

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

土屋 聖子

専攻分野：外科学

コース：乳腺・内分泌外科

指導教授：津川 浩一郎

主論文の題目：

A Novel KSP Inhibitor, KPYB10602, Induces Mitotic Arrest and Cell Death in Breast Cancer Cells

(新規合成 KSP 阻害薬 KPYB10602 の乳癌細胞に対する分裂期停止および細胞死の誘導)

共著者：

Yuki Ohta, Mitsuko Takenaga, Jun Niimi, Daiki Watanabe, Satoshi Tsunoda, Masanori Ootaki, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Naoki Matsumoto, Koichiro Tsugawa

緒言

KSP (kinesin spindle protein) は、ATP の加水分解で得られるエネルギーを用いて微小管上で動力を生じるモータータンパク質であり、中心体の分離・移動や紡錘体の形成など細胞分裂において重要な役割を果たしている。

現在の乳癌薬物治療において、タキサンを含む化学療法が標準治療として広く認められている。しかしながらタキサン系などの既存の微小管阻害薬は正常細胞、とりわけ神経細胞の機能も阻害し、副作用として末梢神経障害を生じることが弊害となっている。一方、KSP は微小管構造の一部ではないため、その阻害薬は副作用の少ない抗癌剤となる事が期待される。

そこで本研究では、新規合成 KSP 阻害薬 KPYB10602 のヒト乳癌細胞に対する抗腫瘍効果を *in vitro*、および *in vivo* で検討した。

方法・対象

新規合成 KSP 阻害薬 KPYB10602 (J Med Chem 54:4839-4846, 2011) を

使用し、その効果を検討した。ヒト乳癌細胞として、MCF-7、MDA-MB-231 および HCC-1937 を用いた。

KPYB10602 の細胞増殖に対する効果を MTT 法を用いて測定し、その作用メカニズムの評価として、免疫染色を行い微小管および染色体を観察した。フローサイトメトリーにて細胞周期の解析を行い、DNA の断片化およびアポトーシス関連因子を ELISA 法およびウェスタンブロット法にて評価した。

さらに免疫不全マウスに乳癌細胞を皮下移植し、KPYB10602 投与による腫瘍増大抑制効果と副作用について検討した。なお、本実験は聖マリアンナ医科大学大学院・実験動物飼育管理研究施設動物実験委員会にて審査され、承認を得たものである（承認番号 1506012）。

統計は Dunnett の検定または ANCOVA を用いた。

結果

新規合成 KSP 阻害薬 KPYB10602 は、MCF-7、MDA-MB-231 および HCC1937 いずれの乳癌細胞においても濃度依存性に細胞増殖を抑制した。

KPYB10602 の添加により分裂期における双極性の紡錘体形成が抑制され、その結果染色体の分離が起こらずロゼット形成が観察された。さらに G2/M 期の増加を認めたことから、分裂期での停止が示唆された。また細胞周期を解析したところ、周期の進行を抑制する securin の増加を認めた ($P < 0.01$)。

さらに KPYB10602 添加により DNA の断片化が検出され、アポトーシス実行因子である Bax の増加 ($P < 0.01$) および抗アポトーシス因子である survivin の減少 ($P < 0.01$) を認めた。

動物実験では、非投与群と比較して投与群において腫瘍の増大スピードを有意に抑制する結果となった。非投与群と比較して有意な体重減少は見られなかった。

考察

ドセタキセルやパクリタキセルなどのタキサン系微小管阻害薬は乳癌治療において広く使用されている薬剤である。タキサンは微小管に直接作用し紡錘体の形成を阻害する事で、細胞周期を停止させアポトーシスを誘導する。しかし、微小管を直接ターゲットとするため、軸索内微小管の障害による末梢神経障害を高頻度で発症し、さらに β -tubulin の薬剤結合部位の変異および P-glycoprotein の過剰発現による薬剤抵抗性などの理由で、減量や中止、薬剤の変更を余儀なくされる事も少なくない。

KSP 阻害薬は微小管上のモータータンパクである KSP の APTase 阻害剤である。KSP は分裂細胞のみで発現するため、分裂後の神経細胞には影響せず、さらに P-glycoprotein から排泄されない為、過剰発現による抵抗性も認めないとされている。

本研究により、新規合成 KSP 阻害薬 KPYB10602 は、ヒト乳癌細胞において *in vitro* および *in vivo* で抗腫瘍効果を示す結果となった。その背景として、双極性の紡錘体形成の抑制による染色体の分離停止が確認され、さらに G2/M 期の増加から分裂期での停止が示唆された。また KPYB10602 添加による DNA の断片化を認め、さらにミトコンドリアから放出されるアポトーシス関連因子の Bax の増加を認めた。

以上から、KPYB10602 の抗腫瘍効果のメカニズムとして、分裂期の停止によるミトコンドリアを介したアポトーシスの誘導が示唆された。

結論

本研究により、新規合成 KSP 阻害薬 KPYB10602 が乳癌細胞に対して抗腫瘍効果を持つ可能性が示唆された。なお、本論文が KPYB10602 の乳癌細胞に対する抗腫瘍効果に関しては初めての報告である。