抗原提示細胞への分化が著しく抑制され、未分化ミエロイド細胞の状態にあることが明らかとなった。また、担癌マウスから単離した未分化ミエロイド細胞に活性酸素を消去する catalase や N-アセチルシステインを添加したところ、抗原提示細胞への分化が促進された。次に、担癌マウスに PEG-catalase を繰り返し投与して脾臓細胞内活性酸素量および未分化ミエロイド細胞数を定量した結果、PEG-catalase を投与することで活性酸素量および未分化ミエロイド細胞数を有意に抑制可能であることが明らかとなった。これらの結果から、担癌状態での活性酸素を持続的に消去することにより癌免疫療法の作用を増強する可能性が示された。

以上本研究は、癌転移過程における NF- κ B 活性を宿主および癌細胞それぞれにおいて分離評価し、体内動態を制御した catalase 誘導体を用いることで癌転移の亢進および免疫機能の低下を抑制可能であることが明らかにしたものである。これらの知見は、これまで十分に明らかにされてこなかった癌転移過程における活性酸素の役割について新たな基礎的情報を提供し、癌－宿主細胞間相互作用に基づく新規癌治療法の開発に有益な知見を提供するものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

近年、癌化学療法は急速に進歩したが癌細胞の不均一性等のため効果に限界があり、一方、癌の進展には癌細胞に加えて宿主細胞が複雑に関与することから、その相互作用を標的とする新規治療法の開発が期待されている。これまでに、過酸化水素を消去する *catalase* を利用した癌転移抑制に関する検討が行なわれ、その体内動態の厳密な制御により癌転移抑制が可能であることが示されてきた。しかしながら、癌転移過程における過酸化水素の生成とそれによる転移亢進の機構については明らかにされておらず、一方、酸化ストレスが免疫機能を抑制することも示唆されていることから、癌免疫療法の視点からの検討も重要と思われる。そこで、申請者は転写因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ に焦点を当て、転移初期過程における細胞間相互作用に基づく $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 活性変動を定量的に評価して癌転移および転移抑制メカニズムの解明を試みるとともに、*catalase* 誘導体投与による全身レベルでの酸化ストレスの低減が免疫療法の効果に与える影響を検討した。

最初に、癌転移過程における $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の関与を明らかにすることを目的に、ハイドロダイナミクス法を用い $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 活性に依存してホタルルシフェラーゼを発現するプラスミドベクターを肝臓に導入した新規モデルマウスを作成し、これにマウス結腸癌細胞 *colon26* を門脈を介して移植した結果、肝臓中ルシフェラーゼ活性の増大を認めた。次に、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 活性に依存してルシフェラーゼを発現する *colon26* 細胞株を樹立し、正常マウス門脈内に注入した結果培養条件下と比較して有意に高いルシフェラーゼ活性を得た。また、いずれの場合にも肝臓非実質細胞指向型であるスクシニル化 *catalase* の投与によりルシフェラーゼ活性の増大は顕著に抑制され、一方、 GdCl_3 処理により *Kupffer* 細胞を除去したマウスではいずれの系でも $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の活性化は認められなかった。以上より、*Kupffer* 細胞と癌細胞が相互作用することでサイトカインや活性酸素などの産生が増大し、肝臓構成細胞および癌細胞での $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 活性化を介して癌転移が亢進することが示唆された。次に、宿主細胞－癌細胞間相互作用が癌転移に及ぼす影響について培養細胞を用いて検討し、マクロファージと *colon26* 細胞との相互作用により活性酸素が生成し、これが $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の活性化を介して *MMP* の活性化を引き起こす可能性を見出した。また、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 活性依存的にルシフェラーゼを発現するマウス血管内皮細胞株と *colon26* 細胞を共培養した結果、癌転移初期過程においては癌細胞と *Kupffer* 細胞の相互作用により近傍の血管内皮細胞で $\text{NF-}\kappa\text{B}$ が活性化し、接着分子などの転写亢進を介して癌細胞の血管内皮細胞への接着が促進されることを確かめた。最後に、担癌状態では癌の進行とともに増加した未分化ミエロイド細胞が細胞障害性 *T* 細胞の機能を抑制すること、一方、未分化ミエロイド細胞において高濃度を示す活性酸素が抗原提示細胞への分化を抑制することに着目し、過酸化水素の制御が未分化ミエロイド細胞の分化および癌免疫療法の治療効果に及ぼす影響を検討した。正常マウスの骨髄細胞の抗原提示細胞への分化は高濃度活性酸素条件下で著しく抑制され、また、活性酸素を消去する *catalase* や *N*-アセチルシステインは担癌マウスから単離した未分化ミエロイド細胞の抗原提示細胞への分化を促進した。さらに、担癌

マウスに血中滞留性に優れる PEG 修飾 catalase を繰り返し投与して脾臓細胞内活性酸素量および未分化ミエロイド細胞数を定量した結果有意な抑制が認められ、担癌状態における活性酸素の持続的消去による癌免疫療法の作用増強の可能性が示唆された。

以上、本研究では癌転移過程におけるNF- κ B活性を宿主および癌細胞それぞれにおいて分離評価し、体内動態を制御したcatalase誘導体を用いることで癌転移の亢進および免疫機能の低下を抑制できることを明らかにした。これらの知見は、癌転移過程における活性酸素の役割について新たな基礎的情報を提供し、癌－宿主細胞間相互作用に基づく新規癌治療法の開発に有益な知見を提供するものと考えられる。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。
さらに、平成21年2月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。