

## 論文の内容の要旨

氏名：松 本 高 広

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：ユーイング肉腫ファミリー腫瘍における新規治療薬の開発研究

### [目的]

ユーイング肉腫ファミリー腫瘍 (Ewing's sarcoma family tumor; ESFT) は小児期から青年期に発症する骨軟部組織原発の悪性腫瘍である。転移症例及び2年以内の再発症例は、極めて予後が不良である。従って、ESFT に対して新規抗悪性腫瘍薬の開発が望まれている。また、ESFT の約 90% に *EWS-FLI* 融合遺伝子が特異的に認められ、この融合遺伝子の検出が診断に用いられているばかりでなく、この腫瘍の発症にも関与していることが示唆されている。一方、ヘッジホッグ (Hh) シグナル経路は、細胞の分化、哺乳類の胎生期における臓器の形成など、細胞の分化や組織の形態形成に関与している。この経路の開始は、12回膜貫通タンパク質の *patched* (PTCH) にリガンドである Hh タンパク質が結合することにより、7回膜貫通タンパク質の *smoothend* (SMO) が PTCH の抑制から解除されることから開始される。SMO は下流の転写調節因子である *glioma-associated oncogene* (GLI) を活性化し、活性型 GLI は核内に移行して *GLI1*、*MYCN*、*cyclin D* などの様々な遺伝子の転写活性を促進する。また、Hh シグナル経路の異常は、基底細胞癌、髄芽腫など、いくつかの悪性腫瘍の発生に関わっているとされている。さらに、GLI には Hh シグナル経路を活性化する *GLI1*、*GLI2* と Hh シグナル経路を抑制する *GLI3* の3種類が存在し、*GLI1* は先の *EWS-FLI1* 融合遺伝子により直接転写されることが報告されている。しかし、GLI 阻害薬により細胞増殖の抑制効果があることはわかっているが、その詳しい作用機序は明らかになっていない。本研究では、ESFT に対する GLI 阻害薬の作用機序を明らかにすることにより、ESFT の新たな治療薬開発の基盤を作ることを目的に研究を進めた。

### [実験方法]

#### 1. 本研究で用いた Hh 阻害薬について

Hh シグナル阻害薬として、*cyclopamine*、*GANT61* を用いた。

#### 2. Hh 阻害薬の細胞傷害活性の検索について

ESFT 細胞株 (SCMC-ES1、NCR-EW2、SK-N-LO、SK-N-MC、SK-ES-1) 及び神経芽腫 (NB) 細胞株 (IMR-32、LA-N-1、SK-N-SH、NB39) に *cyclopamine* 及び *GANT61* を 48 時間させた後、3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay を行い、細胞傷害活性の検索を行った。

#### 3. Hoechst 33342 染色による細胞および核の形態変化の検索について

*GANT61* に対して最も効果のあった SK-N-LO 細胞株を用いて、*DMSO*、*CDDP*、*GANT61* (10、30、100 $\mu$ M) を各々 48 時間作用させ、核の形態変化を Hoechst 33342 染色して、位相差顕微鏡と蛍光顕微鏡により観察した。

#### 4. GANT61 による初期アポトーシス誘導効果の検索について

初期アポトーシスの細胞形態学的特徴である膜の反転化および透過性を検出するため、SK-N-LO 細胞株に *GANT61* (1、3、10、30 $\mu$ M) を作用させ、*Annexin V-Propidium Iodide* (PI) 染色して、*flow cytometry* により測定を行った。

#### 5. Proteome Profiler Array によるアポトーシス関連タンパク質の変動解析について

SK-N-LO 細胞株に *GANT61* (30 $\mu$ M) を 48 時間作用させた後、*Proteome Profiler Array* を用いてアポトーシス関連タンパク質の発現量の変動について網羅的解析を行った。

#### 6. GANT61 が細胞周期に及ぼす影響について

*GANT61* が細胞周期に及ぼす影響を検索するために SK-N-LO 細胞株に *GANT61* (30 $\mu$ M) を 48 時間させた後、PI により DNA を染色し、*G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>* 期、*S* 期、*G<sub>2</sub>/M* 期にある細胞の割合を *flow cytometry* により測定を行った。

## 7. Western blot 法による関連タンパク質の経時的変動の解析について

Hh シグナル関連タンパク質、アポトーシス関連タンパク質、細胞周期関連タンパク質の発現量の経時的変化を確認するために、SK-N-LO 細胞株に GANT61 (30  $\mu$ M) を 48 時間作用させ、Western blot 法により解析を行った。

### [結果]

#### 1. Hh 阻害薬の細胞傷害活性について

表 1 に MTT assay の結果を示した。GANT61 は濃度依存的に ESFT に対して細胞死を誘導し、特に 3 種類の細胞株 (SK-N-LO、SK-N-MC、NCR-EW2) で感受性が高かった ( $IC_{50}$  はそれぞれ、14.5  $\mu$ M、18.3  $\mu$ M、18.1  $\mu$ M)。また、これらはいずれも *EWS-FLI* 融合遺伝子を発現している細胞であった。一方、*EWS-ERG* 融合遺伝子を発現している細胞株 (SCMC-ES1) においては、GANT61 に対する感受性は低かった。また、cyclopamine は ESFT 細胞に対して細胞傷害活性を示さなかった。SK-N-LO、SK-N-MC は未分化神経外胚葉性腫瘍 (primitive neuroectodermal tumor; PENT) に分類され、NB と同様に小円形細胞腫瘍群に属し、NB に分類されている報告もあることから、NB 細胞についても同様に Hh シグナル阻害薬 (cyclopamine、GANT61) の細胞傷害活性を調べたが、細胞傷害活性が 100  $\mu$ M 以上か、細胞傷害活性は認められても ESFT 細胞株よりも感受性は低かった。

表 1 Hh シグナル阻害薬の ESFT および NB に対する細胞傷害活性 ( $IC_{50}$  値)

Compounds	Cytotoxicity $IC_{50}$ ( $\mu$ M)								
	ESFT cell lines					NB cell lines			
	SCMC-ES1	NCR-EW2	SK-ES-1	SK-N-LO	SK-N-MC	LA-N-1	IMR-32	NB-39	SK-N-SH
Cyclopamine	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	66.7
GANT61	66.7	18.1	>100	14.5	18.3	60.0	35.1	>100	48.1

#### 2. Hoechst 33342 染色による細胞および核の形態変化について

Hoechst 33342 染色により、GANT61 作用後の SK-N-LO 細胞株における核の形態変化を見ると、30  $\mu$ M 投与群においてアポトーシスの形態学的特徴である核の凝集及び断片化が顕著に観察された。

#### 3. GANT61 による初期アポトーシス誘導効果について

Flow cytometry による解析の結果、1 ~ 10  $\mu$ M で初期アポトーシス細胞数が増加傾向を示した。また、30  $\mu$ M ではコントロールに比べて初期アポトーシス細胞数は有意に減少し、後期アポトーシスおよびネクローシス細胞数が有意に増加した。

#### 4. Proteome Profiler Array によるアポトーシス関連タンパク質の変動解析について

Proteome Profiler Array の結果、survivin および claspin タンパク質の顕著な発現減少 (43.0%、61.3%) と p21 タンパク質の顕著な発現増加 (67.8%) が認められた。

#### 5. GANT61 が細胞周期に及ぼす影響について

GANT61 が SK-N-LO 細胞株の細胞周期に与える影響について検索を行った。その結果、S 期における細胞比率が有意に減少した。G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期および G<sub>2</sub>/M 期の細胞比率に変化は認められなかった (図 4B、4D)。また、subG<sub>1</sub> 期の細胞数は増加傾向が認められた。以上の結果から、GANT61 は G<sub>1</sub> から S 期にかけて細胞周期の停止を起こしていることが示唆された。

## 6. Western blot 法による関連タンパク質の経時的変動の解析について

GANT61 作用後の各タンパク質の経時的变化を図 1A ~ C に示す。まず、Hh シグナル関連タンパク質では GLI2 が 48 時間後に有意な発現量の減少が認められたが、GLI1 については明らかな変化は認められなかった。また、その他の Hh シグナル関連タンパク質 (SMO、PTCH、Shh) についても変化は認められなかった。アポトーシス関連タンパク質では、p21 が 8 ~ 48 時間後に有意な発現量の増加が認められた。また、survivin は 48 時間後に有意な発現量の減少が認められ、claspin は 24 ~ 48 時間後に有意な発現量の減少が認められた。poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) は pro-PARP の発現量に変化が認められなかったが、切断型 PARP (cleaved-PARP、24 kDa) が 24 ~ 48 時間後で有意な発現量の増加が認められた。一方、caspase 3、cleaved-caspase 3、caspase 7、cleaved-caspase 7、Bcl-2、p53 については、発現量に変化は認められなかった。さらに、細胞周期関連タンパク質について検討したところ、cyclin A は 24 ~ 48 時間後に有意な発現量の減少が認められたが、cyclin E は変化が認められなかった。

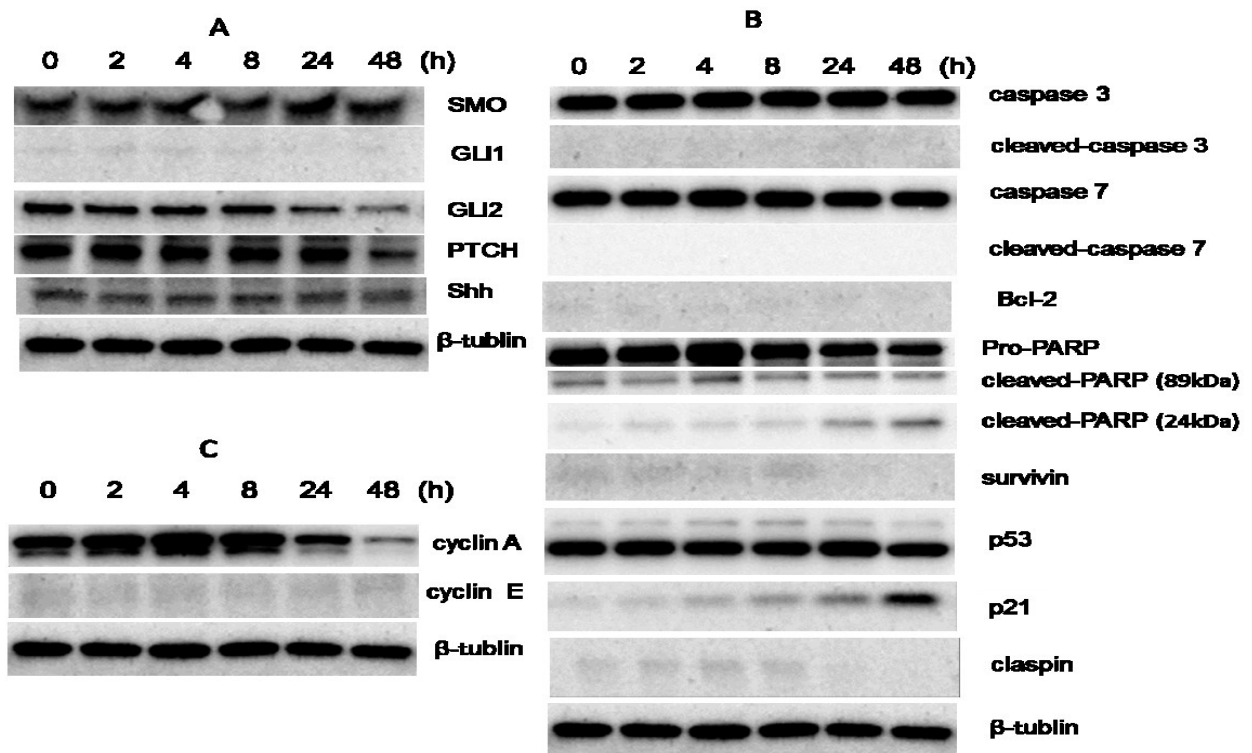


図 1 GNAT61 による関連タンパク質の経時的变化

SK-N-LO 細胞株に対して GANT61 30  $\mu$ M を 0 ~ 48 時間で作用させ、Western blot 法によりタンパク質発現の経時的变化を検索した。A: Hh シグナル関連タンパク質、B: アポトーシス関連タンパク質、C: 細胞周期関連タンパク

### [考察]

本研究では、GLI 阻害薬である GANT61 が ESFT に対して濃度依存的に細胞傷害活性を有することがわかった。また、SMO 阻害薬である cyclopamine は ESFT に対して効果を示さなかった。これらのことから、ESFT の細胞死には Hh シグナル経路の下流にある GLI が作用していることが示唆された。さらに、ESFT の中でも *EWS-FLI1* 融合遺伝子を発現している細胞株は GANT61 に対して感受性が高く、最も感受性の高かった SK-N-LO 細胞株は NB 様の小円形細胞腫瘍群に属し、脳原発の ESFT であった。細胞核の形態変化および flow cytometry による結果から、GANT61 は SK-N-LO 細胞株をアポトーシスへ誘導することが示された。また、抗アポトーシス関連タンパク質である survivin の発現量減少、DNA 修復や細胞死、分化制御に関与する PARP の切断 (cleaved-

PARP) が認められたことから裏付けられた。しかし、cleaved-caspase 3、7 の発現量に変化を認められなかったことから、その作用メカニズムには caspase が関与していないこともわかった。さらに、GANT61 は GLI2 の発現量を減少させ、p21 の発現量を有意に増加させた。骨肉腫や卵巣癌において、GLI2 の阻害により p21 の発現上昇が報告されていることから、GANT61 による GLI2 阻害作用による影響と考えられた。また、S 期における細胞比率が減少したが、cyclin A の発現量も減少していた。Cyclin A は G<sub>1</sub> から S 期への移行および S 期における DNA 修復に関与しているため、p21 の発現増加により cyclin A が抑制され、その結果、S 期における細胞周期の停止に至ったものと考えられた。S 期における DNA 修復のチェックポイント機構の mediator である claspin の発現量も減少していた。大腸癌、骨肉腫、肺癌において、cyclin A と claspin の発現に相関性が認められていることから、cyclin A の抑制に伴い claspin の発現も減少したものと考えられた。DNA 修復阻害に関与する PARP の N 末端側の切断フラグメント (cleaved-PARP) の出現から、S 期における DNA 修復阻害による細胞死誘導作用も示唆された。しかし、GANT61 が survivin および PARP の切断に至ったメカニズムは明らかにできなかった。

#### [総括]

本研究により、以下のことが明らかになった。

1. GANT61 は *EWS-FLI* 融合遺伝子を持ち、NB 様の小円形細胞腫瘍群で、脳を原発とする ESFT に対して強い細胞傷害活性を示した。特に SK-N-LO 細胞株には最も強い細胞傷害活性が認められた。
2. GANT61 は、SK-N-LO 細胞株に対してアポトーシスによる細胞死を誘導した。また、抗アポトーシス関連タンパク質の survivin 発現量の低下を示したが、caspase 3、7、Bcl-2 発現量の変化がないことから、caspase 非依存的な経路でアポトーシスが起きていることが示唆された。
3. GANT61 は GLI2 阻害作用により p21 発現を亢進させ、cyclin A の発現を阻害して、claspin の発現低下や切断型 PARP (cleaved-PARP) の発現増加を伴った結果、G<sub>1</sub> から S 期への移行及び DNA の修復が阻害されて、不可逆的な細胞周期停止が起こり、アポトーシス誘導に至ることが考えられた。

以上のことから、GANT61 に代表される GLI 阻害薬は、ESFT の新規治療薬開発のための重要な化合物となり得ることがわかった。