

氏 名	ひょう どう けん じ 兵 頭 健 治
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 619 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	薬 学 研 究 科 医 療 薬 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Biodistribution Control of Catalase by Chemical Modification for Inhibition of Cancer Metastasis (癌転移抑制を目的とした化学修飾による catalase の体内動態制御に関する 研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 橋 田 充 教 授 高 倉 喜 信 教 授 乾 賢 一

論 文 内 容 の 要 旨

癌転移及びそれに伴う癌の再発は、癌患者の生命を脅かす最大の要因である。近年、多くの過程が複雑に絡み合った結果として生じる癌転移のメカニズムが徐々に明らかとされ、転移抑制を目的として各過程の抑制法の開発が進められている。しかしながら、癌細胞の多様性からその効果は癌細胞の性質に左右されることが多く、一般的に適用可能な抑制法はいまだに確立されていない。その一方で、活性酸素が種々の癌転移過程に複雑に関与し、多くの癌腫で癌転移を亢進させることが明らかとされつつある。そこで、活性酸素を効率よく消去する catalase や superoxide dismutase などの酵素の利用が検討されているものの、その効果は十分とはいえない。その主な理由として、抑制メカニズムに関する情報が断片的であり、それぞれを生体内に適用した場合の詳細が明らかではないことが挙げられる。投与された酵素が十分な癌転移抑制効果を発揮するためには活性酸素発生部位に到達することが必須であり、ドラッグデリバリーシステム（DDS）の適用により活性酸素消去酵素の体内動態を時間的・空間的に制御することが必要不可欠である。しかしながら、その開発に際しては、癌細胞の毛細血管への塞栓・血管内皮細胞への接着、間質への浸潤、増殖等の転移の素過程を組織レベルで分離評価可能な解析法が必要である。そこで本研究では、まず癌転移の複雑な過程の中から、接着、浸潤及び増殖過程を分離し、各過程を定量的に解析することを可能とする実験評価系の確立を試みた。さらに確立した実験系を用いることで catalase 誘導体の癌転移抑制効果を作用点ごとに分離評価し、体内動態を最適化することで癌転移抑制効果の最大化を試み、活性酸素消去酵素誘導体による癌転移治療の可能性について検討した。

I. レポーター遺伝子を利用した癌転移解析法の開発

癌転移は多くの過程を経ることにより成立する。これらの転移素過程を定量的に解析することを可能とする実験評価系の確立を目指し、マウス由来メラノーマ細胞株 B16-BL6 および結腸癌細胞株 colon26 に luciferase 遺伝子を導入することでレポーター遺伝子安定発現癌細胞株を樹立した。得られた安定発現株のうち、luciferase 遺伝子発現活性が高く、また形質および転移能が親細胞株と同等のものを選択し、以降の検討に用いた。luciferase 活性は癌細胞数と広範囲において比例し、得られた関係式から換算すると、組織 1 g 中400個程度の癌細胞があれば検出が可能な評価系を創出した。B16-BL6/Luc 細胞を血管内に注入後、流域下の臓器中における luciferase 活性を経時的に測定することで、癌原発巣から血管内へ脱出後の癌細胞の体内動態を検討した。その結果、血管内に投与された癌細胞の60～90%は肺に塞栓的に集積し、投与24時間以内に生き残った3%程度の癌細胞が内皮細胞へ接着すること、さらにはその後標的臓器への浸潤を完了し、指数関数的に増殖することが示唆された。また、原発巣として皮下に癌細胞を移植し、肺への自然転移モデルを作成することで、原発巣切除後の転移巣における癌細胞増殖に対する速度論的解析を行った。その結果、原発巣の切除により肺において急激な癌細胞の増殖が観察され、切除後の1週間で癌細胞数は約1000倍となることが明らかとなった。さらに、複雑な組織構造のためにこれまで定量的評価が困難であった腹膜播種性転移においても本評価系は適用可能であり、経時的に解析した結果、腹腔内に播種された癌細胞が選択的に大網に集積すること、腹壁の創傷部位付近での癌細胞増殖が著しく速いことが明らかとなった。

以上のように、レポーター遺伝子導入癌細胞を用いることにより、従来困難であった癌転移過程の分離評価、増殖の速度論的解析、組織分布評価などが可能となった。

II. 腹腔内滞留型 catalase 誘導体による腹膜播種性癌転移の抑制

胃癌は日本の癌腫の中では最も頻度の高いものであり、その死因のほとんどは腹膜播種性癌転移である。腹膜播種性癌転移は臓器の漿膜を突き破り腹腔内に浸潤した癌細胞や手術の際に腹腔内にこぼれ落ちた癌細胞が標的組織で増殖することにより成立する。腹膜播種性癌転移治療においては、抗癌剤などの水溶性低分子は腹腔内から全身循環への吸収が速やかであるため奏功し難く、いまだ有効な治療法は開発されていない。catalase を利用した腹腔内癌細胞の接着抑制の報告もあるが、腹腔内での滞留時間が短いこともあり十分な治療効果は得られていない。そこで筆者は、catalase に対しポリエチレングリコール (PEG) 修飾を施すことで分子量を増大させること、あるいは正電荷を持つエチレンジアミン (ED) を結合させ負電荷を有する細胞膜との静電的相互作用により腹腔内滞留性を向上させることによる効果増強を試みた。PEG-catalase および ED-catalase は未修飾の catalase と比較して腹腔内滞留時間が大幅に上昇し、腹膜播種性癌転移を効率的に抑制した。また、さらなる徐放化を実現するために、ゼラチンハイドロゲルを用いたところ腹腔内半減期が約40倍増大し、癌細胞増殖を10分の1以下にまで低下させるとともに顕著な延命効果が得られた。こうした catalase 誘導体による腹膜播種性癌転移に対する効果は、ICAM-1 の発現および matrix metalloproteinases の活性化を抑制することによるものであることが示唆された。

III. 転移巣での癌細胞増殖機構の解明と血中滞留型 catalase 誘導体による抑制

癌細胞を静脈内に投与する直前に血中滞留型 PEG-catalase を静脈内投与することにより、24時間後の肺における癌細胞数は PEG-catalase の投与量依存的に減少した。また、癌細胞が浸潤過程にある投与1日後または増殖過程にある3日後に PEG-catalase を投与した場合にも癌細胞数は生理食塩水投与群と比較して有意に少なく、catalase 誘導体は癌細胞の接着だけではなく浸潤や増殖過程にも影響することが示唆された。そこで、肺転移の完全抑制を目的に PEG-catalase を静脈内に連日投与した結果、癌細胞投与2週間後においても肺表面に転移性の結節は認められず、catalase デリバリーによる tumor dormancy 誘導の可能性が示された。また、癌細胞を皮下に移植する自然転移モデルにおいては、原発巣を切除することにより血中脂質過氧化物濃度が有意に上昇し、切除により活性酸素が産生されることが示された。また、原発巣の切除により肺転移巣で癌細胞が急激に増殖したが、原発巣切除直前に PEG-catalase を単回投与することにより血中脂質過氧化物濃度の上昇は抑制され、切除1週間後での肺転移巣中癌細胞数は生理食塩水処理時の約300分の1にまで減少し、その後の生存日数も有意に延長された。これらのことから、catalase 誘導体は原発巣切除後の微小転移巣での癌細胞増殖を効率的に抑制することが示された。

catalase 誘導体による転移抑制機構の解明を目的に、転写因子 NF- κ B の活性を定量的に評価可能な解析法の開発を試みた。NF- κ B は活性酸素をはじめとする種々の刺激により活性化され、癌転移を促進する様々な分子の発現を亢進することが知られている。NF- κ B の活性化により firefly luciferase を発現する pNF- κ B-Luc と NF- κ B 活性非依存的に renilla luciferase を発現する pRL-SV40 を選択し、両プラスミド DNA を B16-BL6 細胞に導入することで安定発現株を作成した。firefly luciferase と renilla luciferase の発現量の比を指標に NF- κ B 活性を評価したところ、静脈内投与8時間後における肺での癌細胞中 NF- κ B 活性は PEG-catalase の投与量依存的に減少した。また、原発巣切除により肺転移巣中癌細胞 NF- κ B 活性は増加したが、PEG-catalase の投与によりその活性化は有意に抑制された。そこでこの NF- κ B 活性化により発現が亢進し、癌転移を促進する因子の変動を real-time PCR および Western blotting により評価したところ、癌細胞の接着・増殖に関与する ICAM-1, EGFR の発現変動が認められた。以上の結果より、癌転移過程において活性酸素が産生され、それによって NF- κ B が活性化すること、さらには NF- κ B の活性化により癌転移を促進する接着分子や増殖因子の発現が亢進することが示された。また、これらの発現亢進を抑制することが catalase 誘導体の転移抑制機構に深く関与することが示された。

以上、癌転移抑制法の開発に不可欠な癌細胞の体内分布および増殖、さらには癌細胞内の NF- κ B 活性を定量的に解析可能な評価系の開発し、癌転移過程を分離評価することに成功した。また本評価系を用いた癌転移抑制に関する検討から、catalase 誘導体の体内動態を最適化することで癌転移を効率的に抑制することに成功した。

本研究の成果は、癌治療において最も重要な転移抑制法の開発に対して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、癌転移のメカニズムが徐々に明らかとなり、活性酸素が種々の癌転移過程に複雑に関与し多くの癌腫で癌転移を亢進させることから、活性酸素を効率よく消去する catalase や superoxide dismutase などの酵素の癌転移抑制への利用が検討されている。活性酸素消去酵素が十分な癌転移抑制効果を発揮するためには、活性酸素の発生部位への到達が必須であり動態制御を可能とするドラッグデリバリーシステム（DDS）技術の適用が必要不可欠であるが、その開発には、癌細胞の転移における各素過程を組織レベルで分離評価可能な解析法の確立が前提となる。著者は、癌転移の複雑な過程の中から、接着、浸潤及び増殖の各過程の定量的解析を可能とする実験評価系を確立し、catalase 誘導体の体内動態と癌転移抑制効果を評価して、体内動態の最適化による癌転移治療の可能性について検討した。

最初に、マウス由来メラノーマ細胞株 B16-BL6 および結腸癌細胞株 colon26 に luciferase 遺伝子を導入することでレポーター遺伝子安定発現癌細胞株を樹立し、luciferase 活性から癌細胞数を定量的に評価する評価系を創出した。腹膜播種性癌転移治療においてはいまだ有効な治療法は開発されておらず catalase を利用した腹腔内癌細胞の接着抑制の試みも腹腔内での滞留時間が短いこと等により十分な治療効果は得られていない。そこで catalase に対し分子量増大を目的としたポリエチレングリコール（PEG）修飾、あるいは正電荷を持つエチレンジアミン（ED）結合による効果増強を試みた。PEG-catalase および ED-catalase は未修飾の catalase と比較して腹腔内滞留時間の大幅な延長を示し、腹膜播種性癌転移を効率的に抑制した。また、この効果が ICAM-1 の発現および matrix metalloproteinases の活性化の抑制によるものであることが示唆された。次に、血行性転移の抑制を目指して血中滞留型 PEG-catalase の効果を検討し、静脈内に注入された癌細胞の接着だけではなく浸潤や増殖過程に対する抑制を確認した。また、癌細胞を皮下に移植する自然転移モデルにおいては、原発巣の切除により活性酸素が産生され肺転移巣で癌細胞が急激に増殖することを明らかにし、PEG-catalase の単回投与が原発巣切除後の微小転移巣での癌細胞増殖を効率的に抑制することを確認した。さらに、catalase 誘導体による転移抑制の機構解明を目的に、活性酸素をはじめとする種々の刺激により活性化され結果として癌転移促進をもたらす転写因子 NF- κ B の活性を定量的に評価した結果、癌転移過程において活性酸素が産生されそれによって NF- κ B が活性化すること、さらに NF- κ B の活性化により癌転移を促進する接着分子や増殖因子の発現が亢進することが明らかとなり、またこれらの発現亢進を抑制することが catalase 誘導体の転移抑制機構に深く関与することが示された。

以上、著者は癌転移抑制法の開発に不可欠な癌細胞の体内分布および増殖、さらには癌細胞内の NF- κ B 活性を定量的に解析可能な評価系の開発し、癌転移の各過程を分離評価することに成功した。また、本評価系を用い癌転移抑制に関する検討を種々行った結果、catalase 誘導体の体内動態の制御を通じて癌転移を効率的に抑制することに成功した。本研究の成果は、癌治療において最も重要な転移抑制法の開発に対して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）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成19年3月1日論文内容とそれと関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。