

氏 名	よこ 横 田 しん 真 いち 一
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1742 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Benzylidene Lactam Compound, KNK437, a Novel Inhibitor of Acquisition of Thermotolerance and Heat Shock Protein Induction in Human Colon Carcinoma Cells (ベンジリデンラクタム化合物 KNK437 はヒト結腸癌由来細胞における温熱耐性獲得および熱ショック蛋白質誘導の新規な阻害物質である)
論文調査委員	(主 査) 教 授 平 岡 真 寛 教 授 成 宮 周 教 授 永 田 和 宏

論 文 内 容 の 要 旨

細胞は温熱等のストレスを受け熱ショック蛋白質 (HSP) を誘導発現し、また次の温熱処理に対して一過性の抵抗性を示す温熱耐性を獲得する。温熱耐性の発現は温熱の殺癌細胞効果を利用した癌温熱療法の問題点の一つであり、HSP 特異的な誘導阻害作用を特徴とする温熱耐性獲得阻害剤の取得を試みた結果、新規ベンジリデンラクタム化合物 KNK437 が濃度依存的に温熱耐性の獲得を阻害し、かつ mRNA レベルで HSP 誘導発現を阻害した。

すなわち、KNK437 は分割熱処理によるヒト結腸癌細胞 COLO320DM 細胞の温熱耐性獲得を濃度依存的に阻害し、1 回目温熱処理前からの添加で最も効果が高かった。また HeLaS3 細胞においても阻害濃度は異なるが濃度依存的阻害効果を示した。細胞の温熱耐性は熱以外のストレスによっても獲得されることを特徴とするが、KNK437 はその亜硫酸処理による温熱耐性獲得もまた阻害した。

次に COLO320DM 細胞を 35S メチオニンで蛋白ラベルし、熱ショック有無の HSP 合成に対する KNK437 の効果を 2 次元蛋白質電気泳動法により調べたところ、100 μ M の KNK437 により、HSP110 / HSP105, HSP72, HSP40 等の熱による HSP 誘導が阻害された。一方、定常的に発現する HSP ファミリー蛋白質、例えば HSC73 や HSP90 の発現や他の蛋白質合成に対する影響は見られなかった。

さらに温熱耐性獲得と強い相関関係が報告されている誘導型 HSP70 の発現をウエスタンブロット法により調べた結果、KNK437 は COLO320DM 細胞、HeLaS3 細胞、SCC VII 細胞において、熱による HSP70 誘導を濃度依存的に抑制した。KNK437 による濃度依存的な HSP70 誘導発現阻害作用及び細胞温熱耐性獲得阻害作用はいずれも HeLaS3 細胞より COLO320DM 細胞において低濃度で効果が示され、細胞間での HSP 誘導と温熱耐性獲得の違いに相関関係が見られた。

なお、KNK437 はこれら細胞において単独処理での抗癌作用を示さず、また KNK437 処理で一度阻害された HSP72 の誘導発現は薬剤除去後の細胞熱処理により正常レベルまで回復した。

哺乳動物細胞では熱ショックにより転写誘導因子 HSF1 が活性化され、HSP40 や HSP70, HSP100 を含む多くの HSP が誘導発現されるが、細胞へのストレス刺激から HSP の誘導発現につながる HSF 活性化機構については明快にわかっていない。一方、HSP は多くの分子種が存在し、その役割は細胞内環境維持の分子シャペロン機能等多岐にわたっている。そこで、KNK437 の温熱処理における誘導型 HSP 発現阻害について熱ショックによる誘導型 HSP70mRNA の集積を調べたところ、KNK437 によりほぼ完全に阻害されることがノザンブロット法で確認され、作用機作として HSF1 の活性化阻害による誘導転写レベルでの HSP 抑制が示唆された。

これらの結果より、KNK437 は HSP 誘導阻害効果による温熱耐性獲得の新規阻害剤であり、温熱耐性獲得阻害による癌温熱療法の効果向上の可能性が示された。これまで、植物フラボノイドのケルセチンが温熱耐性獲得阻害効果と HSP 誘導阻害効果を併せ持つことが報告されているが、KNK437 は両効果とも明らかにケルセチンを上回った。また、今後 KNK437 は HSF1 活性化阻害を手段としたストレスシグナル伝達機構のメカニズム解明、さらには HSP 阻害とアポトーシ

ス誘導に関する研究にも有用と考えられる。

論文審査の結果の要旨

熱ストレスを受けた細胞が、その後の致死的热処理に対して一過性の温熱耐性を獲得することは癌温熱療法の問題点の一つである。腫瘍細胞の分割加温による温熱耐性獲得が、新規ベンジリデンラクタム化合物 KNK437 により濃度依存的に阻害されることが見いだされた。

また、熱ストレスにより細胞内では熱ショック蛋白質として知られる一連の蛋白質が誘導される。KNK437 は 2 次元蛋白質電気泳動の結果、これら一連の熱ショック蛋白質誘導を特異的に阻害した。さらに、異なる細胞種間で熱誘導型 HSP70 発現量と温熱耐性獲得の間に相関関係が見られた。薬剤の作用機作として、ノザンプロット等の結果から転写誘導レベルでの熱ショック蛋白質抑制が示唆された。

KNK437 は、培養細胞を用いた細胞温熱耐性獲得阻害及び熱ショック蛋白質誘導阻害実験において、これまで知られていた植物フラボノイドのケルセチンを上回る効果を示す、熱ショック蛋白質誘導阻害作用を特徴とする温熱耐性獲得の新規阻害剤であり、温熱耐性獲得阻害による癌温熱療法の効果向上の可能性が示された。また癌温熱療法モデル動物実験においても KNK437 は *in vitro* と同じ効果を示すことが明らかにされた。さらに、温熱耐性獲得および熱ショック蛋白質誘導機構解明にも有用と考えられる。

以上の研究は細胞の温熱耐性獲得機構解明に貢献し、癌温熱療法における温熱耐性発現克服に寄与するところが大い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年1月22日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。