

学位論文

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

日本大学大学院薬学研究科博士後期課程

臨床医学研究室

松本 高広

目次

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | 序論 | 1 |
| 2 | 実験材料及び実験方法 | |
| 2.1 | 本研究に用いた試薬 | 5 |
| 2.2 | 本研究に用いた細胞培養 | 5 |
| 2.3 | Hh 阻害薬の細胞傷害活性の評価 | 6 |
| 2.4 | Hoechst 33342 染色による細胞及び核の形態変化の観察 | 6 |
| 2.5 | GANT61 による初期アポトーシス誘導効果の検索 | 7 |
| 2.6 | Proteome profiler array によるアポトーシス関連タンパク質の変動解析 | 7 |
| 2.7 | GANT61 が細胞周期に及ぼす影響 | 8 |
| 2.8 | Western blot 法による関連タンパク質の経時的変動の解析 | 8 |
| 2.9 | 統計学的解析 | 10 |
| 3 | 結果 | |
| 3.1 | Hh 阻害薬の細胞傷害活性について | 11 |
| 3.2 | Hoechst 33342 染色による細胞及び核の形態変化について | 15 |
| 3.3 | GANT61 による初期アポトーシス誘導効果について | 16 |
| 3.4 | 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 | 17 |
| 3.5 | GANT61 が細胞周期に及ぼす影響について | 19 |
| 3.6 | 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 | 20 |
| 4 | 考察 | 27 |
| 5 | 総括 | 30 |
| 6 | 引用文献 | 31 |
| 7 | 謝辞 | 34 |

1. 序論

ユーイング肉腫ファミリー腫瘍 (Ewing's sarcoma family tumor; ESFT) は、ユーイング肉腫 (Ewing's sarcoma; ES)、未分化外胚葉腫瘍 (primitive neuroectodermal tumor; PNET)、Askin 腫瘍 (胸壁に原発する PNET) を総称したものである。ESFT は骨・軟部組織原発の悪性腫瘍で、神経芽腫や横紋筋肉腫と同じく小円形細胞腫瘍の一種である¹⁾。発症は小児期から青年期に多く、発生年齢は 10~20 歳に全体の約半数が集中しており、その中央値は 15 歳である¹⁾。また、腫瘍が原発部位または所属リンパ節病変を越えて広がっていないと判断されるとき、その腫瘍を限局性であると定義している¹⁾。主な発生部位は、四肢 (大腿骨、上腕骨、腓骨、脛骨など) が 41%、次いで骨盤 (25%)、肋骨 (12%) となっている²⁾。予後不良因子は、転移、15 歳以上の発症、2 年以内の再発、体幹の発症、腫瘍体積が 100 mL 以上などである³⁾。また、限局性 ESFT では、局所治療として切除可能な部位であれば、広範手術が第一選択として推奨されているが、ESFT は放射線に感受性が高いため、切除不能症例や非根治術後例には放射線照射を行う場合もある³⁾。ESFT に対して有効性が高い薬剤として、ビンクリスチン (VCR)、ドキソルビシン (DXR)、シクロホスファミド (CPA)、アクチノマイシン (ACD)、イホスファミド (IFM)、エトポシド (VP-16) がある。限局性 ESFT では、このうち 4~6 種類を組み合わせた多剤併用療法が推奨されている³⁾。米国で行われたランダム化比較試験 (NCI 研究 INT 0091 試験)⁴⁾において、VCR+DXR+CPA 併用療法 (VDC 療法)、IFM+VP-16 併用療法 (IE) の交替療法が、VDC 単独療法に比べて 5 年無病生存率 (DFS) 69% と有意に成績が良く、有効性が確認された。しかし、遠隔転移例では DFS が 22% に留まり、VDC+IE 交替療法と VDC 単独療法との間にも有意差は認められなかった。また、再発例においては、自家造血幹細胞移植療法やカルボプラチン (CBDCA) を含む治療法等も試みられているが、3 年生存率が 4% と極めて予後が不良である¹⁾。現在、転移性 ESFT 及び再発例における有効な化学療法は確立されておらず、新たな新規抗悪性腫瘍薬の開発が強く望まれている。

最近の細胞遺伝学的研究において、ESFT では第 22 番染色体の q12 にある *EWS* 遺伝子の変異が同定されている。ESFT で認められる主な染色体転座及びキメラ遺伝子について表 1 に示す⁵⁾。*EWS* タンパク質のアミノ基末端は、他のタンパク質のカルボキシル基末端に接しており、ESFT の約 90% では、こうしたカル

ボキシル基末端は *ETS* ファミリー転写因子遺伝子のひとつであり、第 11 番染色体の q24 に位置する *FLII* 遺伝子にコードされたタンパク質に置き換わっている。*EWS* 遺伝子と結合する他の *ETS* ファミリーメンバーには、第 21 番染色体に位置する *ERG*、第 7 番染色体に位置する *ETVI* などがある。これらの遺伝子異常は、ESFT の発症に深く関与しており、現在、ESFT の確定診断に有効な方法として検索が行われている。

表 1 ESFT で認められる主な染色体異常・キメラ遺伝子とその出現頻度

| 染色体転座 | キメラ遺伝子 | 出現頻度 (%) |
|---------------------------|-----------------|----------|
| <i>t</i> (11;22)(q24;q12) | <i>EWS-FLI</i> | 90 |
| <i>t</i> (21;22)(q22;q12) | <i>EWS-ERG</i> | 5 |
| <i>t</i> (7;22)(p22;q12) | <i>EWS-ETVI</i> | <1 |

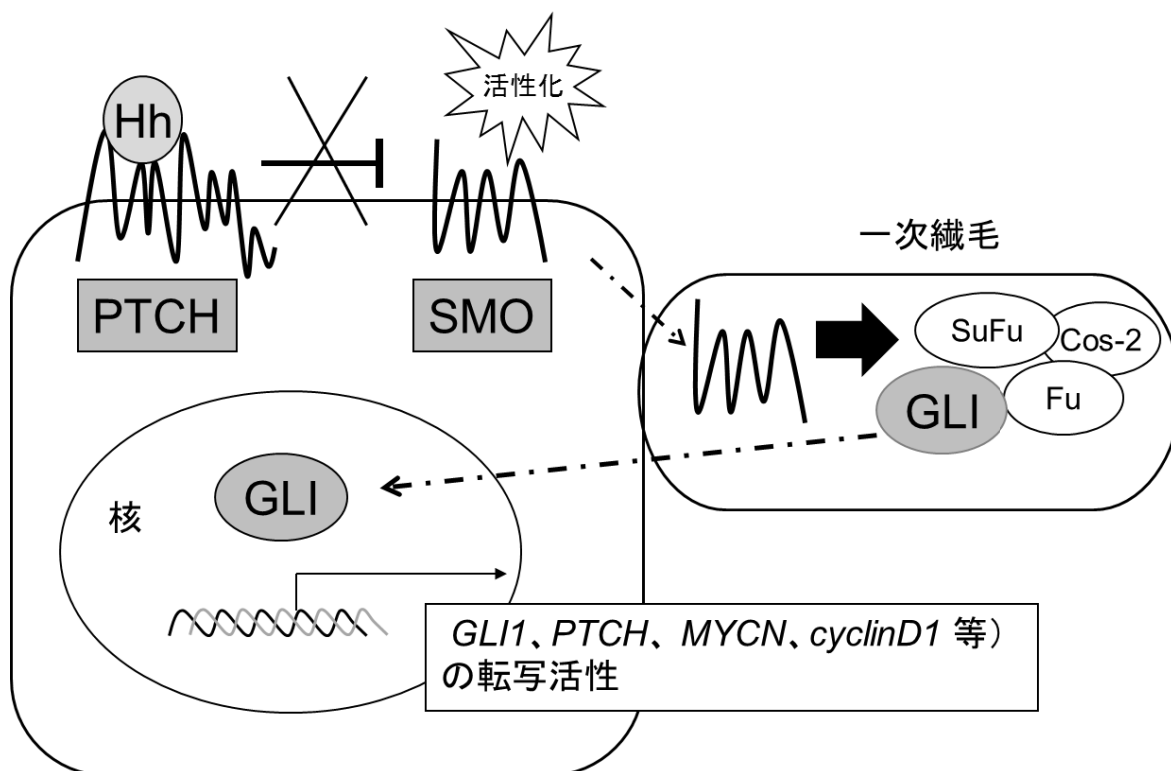
一方、ヘッジホッグ (Hh) は、ショウジョウバエの形態形成に関与する遺伝子として同定され、哺乳類では 3 種類の Hh タンパク質 (Desert hedgehog; Dhh, Indian hedgehog; Ihh, Sonic hedgehog; Shh) の存在が知られている。また、Hh シグナル伝達経路は、胎生期における臓器の形成、細胞の分化など、組織中の形態形成に関与しているといわれている。表 2 に各 Hh タンパク質の組織形成について示す⁶⁾。

表 2 Hh タンパク質の種類について

| Hh タンパク質 | 形成に関与する主な組織 |
|----------|--|
| Dhh | 性腺、外性器、末梢神経 |
| Ihh | 軟骨、血管内皮細胞 |
| Shh | 血管新生の誘導や小脳、神経、神経堤、眼、造血幹細胞、心臓、四肢、肺、軟骨、筋肉、腸管 |

Hh シグナル伝達経路の活性化機構について説明すると⁷⁾、分泌細胞内で合成された Hh は自己分解 (auto-processing) し、N 末端でパルミトイル修飾を受け C 末端でコレステロール修飾を受けた結果、細胞外に分泌される。Hh 非存在下では、受容細胞表面の一次繊毛に局在する 12 回膜貫通タンパク質の *patched* (PTCH) が、7 回膜貫通タンパク質の *smoothend* (SMO) と複合体を形成し、SMO 活性を抑制

している。この抑制機構は、SMO が細胞膜にある一次繊毛に局在化することを阻止するものである。図 1 に示す様に、リガンドである Hh タンパク質が PTCH に結合すると、SMO が PTCH の抑制から解除されて一次繊毛に移動する。SMO は、微小管上で複合体を形成している kinesin-like protein costal-2 (COS-2)、serine/threonine kinase fused (Fu)、suppressor of fused (SuFu)、glioma-associated oncogene (GLI) から下流の転写調節因子である GLI を遊離させる。GLI は zinc finger タンパク質であり、哺乳類では GLI1、GLI2、GLI3 の 3 種類が存在する。GLI1 及び GLI2 は活性型 GLI として核内に移行し、*GLI1*、*MYCN*、*cyclin D* などの標的遺伝子の転写活性を促進し、胚発生・造血幹細胞・神経幹細胞の増殖や分化に関与する。一方、GLI3 は repressor として核内に移行し、GLI1、GLI2 の転写を抑制する。



On-state

図 1 Hh シグナル伝達経路の活性化 (On-state) 機構

この 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^{8,9)}。基底細胞癌においては、*PTCH* あるいは *SMO* 遺伝子の 40 ~ 60% に変異 (点突然変異など) が認められている。また、髄芽腫においては、*PTCH* あるいは *SuFu* 遺伝子の 20% に変異 (点突然変異など) が認められている。

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¹⁰⁻¹²⁾。さらに、*GLI* 阻害薬の *GANT58* は、*ESFT* 細胞株に対して濃度依存的に増殖抑制効果が認められている¹²⁾。しかし、*GLI* 阻害薬による *ESFT* に対するその詳しい作用機序については明らかにされていない。そこで本研究では、*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。

2. 実験材料及び実験方法

2.1. 本研究に用いた試薬

2 種類の Hh シグナル阻害薬 cyclopamine (Wako)、GANT61 (Wako) を用いた。その構造式を図 2 に示す。それぞれ原末を DMSO で希釈し、50 mM のストック液を調製し、ストック液を段階希釈したものを実験に用いた。

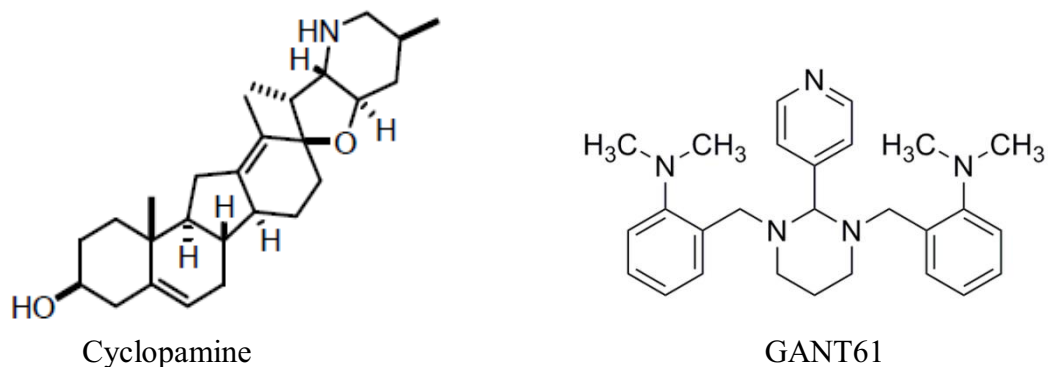


図 2 本研究に用いた Hh シグナル阻害薬の化学構造式

2.2. 本研究に用いた細胞培養

本研究に用いた細胞及び培養条件を以下に示す。

① ESFT 細胞株

- ・ SCMC-ES1 細胞株 (群馬小児医療センター 林泰秀先生より供与)
- ・ SK-N-LO 細胞株 (群馬小児医療センター 林泰秀先生より供与)
- ・ SK-N-MC 細胞株 (群馬小児医療センター 林泰秀先生より供与)
- ・ SK-ES-1 細胞株 (群馬小児医療センター 林泰秀先生より供与)
- ・ NCR-EW2 細胞株 (慶応義塾大学病院病理 秦順一名誉教授より供与)

② 神経芽腫 (NB) 細胞株

- ・ IMR-32 細胞株 (RIKEN cell bank より購入)
- ・ LA-N-1 細胞株 (RIKEN cell bank より購入)
- ・ SK-N-SH 細胞株 (RIKEN cell bank より購入)
- ・ NB39 細胞株 (福島県立医科大学 鈴木敏光教授より供与)

細胞株 (SK-ES-1 細胞株を除く) は、RPMI 1640 培地 (Invitrogen) に 10% fetal bovine serum (FBS、HyClone) 及び penicillin (100 U/mL) / streptomycin (0.1 mg/mL) を加えた溶液で培養した。SK-ES-1 細胞株 は、McCoy's 5a 培地 (Invitrogen) に 15% FBS 及び penicillin (100 U/mL) / streptomycin (0.1 mg/mL) を加えた溶液で培養した。尚、FBS は補体を失活させるため 56°C、30 min の加熱処理を行い、非動化を行ったものを使用した。細胞の培養は CO₂ インキュベーター (MCO-34AI、SANYO) にて、37°C、5% CO₂、飽湿条件下で行った。また、細胞培養の操作は、クリーンベンチ (Bio Clean Bench MCV-B91F、SANYO) 内で行った。

2.3. Hh 阻害薬の細胞傷害活性の評価

ESFT 細胞株 (SCMC-ES1、NCR-EW2、SK-N-LO、SK-N-MC、SK-ES-1) 及び NB 細胞株 (IMR-32、LA-N-1、SK-N-SH、NB39) を 1×10^4 cells /well となるように 96 well plate に播種し、37°C、5% CO₂、飽湿条件下で 24 h 培養した。次に、cyclopamine 及び GANT61 (終濃度 1、3、10、30、100 μ M)、vehicle として DMSO を細胞液中に 0.2 μ L/well 添加し、同条件下で 48 h 反応させた。これに 0.5% 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 溶液を 10 μ L/well 添加し、同条件下で 3 h 反応させた。反応停止液 (0.04 N HCl/isopropanol 溶液) を 100 μ L/well 添加後、細胞液中に含まれるホルマザンが完全に溶解するまでピペッティングを行い、microplatereader (Model 3550、BIO RAD) を用いて 570 nm (peak)、655 nm (trough) における吸光度を計測し、その差を測定値とした。細胞の生存率は、vehicle を control として、control に対する百分率 (%) とした。

2.4. Hoechst 33342 染色による細胞及び核の形態変化の観察

SK-N-LO 細胞株を 2×10^5 cells/well となるように 6 well plate に播種し、37°C、5% CO₂、飽湿条件下で 24 h 培養した。次に、GANT61 (終濃度 10、30、100 μ M)、vehicle として DMSO、positive control として cis-diamminedichloro-platinum (cisplatin; CDDP、終濃度 30 μ M) を細胞液中に 4 μ L/well 添加し、同条件下で 48 h 反応させた。その後、終濃度が 0.001% となるように Hoechst 33342 溶液を添加し、37°C、5% CO₂、飽湿条件下で 15 min 反応させた後、倒立型リサーチ顕微鏡 (IX71、Olympus) にて位相差像及び蛍光像を撮影した。

2.5. GANT61 による初期アポトーシス誘導効果の検索

初期アポトーシスの形態学的特徴である細胞膜の反転化を検出するために、Alexia Flour[®] 488 Annexin V/Dead Cell apoptosis kit (Invitrogen) を用いた。SK-N-LO 細胞株を 1×10^6 cells/well となるように 6 well plate に播種し、37°C、5% CO₂、飽湿条件下で 24 h 培養した。GANT61 (終濃度 1、3、10、30 μM)、vehicle として DMSO を作用させた後、細胞液中に 4 μL/well 添加し、同条件下で 48 h 反応させた。細胞液を回収し、1,500 rpm、5 min、4°C で遠心分離を行い、その上清を吸引除去し、沈殿細胞に氷冷した PBS 1 mL を加えた後、再び 1,500 rpm、5 min、4°C で遠心分離を行った。上清を吸引除去し、沈殿細胞に annexin-binding buffer 500 μL を加えて懸濁し、これを 100 μL 分取し、Alexa Fluor[®] 488 Annexin V を 5 μL、propidium iodide (PI) を 1 μL 加えて室温で 15 min 作用させた。再び annexin-binding buffer 400 μL を 40 μm ナイロンメッシュを通して加えてサンプルとし、flow cytometer (FC 500、Beckman Coulter) により解析した。

2.6. Proteome profiler array によるアポトーシス関連タンパク質の変動解析

アポトーシス関連タンパク質の発現量の変動について Proteome profiler array (R&D Systems) を用いて網羅的解析を行った。SK-N-LO 細胞株を 2×10^6 cells/ 5 mL/dish となるように、1 サンプルあたり 3 dishes を 60 mm cell culture dishes (Corning) に播種し、37°C、5% CO₂、飽湿条件下で 24 h 培養した。次に、GANT61 (終濃度 30 μM) 及び vehicle として DMSO を各々 10 μL 添加して、同条件下で 48 h 反応させた。細胞を回収し、1,500 rpm、5 min、4°C で 2 回遠心分離を行った後、沈殿細胞を lysis buffer 17 (# 895943 R&D) で溶解してタンパク質定量を行い、タンパク質が 500 μg/250 μL となるように希釈した。希釈したサンプルを array に添加後、4°C、overnight でインキュベートした。Wash buffer (# 895003 R&D) で 3 回 array を洗浄後、一次抗体 (human apoptosis detection antibody cocktail 100 倍希釈 # 893333 R&D) を添加し、1 h 反応させた。再度 wash buffer で 3 回洗浄後、二次抗体 (Streptavidin-HRP 2000 倍希釈 #890803 R&D) を array に添加し、30 min インキュベートした。Wash buffer で 3 回洗浄後、enhanced chemiluminescence (ECL) system (GE Healthcare) を用いて 1 min 反応させ、lumino image analyzer (LAS-1000、Fuji Film) で化学発光によりブロットの検出を行った。各ブロットの発現量は NIH Image-J software で解析した。

2.7. GANT61 が細胞周期に及ぼす影響

SK-N-LO 細胞株を 1×10^6 cells/well となるように 6 well plate に播種し、37°C、5% CO₂、飽湿条件下で 24 h 培養した。GANT61 (終濃度 30 μ M)、vehicle として DMSO を作用させた後、細胞液中に 4 μ L/well 添加し、37°C、5% CO₂、飽湿条件下で 48 h 反応させた。細胞液を回収し、1,500 rpm、5 min、4°C で遠心分離を行い、その上清を吸引除去し、沈殿細胞に氷冷した PBS 1 mL を加え、1,500 rpm、5 min、4°C で 2 回遠心分離を行った。上清を吸引除去し、沈殿細胞に 70% EtOH 10 mL を攪拌しながら添加し、氷冷下にて 2 h 放置し固定した。1,500 rpm、5 min、4°C で遠心分離した後、上清を吸引除去し、沈殿細胞に氷冷した PBS 1 mL を加え、1,500rpm、5 min、4°C で 2 回遠心分離した。上清を吸引除去した後、RNase (0.25 mg/mL) を用いて細胞の RNA を分解した。37°C の恒温槽にて 30 min 放置した後、終濃度が 50 μ g/mL となるように PI を添加し、細胞の DNA を染色した。30 min 冷暗所に静置し、細胞液 1 mL を 40 μ m ナイロンメッシュを通して加えてサンプルとし、flow cytometer により PI の蛍光量を FL3 range (620 nm BP) にて測定した。

2.8. Western blot 法による関連タンパク質の経時的変動の解析

1) 細胞溶解液 (Lysate) の調製

SK-N-LO 細胞株を 2×10^6 cells/ 5 mL/ dish となるように、60 mm cell culture dish に播種した。GANT61 (終濃度 30 μ M) を添加し、37°C、5% CO₂、飽湿条件下でインキュベートしながら、添加後 0 h、2 h、4 h、8 h、24 h、48 h の各時間作用させた細胞を回収して氷冷した。回収した細胞はそれぞれ 2,000 rpm、5 min、4°C で遠心分離し、Tris-buffered saline [TBS; 20 mM Tris-HCL (pH 7.6)、137 mM NaCl] で懸濁させて洗浄した。再び 5,000 rpm、5 min、4°C で遠心分離した後、lysis buffer [20 mM Tris-HCL (pH 8.0)、137 mM NaCl、1% Nonidet P-40、10% glycerol、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、protease inhibitor cocktail I (1:200、Sigma-Aldrich)、phosphatase inhibitor cocktail II (1:100、Sigma-Aldrich)、1 mM dithiothreitol] で溶解した。

2) タンパク質定量

上記のサンプルを超音波処理 (30 sec \times 2 回) にて細胞を破碎した後、15,000 rpm、0°C、10 min で不溶物を沈殿させ、上清をタンパク質抽出液とした。各

サンプルの含量タンパク質濃度を Protein Assay Rapid Kit (Wako) を用いて算出し、タンパク質量が 7.5 $\mu\text{g}/7.5 \mu\text{L}$ となるように lysis buffer で希釈し、sample buffer [0.24 M Tris-HCL (pH 6.8)、312 mM SDS、30% glycerol、15% 2-mercaptoethanol、1% bromophenol blue] を加えて、泳動用サンプルとした。

3) Western blotting

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) によりサンプル中のタンパク質の分離を行った。電気泳動用ゲルは市販品 (E-R 12.5% e-PAGEL、ATTO) を用いた。サンプルを 100°C、3 min で加熱して SDS 化 (タンパク質の立体構造を破壊し、さらに陰性に荷電させる) した後、15,000 rpm、0°C、1 min で遠心分離し、その上清を running buffer (24 mM Tris、190 mM glycine、3.47 mM SDS) に浸したゲルの各レーンに 7.5 μL 添加し、電圧 150 V、室温下、約 1.5 h 電気泳動を行った。その後、transfer buffer (24.1 mM Tris、191.8 mM glycine、20% MeOH) で満たした転写装置の中でよく攪拌しながら、100 V、3 h、氷冷下にて polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (GE Healthcare) に転写し、メンブレン上にタンパク質を固定した。転写終了後、メンブレンを TBS で洗浄し、blocking solution [0.5% skim milk in TTBS (TBS、0.1% Tween 20)] 30 mL を用いて室温下、1 h ブロッキングを行った。メンブレンを TTBS で 3 回洗浄後、一次抗体を加えて振盪しながら 4°C で一晩反応させた。

【使用した一次抗体】

一次抗体は次のものを用いた。rabbit anti-p21 (1:200)、goat anti-PTCH (1:200)、rabbit anti-SMO (1:200)、goat anti-SHH (1:200)、rabbit anti-cyclin A (1:200) (Santa Cruz)、rabbit anti-Survivin (1:1000)、rabbit anti-claspin (1:1000)、mouse anti-GLI1 (1:1000)、rabbit anti-caspase 3 (1:1000)、rabbit anti-cleaved caspase 3 (1:1000)、mouse anti-caspase 7 (1:1000)、rabbit anti-Bcl-2 (1:1000) (Cell Signaling Technology)、rabbit anti-GLI2 (1:800) (abcam)、mouse anti-p53 (1:200)、mouse anti-poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) (1:1000)、mouse anti-cyclin E (1:250) (BD Biosciences)、mouse anti- β -tubulin (1:10000) (Sigma-Aldrich)

一次抗体を回収後、TTBS による洗浄を 4 回行った後、HRP で標識された二次抗体 (0.5% skim milk in TTBS で 10,000 倍希釈) を振盪しながら、室温下、1 h で反応させた。その後、TTBS で 4 回、TBS で 4 回洗浄し、暗所にて ECL 液で 1 min 反応させ、lumino image analyzer (LAS-1000) で化学発光によりバン

ドを検出した。バンド密度の解析は、NIH Image-J software で行った。

2.9 統計学的解析

MTT assay、flow cytometry は、3 枚の plate を用いて得られた実験データの平均値を GraphPad Prism (version 5.04) を用いて one-way ANOVA により分散分析を行った後、Bonferroni 法により vehicle に対する有意差検定を行った。Western blot 法は、3 個のサンプルを用いて得られた実験データの平均値を GraphPad Prism (version 5.04) を用いて one-way ANOVA により分散分析を行った後、Bonferroni 法により 0 h に対する各作用時間の値で有意差検定を行った。 p 値は 0.05 以下を有意差ありと判定した。

3. 結果

3.1. Hh 阻害薬の細胞傷害活性について

表 3 に本実験で用いた ESFT 細胞株及びその細胞学的特徴を示した¹³⁻¹⁵⁾。細胞生物学的に、SCMC-ES1、NCR-EW2、SK-ES-1 は ES に分類され、SK-N-LO、SK-N-MC は PENT に分類される。また、SCMC-ES1 を除く全ての細胞に *EWS-FLII* 融合遺伝子の発現が認められている。発生起源は ES の 3 種類が骨盤を含めた骨で、PNET の 2 種類はいずれも脳であった。また、表 4 に細胞傷害活性について IC₅₀ (50% 細胞阻害濃度) 値を示した。さらに、図 3~6 に ESFT 細胞株及び NB 細胞株に対する Hh 阻害薬 (cyclopamine、GANT61) の細胞傷害活性について示した。まず、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) で感受性が高く、IC₅₀ はそれぞれ、14.5 μ M、18.3 μ M、18.1 μ M であった (図 4、表 4)。また、これらの細胞株はいずれも *EWS-FLI* 融合遺伝子を発現している細胞であった (表 3)。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 (表 4)。また、cyclopamine は ESFT 細胞に対して細胞傷害活性を示さなかった (図 3、表 4)。GANT61 の感受性が高かった SK-N-LO、SK-N-MC は NB 細胞の形態学的特徴である小円形細胞腫瘍であることに加え、NB に分類されている報告もあることから¹⁶⁾、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 μ 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 (図 5、6、表 4)。以上の結果から、GANT61 に最も感受性の高かった SK-N-LO 細胞株を用いて以後の実験を行うことにした。

表 3 ESFT 細胞株の細胞学的特徴

| Cell lines | Cell types | Chimeric genes | Origins |
|------------|-----------------------|--|---------|
| SCMC-ES1 | Ewing's sarcoma | <i>EWS</i> (exon 7) - <i>ERG</i> (exon 6) | Bone |
| NCR-EW2 | Ewing's sarcoma | <i>EWS</i> (exon 7) - <i>FLI1</i> (exon 5) | Pelvis |
| SK-ES-1 | Ewing's sarcoma | <i>EWS</i> (exon 7) - <i>FLI1</i> (exon 5) | Bone |
| SK-N-LO | *PNET | <i>EWS</i> (exon 7) - <i>FLI1</i> (exon 6) | Brain |
| SK-N-MC | PNET Askin's tumor | <i>EWS</i> (exon 7) - <i>FLI1</i> (exon 6) | Brain |

* PNET; primitive neuroectodermal tumor

表 4 Hh シグナル阻害薬の ESFT 及び NB 細胞株に対する細胞傷害活性 (IC₅₀ 値)

| Compounds | Cytotoxicity IC ₅₀ (μM) | | | | | | | | |
|-------------|------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------------|--------|-------|---------|
| | 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 |

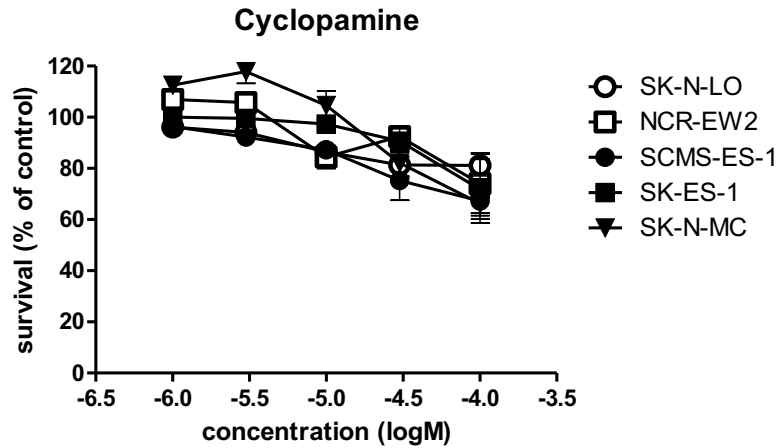


図 3 Cyclopamine における ESFT 細胞株に対する細胞傷害活性

SK-N-LO (○)、NCR-EW2 (□)、SCMC-ES-1 (●)、SK-ES-1 (■)、SK-N-MC (▼) に対する cyclopamine の細胞傷害活性を MTT assay により検索した。Cyclopamine は 48 h 作用させた。Vehicle (DMSO) を control として用いた。縦軸は control に対する細胞の生存率を、横軸は cyclopamine 濃度 ($1 \times 10^{-6} \sim 10^{-4}$ M) を示す (mean \pm SEM: n = 3)。

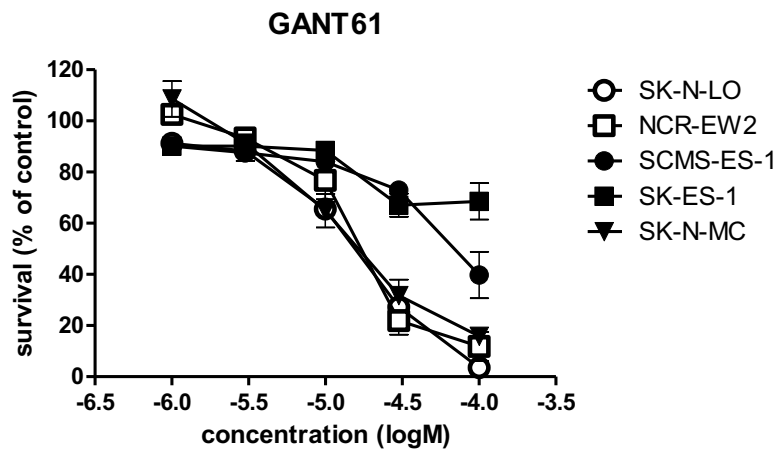


図 4 GANT61 における ESFT 細胞株に対する細胞傷害活性

SK-N-LO (○)、NCR-EW2 (□)、SCMC-ES-1 (●)、SK-ES-1 (■)、SK-N-MC (▼) に対する GANT61 の細胞傷害活性を MTT assay により検索した。GANT61 は 48 h 作用させた。Vehicle (DMSO) を control として用いた。縦軸は control に対する細胞の生存率を、横軸は GANT61 濃度 ($1 \times 10^{-6} \sim 10^{-4}$ M) を示す (mean \pm SEM: n = 3)。

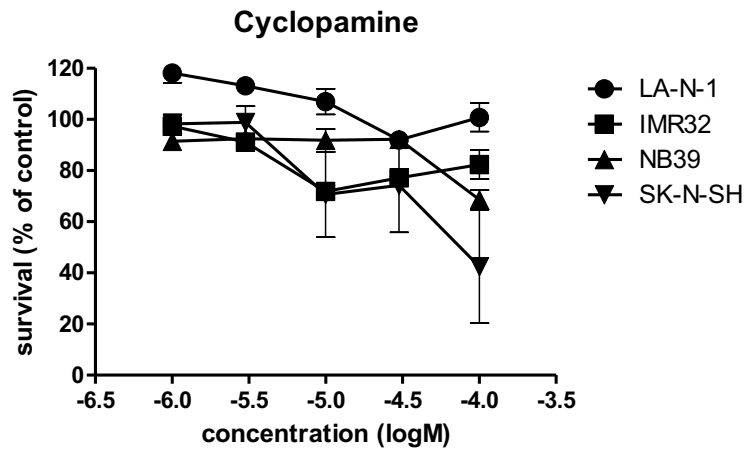


図 5 Cyclopamine における NB 細胞株に対する細胞傷害活性

LA-N-1 (●)、IMR-32 (■)、NB39 (▲)、SK-N-SH (▼) に対する cyclopamine の細胞傷害活性を MTT assay により検索した。Cyclopamine は 48 h 作用させた。Vehicle (DMSO) を control として用いた。縦軸は control に対する細胞の生存率を、横軸は cyclopamine 濃度 ($1 \times 10^{-6} \sim 10^{-4}$ M) を示す (mean \pm SEM: n = 3)。

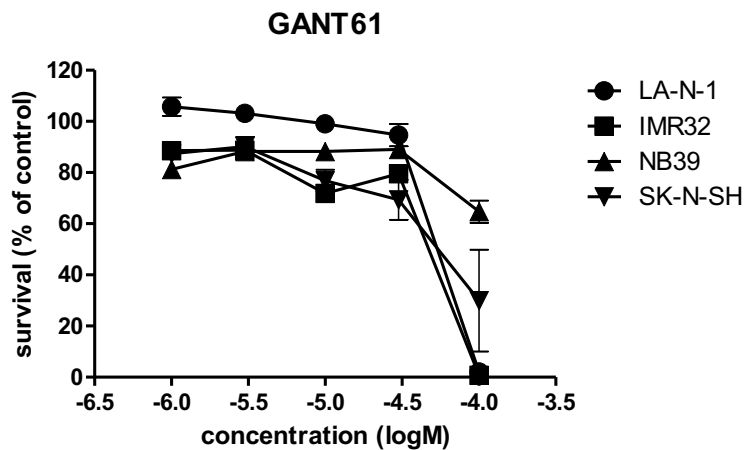


図 6 GANT61 における NB 細胞株に対する細胞傷害活性

LA-N-1 (●)、IMR-32 (■)、NB39 (▲)、SK-N-SH (▼) に対する GANT61 の細胞傷害活性を MTT assay により検索した。GANT61 は 48 h 作用させた。Vehicle (DMSO) を control として用いた。縦軸は control に対する細胞の生存率を、横軸は GANT61 濃度 ($1 \times 10^{-6} \sim 10^{-4}$ M) を示す (mean \pm SEM: n = 3)。

3.2 Hoechst 33342 染色による細胞及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観察した。本研究では、GANT61 の 30 μM 投与群において、positive control の CDDP 投与群と同様に、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像が顕著に観察された (図 7)。

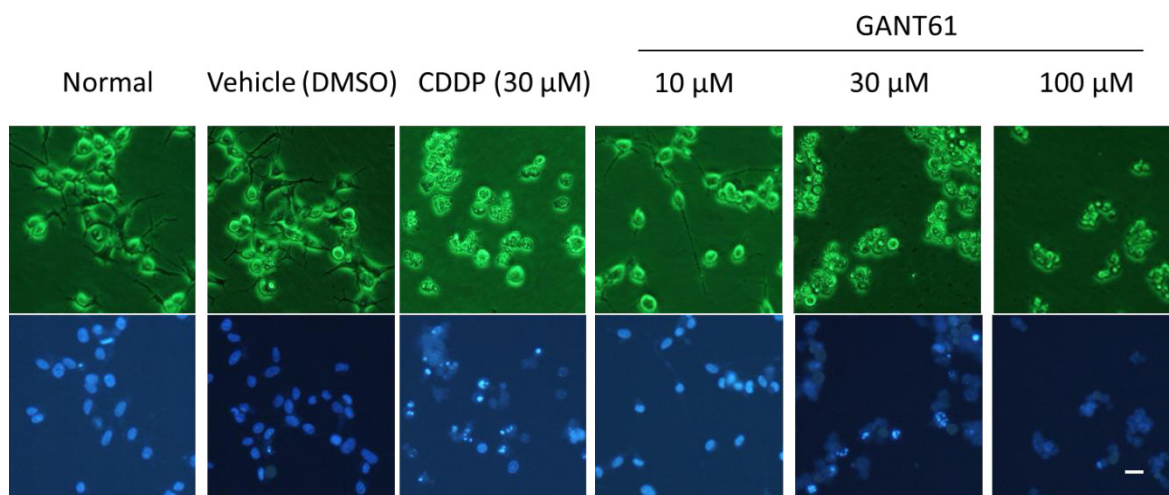


図 7 Hoechst 33342 染色による細胞及び核の形態学的変化の観察

SK-N-LO 細胞株に対して vehicle として DMSO、positive control として CDDP、GANT61 (10 μM ~ 100 μM) を各々 48 h 作用させた。上段は位相差像、下段は蛍光像を示す。アポトーシス細胞では、核の凝集部分に色素が集まり、強い青色蛍光染色が認められる (図中の scale bar は 20 μm を示す)。

3.3 GANT61 による初期アポトーシス誘導効果について

Hoechst 33342 染色ではアポトーシスの分子機構における中・後期のイベントを確認したが、初期アポトーシスの形態学的特徴である細胞膜の反転化を検出するために、flow cytometry による解析を行った。その結果、GANT61 の濃度 1~10 μM で濃度依存的に、初期アポトーシス細胞の増加を示した (図 8A の B₄ 領域、図 8B の左図)。また、30 μM では vehicle に比べて初期アポトーシス細胞数は有意に減少し、後期アポトーシス及びネクローシス細胞数が有意に増加した (図 8A の B₂ 領域、図 8B の右図)。

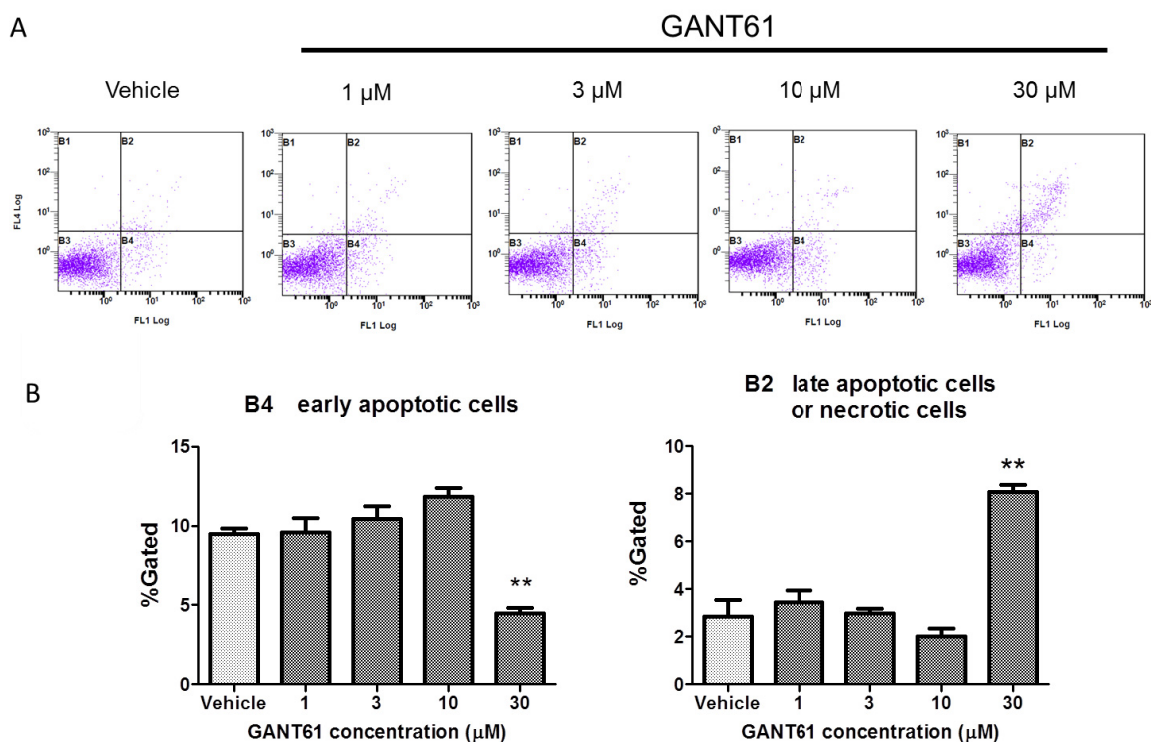
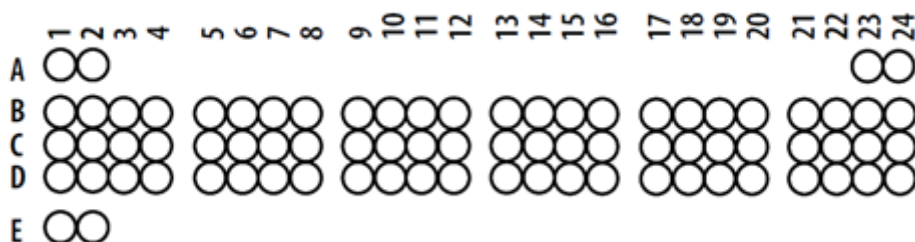


図 8 Flow cytometry による GANT61 による初期アポトーシス誘導の検索

SK-N-LO 細胞株に対して GANT61 及び DMSO (vehicle) を 48 h 作用させ、vehicle に対する各領域の細胞比率の変動を解析した。A: flow cytometry によるサイトグラム (B₂ 領域: 後期アポトーシス及びネクローシス細胞、B₃ 領域: 生細胞、B₄ 領域: 初期アポトーシス細胞) を示す。B: B₂、B₄ 領域における細胞比率 (%) を示す (**P < 0.01 versus vehicle)。

3.4 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 は、ニトロセルロース膜上に抗体が 2 カ所ずつスポットされた array kit で、35 種類のアポトーシス関連タンパク質の発現レベルを一度に検出することができる。Array の各タンパク質の一覧及びスポット配置図を図 9 に示す。



| Coordinate | Target/Control | Coordinate | Target/Control |
|------------|-------------------|------------|------------------------|
| A1, A2 | Reference Spots | C13, C14 | HO-2/HMOX2 |
| A23, A24 | Reference Spots | C15, C16 | HSP27 |
| B1, B2 | Bad | C17, C18 | HSP60 |
| B3, B4 | Bax | C19, C20 | HSP70 |
| B5, B6 | Bcl-2 | C21, C22 | HTRA2/Omi |
| B7, B8 | Bcl-x | C23, C24 | Livin |
| B9, B10 | Pro-Caspase-3 | D1, D2 | PON2 |
| B11, B12 | Cleaved Caspase-3 | D3, D4 | p21/CIP1/CDKN1A |
| B13, B14 | Catalase | D5, D6 | p27/Kip1 |
| B15, B16 | clAP-1 | D7, D8 | Phospho-p53 (S15) |
| B17, B18 | clAP-2 | D9, D10 | Phospho-p53 (S46) |
| B19, B20 | Claspain | D11, D12 | Phospho-p53 (S392) |
| B21, B22 | Clusterin | D13, D14 | Phospho-Rad17 (S635) |
| B23, B24 | Cytochrome c | D15, D16 | SMAC/Diablo |
| C1, C2 | TRAIL R1/DR4 | D17, D18 | Survivin |
| C3, C4 | TRAIL R2/DR5 | D19, D20 | TNF RI/TNFRSF1A |
| C5, C6 | FADD | D21, D22 | XIAP |
| C7, C8 | Fas/TNFRSF6/CD95 | D23, D24 | PBS (Negative Control) |
| C9, C10 | HIF-1α | E1, E2 | Reference Spots |
| C11, C12 | HO-1/HMOX1/HSP32 | | |

図 9 Proteome profiler array で検出可能なタンパク質の一覧とスポットの配置

SK-N-LO 細胞株に GANT61 (30 μ M) を 48 h 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に解析を行った。図 10A は、array image で、青色矢印は p21、白矢印は survivin、黄色矢印は claspin のタンパク質発現量の変化を示している。図 10B は、control (DMSO) に対する各アポトーシス関連タンパク質の変動の割合 (%) を示す。その結果、survivin 及び claspin タンパク質の顕著な発現減少 (それぞれ 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 (図 10)。

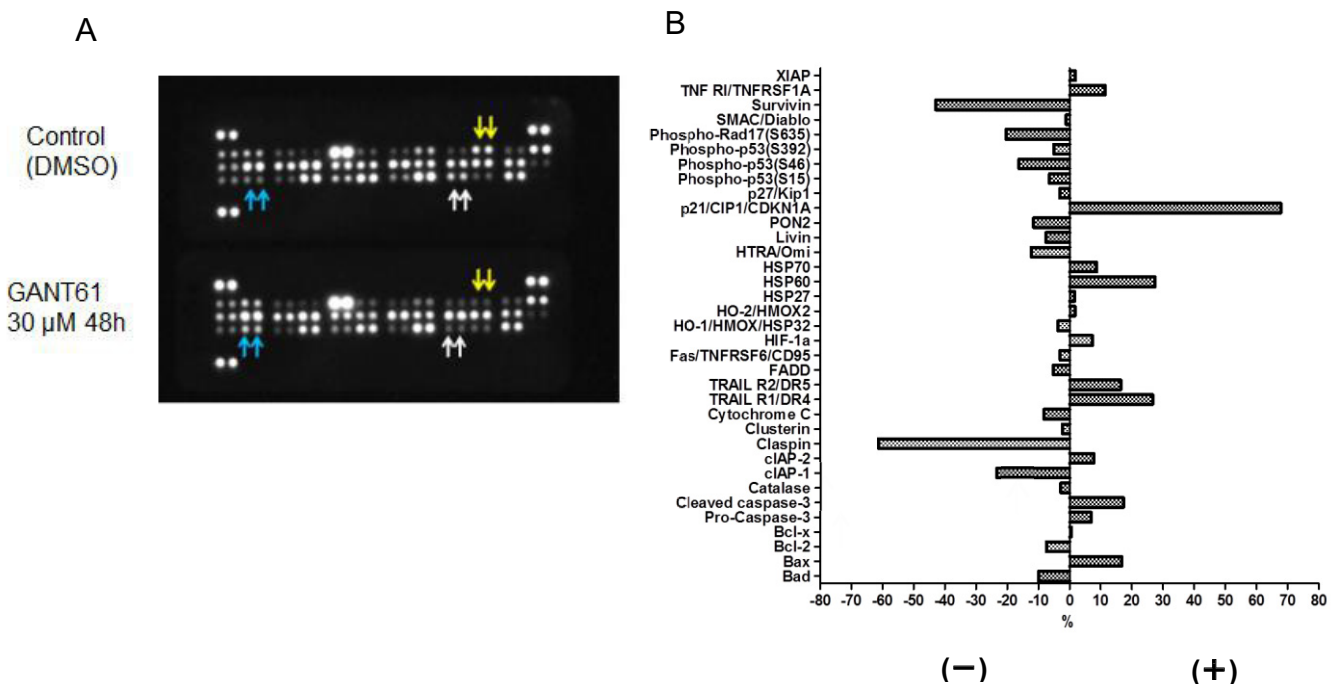


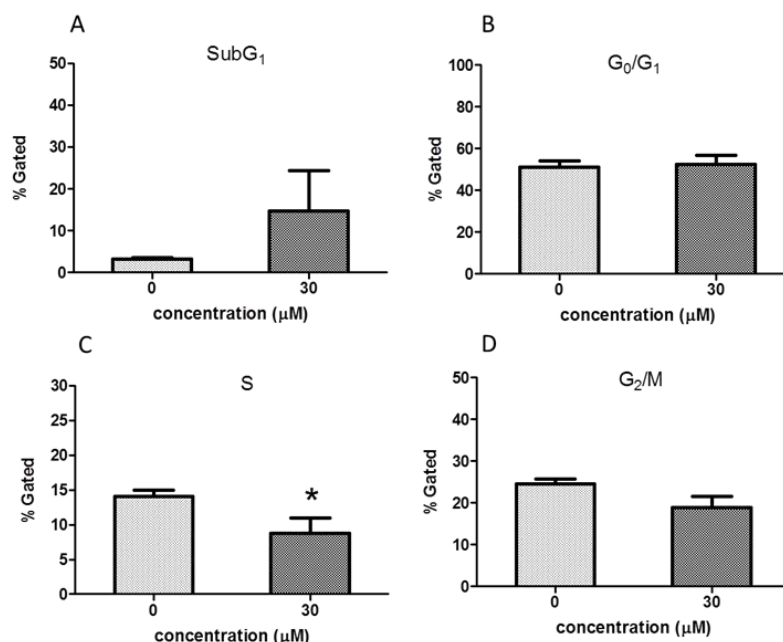
図 10 Proteome Profiler Array によるアポトーシス関連タンパク質の変動解析

SK-N-LO 細胞株に GANT61 (30 μ M) 及び DMSO (control) を 48 h 作用させた後、各タンパク質について control に対する発現量の変動を解析した。

A: array image (青色矢印は p21、白矢印は survivin、黄色矢印は claspin のタンパク質発現量の変化を示している。B: control (DMSO) に対する各アポトーシス関連タンパク質の変動の割合 (%) を示す。

3.5 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 flow cytometry を用いて検索を行った。図 11 に SK-N-LO 細胞株に対して、GANT61 (30 μM) 及び vehicle として DMSO (0 μM) 作用後の、各細胞周期における細胞比率 (%) を比較した。その結果、S 期における細胞比率が有意に減少した (図 11C)。G₀/G₁ 期及び G₂/M 期の細胞比率に変化は認められなかった (図 11B、11D)。また、Sub G₁ 期の細胞数は増加傾向が認められた (図 11A)。以上の結果から、GANT61 は G₁ 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。



| | vehicle | 30 μM |
|------------------------------------|----------------|------------------|
| subG ₁ (%) | 3.1 \pm 0.6 | 14.8 \pm 13.5 |
| G ₀ /G ₁ (%) | 50.9 \pm 4.5 | 52.2 \pm 6.4 |
| S (%) | 14.1 \pm 1.3 | 8.8 \pm 3.1 * |
| G ₂ /M (%) | 24.5 \pm 1.7 | 18.9 \pm 3.7 |

図 11 GANT61 が細胞周期に及ぼす影響

SK-N-LO 細胞株に対して、GANT61 (30 μM) 及び DMSO (vehicle; 0 μM) を 48 h 作用させた後、flow cytometry を用いて各細胞周期における細胞比率 (%) を比較した (*P < 0.05 versus vehicle)。

3.6 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

SK-N-LO 細胞株に対して GANT61 作用後の各タンパク質の経時的変化 (0 ~ 48 h) を図 12 A~C に、各タンパク質の経時的変化をグラフにしたものを図 13 ~ 17 に示す。まず、Hh シグナル関連タンパク質では GLI2 が 48 h 後に有意な発現量の減少が認められたが、GLI1 については変化が認められなかった。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 (図 12A、13A~E)。アポトーシス関連タンパク質では、p21 が 8~48 h 後に有意な発現量の増加が認められた (図 12B、16C)。また、survivin は 48 h 後に有意な発現量の減少が認められ (図 12B、16A)、claspin は 24 ~ 48 h 後に有意な発現量の減少が認められた (図 12B、16D)。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 h 後で有意な発現量の増加が認められた (図 12B、15D)。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 (図 12B、14A-D、15A、16B)。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 h 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 12C、17A、B)。

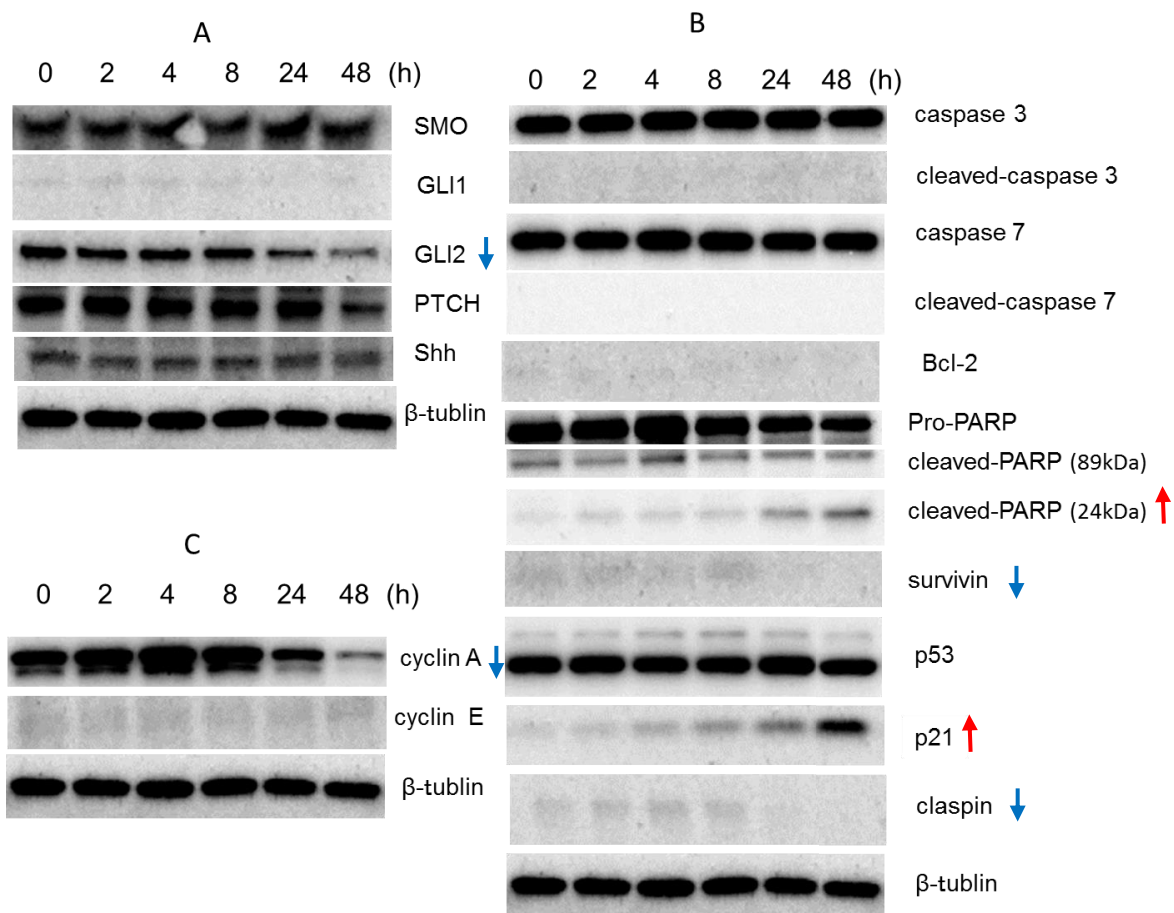


図 12 GNAT61 による関連タンパク質の経時的変化

SK-N-LO 細胞株に対して GNAT61 30 μ M を 0 ~ 48 h で作用させ、Western blot 法によりタンパク質発現の経時的変化を検索した。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質

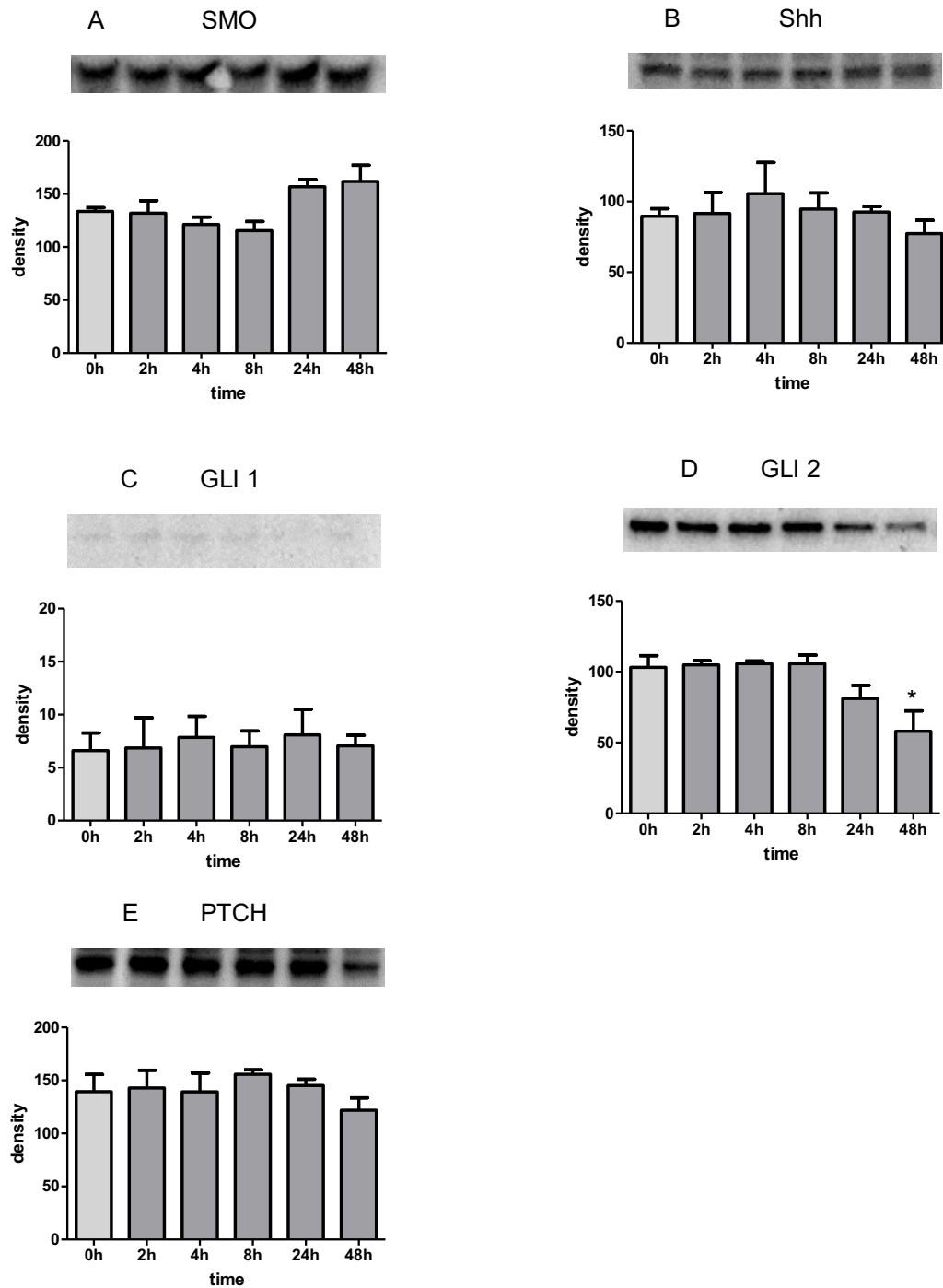


図 13 GANT61 作用による SK-N-LO における Hh シグナル関連タンパク質の経時的変化

GANT61 (30 μ M) 作用後の SMO (A)、Shh (B)、GLI1 (C)、GLI2 (D)、PTCH (E) タンパク質の経時的変化 (0 ~ 48h) を示す。バンドの濃さについて 0h と各作用時間との間で有意差検定を行った (n = 3、*p < 0.05)。

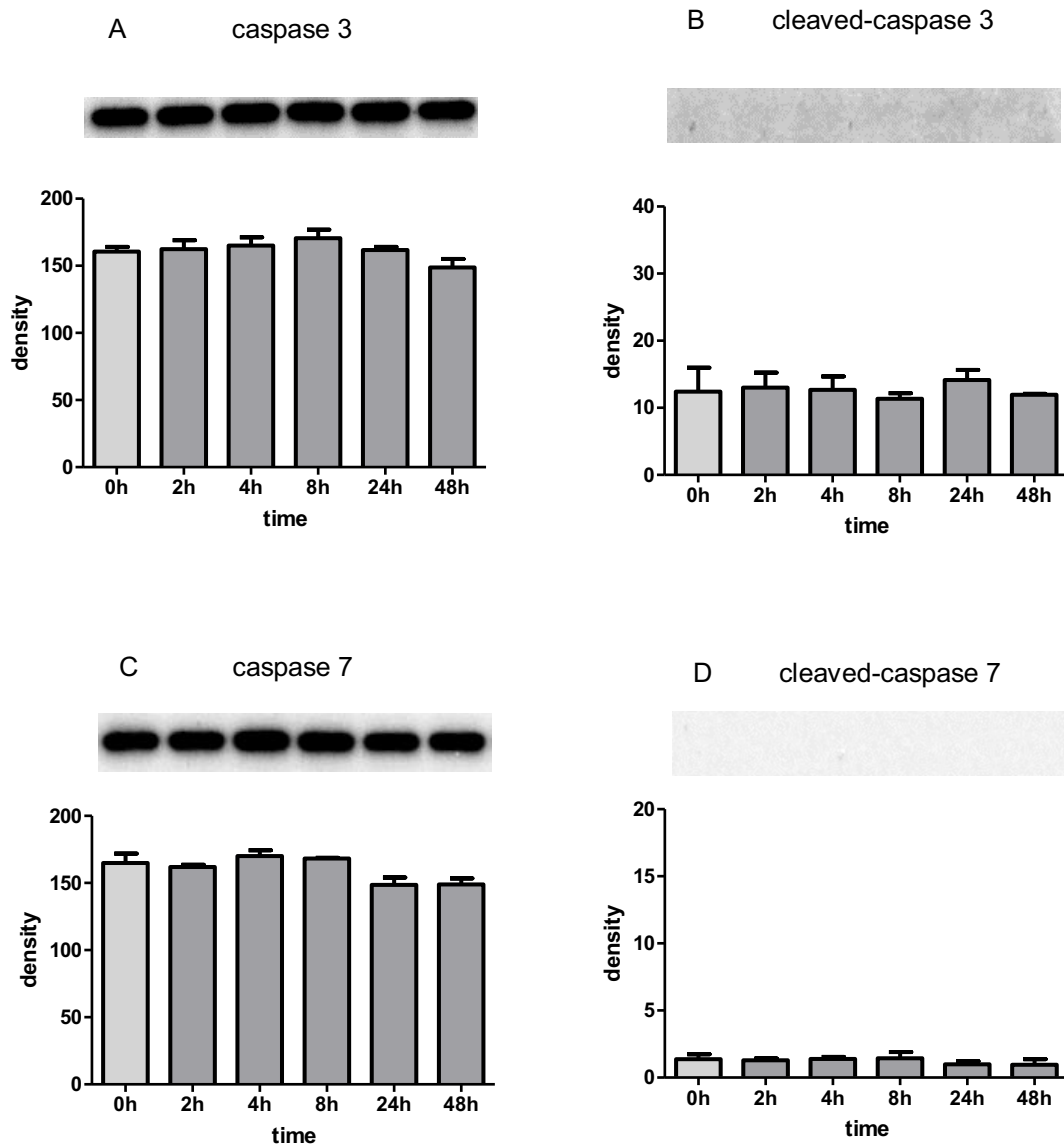


図 14 GANT61 作用による SK-N-LO における アポトーシス関連タンパク質の経時的変化 (1)

GANT61 (30 μ M) 作用後の caspase 3 (A)、cleaved-caspase 3 (B)、caspase 7 (C)、cleaved-caspase 7 (D) タンパク質の経時的変化 (0 ~ 48 h) を示す。バンドの濃さについて 0 h と各作用時間との間で有意差検定を行った (n = 3)。

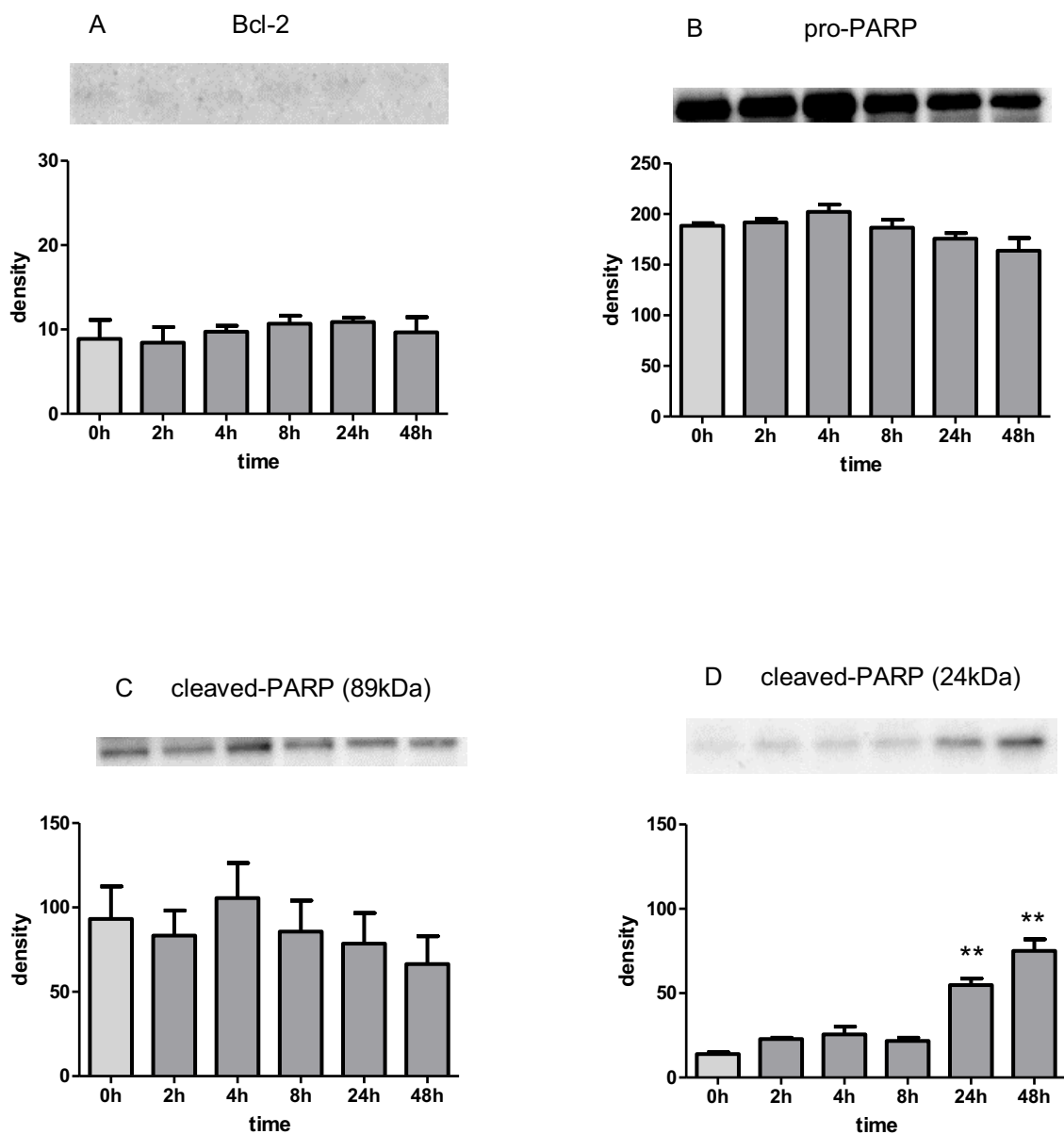


図 15 GANT61 作用による SK-N-LO におけるアポトーシス関連タンパク質の経時的変化 (2)

GANT61 (30 μ M) 作用後の Bcl-2 (A)、PARP (B)、cleaved-PARP [89 kD (C)、24 kDa (D)]、タンパク質の経時的変化 (0~48 h) を示す。バンドの濃さについて 0 h と各作用時間との間で有意差検定を行った (n=3、**p<0.01)。

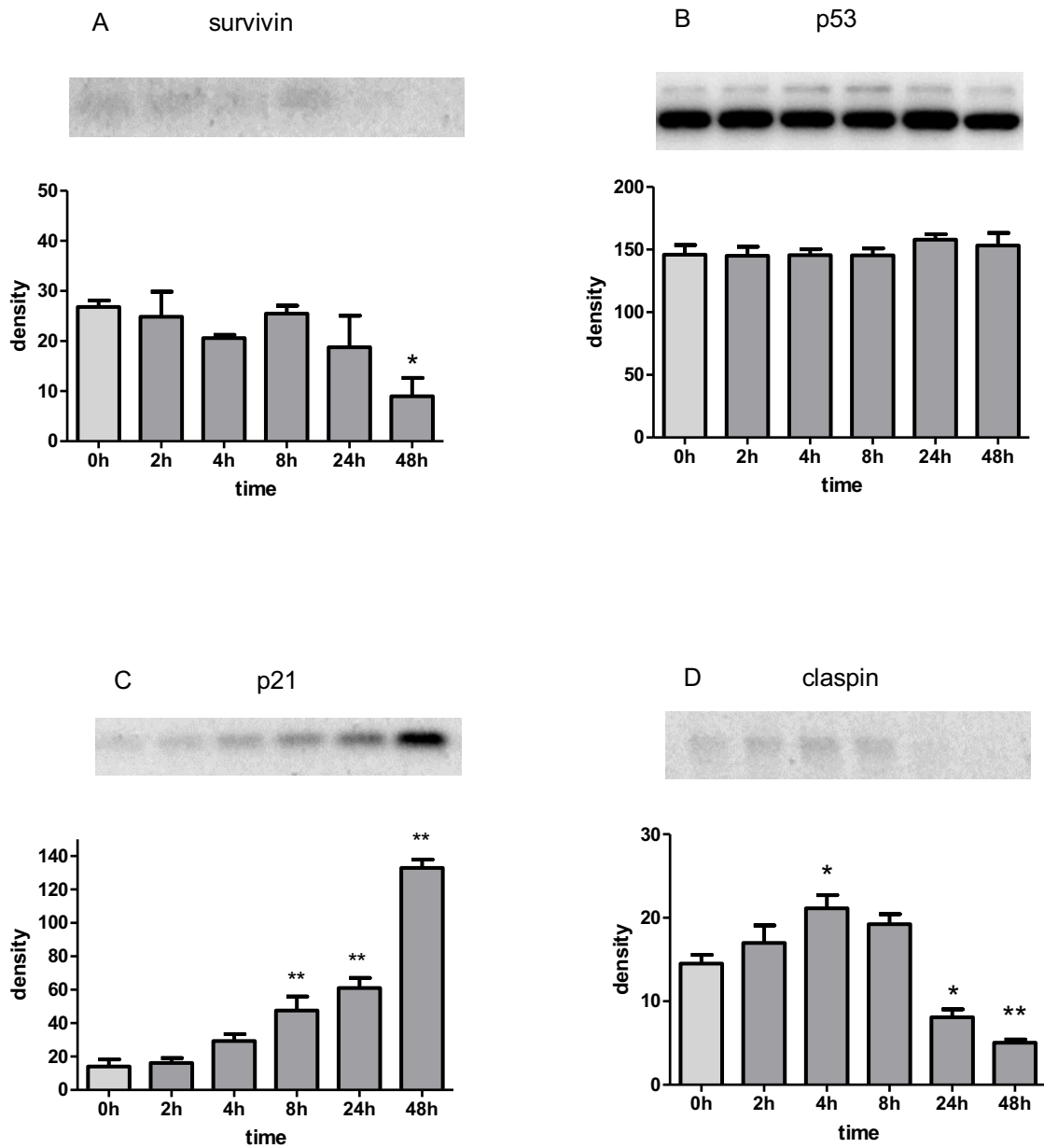


図 16 GANT61 作用による SK-N-LO における アポトーシス関連タンパク質の経時的変化 (3)

GANT61 (30 μ M) 作用後の survivalin (A)、p53 (B)、p21 (C)、claspin (D) タンパク質の経時的変化 (0~48h) を示す。バンドの濃さについて 0 h と各作用時間との間で有意差検定を行った (n = 3、*p < 0.05、**p < 0.01)。

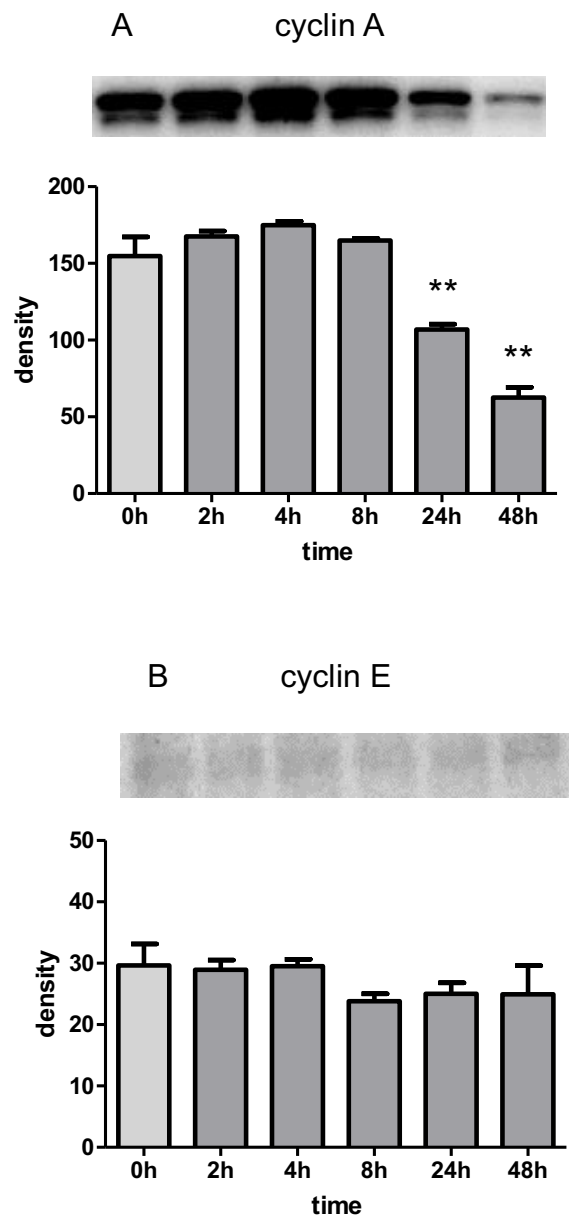


図 17 GANT61 作用による SK-N-LO における細胞周期関連タンパク質の経時的変化 (4)

GANT61 (30 μ M) 作用後の cyclin A (A)、cyclin E (B) タンパク質の経時的変化 (0~48 h) を示す。バンドの濃さについて 0 h と各作用時間との間で有意差検定を行った ($n = 3$, $**p < 0.01$)。

4. 考察

本研究で、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示すことがわかった。GANT61 は GLI1 を強制発現させた細胞を用いて GLI reporter gene assay により得られた小分子化合物であり、核内において GLI の機能を阻害し、GLI と DNA の結合を妨げることが明らかとなっている¹⁷⁾。GANT61 と同様の作用機序を示す GANT58 は、ESFT 細胞株 (A673) に対して低濃度 (5 μ M) で増殖抑制効果を示すことが報告されている¹²⁾。本研究でも、最も感受性の高かったのは ESFT である SK-N-LO 細胞株で、IC₅₀ は 14.5 μ M であった (表 4)。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が、ESFT の細胞死には Hh シグナル伝達経路の下流にある GLI が作用していることが示唆された。一方、*EWS-FLI1* 融合遺伝子を発現していない NB 細胞株では、GANT61 に対する感受性は極めて低かった (表 4)。さらに、ESFT の中でも *EWS-ERG* の融合遺伝子を発現している SCMC-ES1 細胞株は GANT61 に対する感受性が低かった。しかし、*EWS-FLI* 融合遺伝子を発現している ESFT でも、SK-ES-1 細胞株は GANT61 に対して感受性が低かった。腫瘍の発生起源から考察すると (表 3)、脳を発生起源とする SK-N-LO と SK-N-MC は GANT61 に対して感受性が高く、骨を発生起源とする SCMC-ES1 と SK-ES-1 は感受性が低いことがわかった。GLI1 は *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が¹⁰⁻¹²⁾、本研究では GANT61 作用後の SK-N-LO 細胞株において、GLI1 タンパク質の発現量の低下は認められず、GLI2 タンパク質の発現量の低下のみが認められた (図 12、13)。NB 細胞株においてではあるが、その腫瘍原性には GLI2 の高発現が強く関与しているとの報告もあり¹⁸⁾、本研究結果との関連性が示唆された。次に、Hoechst 33342 染色による細胞核の形態変化及び 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 (図 7、8)。このことは、survivin の発現量減少、PARP の切断 (cleaved-PARP) が認められたことから裏付けられた (図 12、15、16)。Survivin は抗アポトーシスタンパク質の一つであり、ほとんどの癌細胞においてその発現が認められている。Survivin のアポトーシス阻害機構は、アポトーシス促進タンパク質である Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI (Smac/DIABLO) の阻害やアポトーシス阻害タンパク質である X-linked inhibitor of

apoptosis protein (XIAP) の安定化、活性型 caspase の分解が挙げられる¹⁹⁾。また、PARP は、DNA 修復や細胞死、分化制御に関与するタンパク質で、アポトーシス細胞において、活性型 caspase による PARP の切断が認められる²⁰⁾。しかし、本研究の Proteome profiler array の結果では、GANT61 による Smac/DIABLO 及び XIAP の変動は認められなかった (図 10)。また、p53 及び Bcl-2 タンパク質発現量についても変動は認められなかった (図 12、15、16)。さらに、Western blot 法による結果でも、GANT61 による caspase 3、7 及び cleaved-caspase 3、7 のタンパク質発現量の変化に変動が認められなかった (図 12、14)。このことから、GANT61 による SK-N-LO 細胞株のアポトーシス誘導効果は、caspase 非依存性であることが示された。しかし、GANT61 によるアポトーシス誘導効果は、Burkitt リンパ腫²¹⁾ や NB 細胞²²⁾ でも報告されているが、いずれも caspase 依存性であった。

GANT61 は GLI2 のタンパク質の発現量を減少させ、p21 のタンパク質の発現量を有意に増加させた (図 12、13、16)。p21 は、cyclin-dependent kinase (CDK) 阻害因子として知られ、G₁/S 期における細胞周期進行の調節因子として機能している²³⁾。骨肉腫²⁴⁾ や卵巣癌細胞²⁵⁾ 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、flow cytometry の結果では、S 期における細胞比率の有意な減少が認められたが、Sub G₁ 期における細胞比率に増加傾向が認められたものの、G₁ 期における細胞比率は変化が認められなかった (図 11)。さらに、cyclin A タンパク質の発現量の減少も認められ (図 12、17)、cyclin A は G₁ から S 期への移行及び S 期における DNA 複製に関与しているため²⁶⁾、p21 発現量の増加により 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。また、claspin タンパク質の発現量も減少が認められたが (図 12、16)、claspin は DNA 複製フォークの停止による ataxia-telangiectasia mutated related (ATR) 依存的な checkpoint kinase 1 (Chk1) の活性化に必要であり、S 期チェックポイントにおけるメディエーターとして機能する^{27,28)}。一方で claspin は、いくつかの癌細胞において過剰発現が認められていることから、癌細胞の細胞増殖への関与が示唆される²⁹⁾。Claspin はアポトーシス誘導により、caspase 7 によって切断、分解されることが明らかとなっているが^{30,31)}、本研究では caspase 7 の変動は認められなかった。しかし、骨肉腫、大腸癌、肺癌細胞株において、核内での cyclin A と claspin の発現のタイミングに相関性が認められていることから^{32,33)}、cyclin A の抑制に伴い claspin

の発現量も減少したものと考えられた。また、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 (24kDa) 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 及び PARP の切断に至ったメカニズムについては明らかにすることはできなかった。更なる実験が必要であると考えられた。

以上の結果、図 24 に示す様に、GANT61 は GLI2 を阻害することで p21 を活性化し、cyclin A 及び claspin が抑制されること、また、caspase 非依存的に PARP が切断されることにより、DNA 修復阻害及び G₁/S 期における細胞周期の停止が起こり、さらに、survivin 抑制作用も有することで、アポトーシスを誘導するものと考えられた。

本研究により、GANT61 が ESFT に対して細胞死を誘導するメカニズムの一端が明らかとなった。今回の結果が ESFT に対する新規抗悪性腫瘍薬の開発への基盤となることも示された。

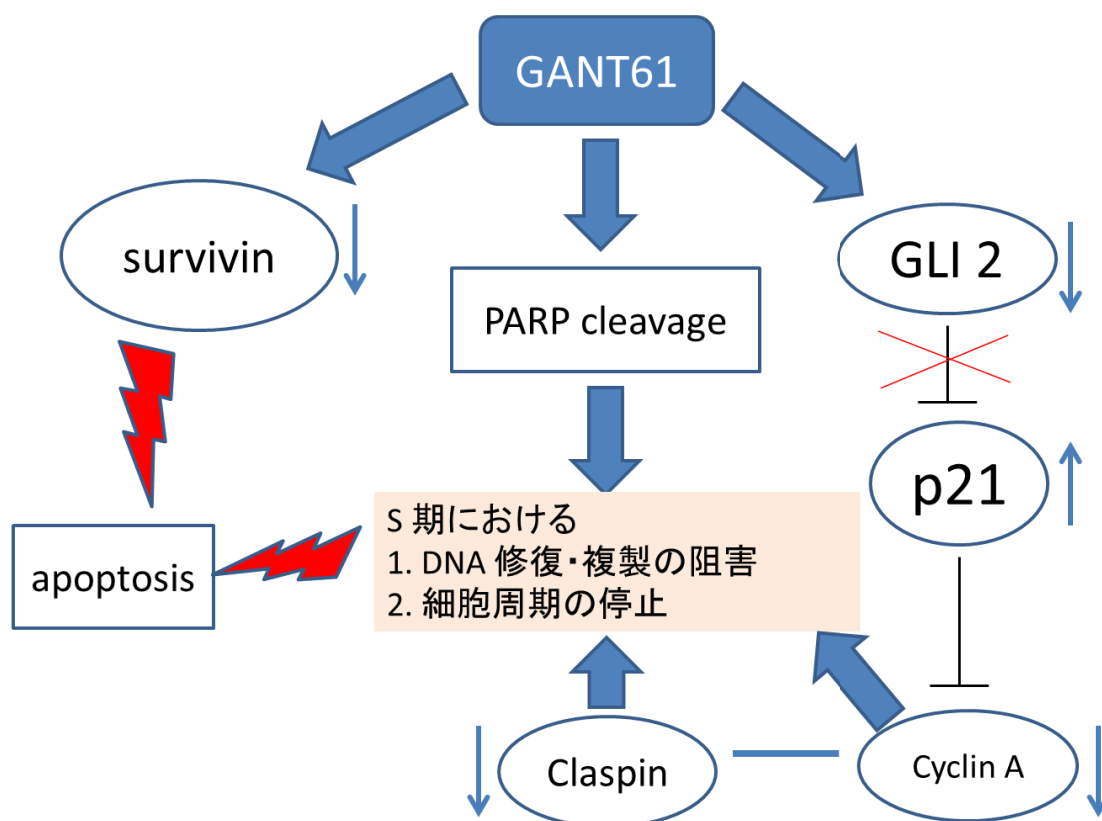


図 24 GANT61 による SK-N-LO 細胞株に対するアポトーシス誘導メカニズム

5. 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 様の小円形細胞の細胞形態を有し、脳を原発とする ESFT に対して強い細胞傷害活性を示した。特にこの融合遺伝子と NB 様の細胞形態を持つ SK-N-LO 細胞株に対して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 発現量には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 の発現を亢進させた。
4. GANT61 により p21 の発現が亢進し、cyclin A の発現が阻害されて、claspin の発現低下や切断型 PARP (cleaved-PARP) の発現増加を伴った結果、G₁ 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本研究により示された。

6. 引用文献

- 1) National Cancer Institute: PDQ[®] Ewing Sarcoma Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Date last modified (10/7/2013). Available at: <http://cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/ewings/HealthProfessional>. Accessed (10/27/2013).
- 2) 独立行政法人 国立がん研究センターがん対策情報センター、がん情報サービス http://ganjoho.jp/public/cancer/data/malignant_bone_tumor.html. Accessed (10/27/2013).
- 3) 日本小児がん学会編、小児がん診療ガイドライン、第8章 Ewing 肉腫ファミリー腫瘍診療ガイドライン 2011 年度版 http://www.jspho.jp/pdf/guideline/ccg11_12.pdf. Accessed (10/27/2013).
- 4) Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ, Pritchard DJ, Gebhardt MC, Dickman PS, Perlman EJ, Meyers PA, Donaldson SS, Moore S, Rausen AR, Vietti TJ, Miser JS, *N. Engl. J. Med.*, 348, 694-701 (2003).
- 5) Mackintosh C, Madoz-Gurpide J, Ordonez JL, Osuna D, Herrero-Martin D, *Cancer Biol. Ther.*, 9, 655-667 (2010).
- 6) Ingham PW, McMahon AP, *Genes Dev.*, 15, 3059-3087 (2001).
- 7) Scales SJ, de Sauvage FJ, *Trends Pharmacol. Sci.*, 30, 303-312 (2009).
- 8) Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, Weiss GJ, Borad MJ, Hann CL, Brahmer JR, Mackey HM, Lum BL, Darbonne WC, Marsters, JC, Jr, de Sauvage FJ, Low JA, *N. Engl. J. Med.*, 361, 1164-1172 (2009).
- 9) Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, Holcomb T, Stinson J, Gould SE, Coleman B, LoRusso PM, Von Hoff DD, de Sauvage FJ, Low JA, *N. Engl. J. Med.*, 361, 1173-1178 (2009).
- 10) Zwerner JP, Joo J, Warner KL, Christensen L, Hu-Lieskovan S, Triche TJ, May WA, *Oncogene*, 27, 3282-3291 (2008).
- 11) Beauchamp E, Bulut G, Abaan O, Chen K, Merchant A, Matsui W, Endo Y, Rubin, JS, Toretsky J, Uren A, *J. Biol. Chem.*, 284, 9074-9082 (2009).
- 12) Joo J, Christensen L, Warner K, States L, Kang HG, Vo K, Lawlor ER, May WA, *PLoS One*, 4, e7608 (2009).

- 13) Ida K, Kobayashi S, Taki T, Hanada R, Bessho F, Yamamori S, Sugimoto T, Ohki M, Hayashi Y, *Int. J. Cancer*, 63, 500-504 (1995).
- 14) Kojima T, Asami S, Chin M, Yoshida Y, Mugishima H, Suzuki T, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 991-994 (2002).
- 15) Yabe H, Fukuma M, Urano F, Yoshida K, Kato S, Toyama Y, Hata J, Umezawa A, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293, 61-71 (2002).
- 16) Spitzenberg V, Konig C, Ulm S, Marone R, Ropke L, Muller JP, Grun M, Bauer R, Rubio I, Wymann MP, Voigt A, Wetzker R. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 136, 1881-1890 (2010).
- 17) Lauth M, Bergstrom A, Shimokawa T, Toftgard R, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104, 8455-8460 (2007).
- 18) Mao L, Xia YP, Zhou YN, Dai RL, Yang X, Duan SJ, Qiao X, Mei YW, Hu B, Cui H, *Cancer Sci.*, 100, 1848-1855 (2009).
- 19) Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ, *Clin. Cancer Res.*, 14, 5000-5005 (2008).
- 20) Soldani C, Scovassi AI, *Apoptosis* 7, 321-328 (2002).
- 21) Yoon JW, Gallant M, Lamm ML, Iannaccone S, Vieux KF, Proytcheva M, Hyjek E, Iannaccone P, Walterhouse D, *Mol. Cancer Res.*, 11, 604-615 (2013).
- 22) Wickstrom M, Dyberg C, Shimokawa T, Milosevic J, Baryawno N, Fuskevag OM, Larsson R, Kogner P, Zaphiropoulos PG, Johnsen JI, *Int. J. Cancer*, 132, 1516-1524 (2012).
- 23) Ogryzko VV, Wong P, Howard BH, *Mol. Cell Biol.*, 17, 4877-4882 (1997).
- 24) Nagao H, Ijiri K, Hirotsu M, Ishidou Y, Yamamoto T, Nagano S, Takizawa T, Nakashima K, Komiya S, Setoguchi T, *J. Pathol.*, 224, 169-179 (2011).
- 25) Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, Osada R, Yoshida J, Shiozawa T, Konishi I, *Cancer Sci.*, 98, 68-76 (2007).
- 26) Yam CH, Fung TK, Poon RY, *Cell Mol. Life Sci.*, 59, 1317-1326 (2002).
- 27) Freire R, van Vugt MA, Mamely I, Medema RH, *Cell Cycle* 5, 2831-2834 (2006).
- 28) Tanaka K, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 2367-2373 (2010).
- 29) Lin SY, Li K, Stewart GS, Elledge SJ, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 6484-6489 (2004).
- 30) Semple JI, Smits VA, Fernaund JR, Mamely I, Freire R, *Cell Death Differ.*, 14,

1433-1442 (2007).

31) Clarke CA, Bennett LN, Clarke PR, *J. Biol. Chem.*, 280, 35337-35345 (2005).

32) Bennett LN, Clarke PR, *FEBS Lett.*, 580, 4176-4181 (2006).

33) Tsimaratou K, Kletsas D, Kastrinakis NG, Tsantoulis PK, Evangelou K, Sideridou M, Lontos M, Poulas I, Venere M, Salmas M, Kittas C, Halazonetis TD, Gorgoulis VG, *J. Pathol.*, 211, 331-339 (2007).

7. 謝辞

本研究に際し、終始御指導御鞭撻を賜りました、日本大学薬学部臨床医学研究室 鈴木孝教授に厚く御礼申し上げます。本研究の審査に際して多くのご指導、ご助言を賜りました、日本大学薬学部薬理学研究室 伊藤芳久教授、臨床医学研究室 小野真一教授には深く感謝いたします。また、有益なご助言を頂きました、日本大学薬学部臨床医学研究室 浅見覚准教授に深く感謝いたします。本研究の初期の段階より、技術面、研究の方針について様々な貴重な御助言、御指導を賜りました、日本大学薬学部臨床医学研究室 田畑恵市准教授には心より感謝を申し上げます。さらに、研究を進めるに当たり、多大なる御協力、お心遣いを頂きました日本大学薬学部臨床医学研究室内の学生の皆様にも、切に感謝いたします。

本研究の機会を与えて下さった東邦大学医療センター大森病院 西澤健司薬剤部長には心より感謝いたします。また、忙しい業務の中、快く研究へのご協力を頂きました東邦大学医療センター大森病院薬剤部員には心より感謝いたします。

主論文の基礎となる原著論文

Takahiro Matsumoto, Keiichi Tabata, and Takashi Suzuki. The GANT61, a GLI inhibitor, induces caspase-independent apoptosis of SK-N-LO cells, *Biol. Pharm. Bull.* 2014.
(accepted)