

論文内容の要旨

An inducer of NAD(P)H quinone oxidoreductase1, carnosic acid, enhances the cytotoxicity of β -lapachone in melanoma cell lines
(NAD(P)H キノンオキシドレダクターゼ 1 の誘導物質, カルノシン酸は, メラノーマ細胞株における β -ラパコンの細胞毒性を増強する)
(荒川伸之, 大久保絢香, 安平進士, 高橋和宏, 赤坂俊英, 増田友之, 柴崎晶彦, 前沢千早)
(Oncology Letters 15 巻, 2 号 平成 30 年 2 月掲載)

I. 研究目的

β -lapachone (β -lap) は, 中南米原産の高木ラパーチヨ (Tabebuia avellanedae) の樹皮から抽出された細胞傷害性 *o*-ナフトキノンである。 β -lap は, 生体内では NAD(P)H quinone oxidoreductase1 (NQO1) によりヒドロキノン型に変換されるが, これは極めて不安定であり, 速やかに活性酸素種を生成し自身はキノン型に戻る。この酸化型-還元型変換の無益回路 (futile cycle) は, 結果として NAD(P)H の枯渇をもたらし, 生成された活性酸素種とともにがん細胞のアポトーシスを誘導する。以上の機構により, β -lap は強力な抗がん薬として期待される分子である。

一方, 天然ハーブのローズマリーから見つかったカテコール型求電子化合物であるカルノシン酸 (CA) は, Kelch like ECH-associated protein1 (KEAP1) のシステイン残基を *S*-アルキル化して KEAP1 と転写因子 NF-E2 related factor2 (NRF2) の結合を解離させ, NRF2 の核内移行を促進する。核内移行した NRF2 は, NQO1 をはじめとした酸化ストレス防御遺伝子群の発現を誘導する。CA 投与により発現誘導された NQO1 は, β -lap の futile cycle を亢進させ, 細胞毒性を増強させる事が予想される。

本研究では, 難治性皮膚悪性腫瘍で有効な治療の未だ確立されていない悪性黒色腫に対して, β -lap と CA の同時投与の有効性を検討した。

II. 研究対象ならび方法

ヒト悪性黒色腫細胞株 9 種, マウス悪性黒色腫細胞株 1 株 (B16BL6) を, 東北大学医用細胞資源センター (仙台), American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), Japanese Collection of Research Bioresources (大阪), 理研バイオリソースセンター (筑波) より入手した。また, ハーバード医科大学皮膚科学講座 Mihm 博士 (Boston, MA, USA) より供与頂いたヒト悪性黒色腫細胞株 2 株も使用した。培養細胞株において NRF2, NQO1 の発現を Western blotting 法, 免疫染色で解析した。また, Auxin-inducible degron (AID) system を用いて NQO1 inducible clone を作成した。また, 遺伝子の発現抑制には small interfering RNA (siRNA, Thermo fisher scientific, MA, USA) を用いた。WST アッセイ法

を用いて薬剤処理後の細胞生存率を測定し、 IC_{50} の算出により、感受性を評価した。

III. 研究結果

1. すべての黒色腫細胞株でNQO1の発現が認められた。また、細胞株間でNQO1の発現量は異なっていた。
2. NQO1の発現量と β -lap単剤処理時の IC_{50} の間には有意な相関は認めなかった($p=0.377$)。
3. B16BL6細胞を親株としたNQO1-AID融合タンパク質過剰発現細胞株では、添加したAuxin依存性のNQO1発現消失により、 β -lapの細胞毒性が1/5程度に低下した。
4. ヒト悪性黒色細胞株でのsiRNAによるNQO1の発現抑制実験では、 β -lapによる細胞毒性を2/3程度に低下させた。
5. CA処理により、濃度依存性にNQO1の発現量の上昇が見られた。
6. β -lapとCA同時処理後により細胞毒性が2~6倍増強した。

IV. 結 語

細胞株間における β -lap感受性の違いは、NQO1の発現量のみでは説明できないが、実験的にNQO1発現量を操作した場合は β -lap感受性の差が顕著に生じた。また、CAはヒト悪性黒色腫においてNQO1の発現量を増大させ、 β -lapの細胞毒性を増強させた。 β -lapとCAの同時投与は、悪性黒色腫治療の有用な選択肢となりうる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 平 英一 (薬理学講座：情報伝達医学分野)

副査 教授 増田 友之 (病理学講座：機能病態学分野)

副査 教授 櫻庭 実 (形成外科学講座)

β -lapachone はキノン系抗がん薬として期待される天然化合物である。本研究は、天然ハーブ由来の carnosic acid のもつ NQO1 発現誘導効果に着目して、悪性黒色腫における β -lapachone/carnosic acid の併用合成致死効果について検討したものである。申請者は、細胞生物/遺伝子工学的手法を用いて、carnosic acid が β -lapachone の悪性黒色腫細胞株に対して殺細胞効果を 2~6 倍程度上昇させることを明らかにした。

Carnosic acid は β -lapachone の投与量を減量させ、患者への負担を軽減させる有用なモジュレーターとなる可能性が示された。

試験・試問の結果の要旨

本研究で用いたキノン系抗がん剤に関する基礎知識ばかりでなく、副作用、実験手法、進行期の悪性黒色腫における標準治療や新規分子標的治療などに関する試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

参考論文

- 1) A case of pigmented pilomatricoma (calcifying epithelioma): the role of mast cells in pigmentation (角田加奈子, 他 2 名と共著)
European Journal of Dermatology 26 巻, 3 号 (2016)
- 2) NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 expression sensitizes malignant melanoma cells to the HSP90 inhibitor 17-AAG (葛西秋宅, 他 8 名と共著)
PLoS One 11 巻, 4 号 (2016)