

論文題目

レチノイン酸誘導体 Am80 による難治性肺疾患に対する新しい治療方法の開発

秋田 智后

論文要約

難治性肺疾患の中でも肺がん及び慢性閉塞性肺疾患(COPD: chronic obstructive pulmonary disease)は喫煙を主な発症原因とし、現在、世界の死亡原因の上位を占めている。また、COPD と肺がんを併発している患者は約 30% と比較的多く、両疾患を効果的に治療可能な薬剤の開発は急務の課題である。COPD は、慢性気管支炎による気管支の閉塞及び肺気腫による肺胞の不可逆的な構造破壊によって慢性的かつ持続的に閉塞性換気傷害を呈する疾患である。患者数は増加する一方であるが、現在の治療法は対症療法のみである。一方、肺がんも現在増加傾向にあり、再発や転移の多い予後不良の疾患である。今後も予想される患者数、死亡者数の増加をくい止めるためには、COPD における破壊された肺胞を修復し根治する方法及び肺がんの再発・転移を防ぎ根治する方法を確立する、効果的な新規治療薬の開発が望まれる。本論文では、COPD 及び肺がんに対する有効な治療薬を見出すため、レチノイン酸誘導体 Am80 に着目し、難治性肺疾患に対する新規治療薬としての可能性を検討した。

第一章では、COPD に対する Am80 の有用性を検討することを目的に、エラスターゼ肺気腫誘導モデル及びアディポネクチンノックアウト(AdKO)マウスを用い肺気腫改善効果の検討を行った。まず、エラスターゼ肺気腫誘導モデルを用いて検討を行った。6週齢の雄性 ICR マウスを用いてエラスターゼ(4.05 U)を週 2 回投与することで肺気腫を誘導し、薬物投与はエラスターゼ投与から 1 週間後に開始した。Am80 (1.0 mg/kg)を週 2 回 2 週間経肺投与することによる肺気腫改善効果を、小動物用 X 線 CT 装置を用いて評価した。肺傷害の程度を示す平均 CT 値は、Am80 投与 2 日後において、対照群が -506 ± 22 HU に対し Am80 投与群が -439 ± 19 HU となり、Am80 投与群において有意に増加した。

肺全体に対する傷害を示す低吸収領域割合(LAA%)は、対照群が $20.5 \pm 7.6\%$ に対し Am80 投与群が $2.65 \pm 0.77\%$ となり、Am80 投与群において有意に減少し

た。これらの結果より、X線 CT による評価では有意な肺傷害の修復効果が得られた。さらに、Am80 を 2 週間投与したマウスより肺を摘出して肺組織切片を製作し、組織化学染色を用いた肺胞壁間距離(Lm)による評価を行った。その結果、対照群が $68.0 \pm 3.8 \mu\text{m}$ に対し Am80 投与群で $46.8 \pm 1.8 \mu\text{m}$ であり、Lm 値が有意に減少した。以上の結果から、Am80 はエラスターゼ肺気腫誘導モデルに対し肺気腫改善効果を有することが明らかとなった。

次に、新規 COPD モデルマウスを用い肺気腫改善効果の検討を行った。近年、COPD 患者においてアディポネクチン量の減少が報告されている。このアディポネクチン遺伝子をノックアウトしたアディポネクチンノックアウト(AdKO)マウスは、加齢に伴い肺気腫症状を呈し、COPD の全身症状も呈することが明らかとなっている。このことから、AdKO マウスはヒトの病態により近い優れたモデルであると考えられる。この AdKO マウスに対する Am80 の肺気腫改善効果及び長期投与の安全性を検討した。 52 ± 2 週齢の雄性 AdKO マウスに Am80 (0.5 mg/kg)を週 2 回 28 週間経肺投与することによる肺気腫改善効果を、小動物用 X 線 CT 装置を用いて評価した。投与終了後の 80 週齢時における肺体積、平均 CT 値、LAA%はいずれも対照群に対する有意な差はみられなかったものの、肺気腫改善効果の傾向を示すことが示唆された。また、同装置を用い、骨量及び脂肪量を測定した。骨量については、胸部、腹部、大腿骨それぞれにおける皮質骨密度、界面骨密度、全骨密度、平面骨密度を解析した。脂肪量については、腹部及び大腿骨それぞれにおける総脂肪量、内臓脂肪量、皮下脂肪量を解析した。その結果、対照群と Am80 投与群の間に有意な差はみられず、Am80 はこれらの症状に対し影響を及ぼさず、治療効果も示さないものと考えられる。一方、Lm による評価では、対照群が $46.3 \pm 2.3 \mu\text{m}$ であったのに対し、Am80 投与群では $34.4 \pm 1.7 \mu\text{m}$ であり、Lm 値が有意に減少した。以上の結果より、Am80 が AdKO マウスに対し、肺胞壁間距離を有意に減少させ、肺気腫改善効果を有することを明らかとした。以上の結果より、Am80 は新規 COPD モデルにおいて、肺胞修復効果を有し、長期投与での安全性が高いことが示唆された。

第二章では、肺がんに対する Am80 の有用性を検討することを目的に、肺がん細胞に対する細胞増殖抑制効果の検討を行った。まず、ヒト肺がん細胞株 A549 を用い検討を行った。Am80 (10, 50, 100, 200 μM)を A549 細胞に 2, 4, 6 日間処置し、ATP 量を測定することにより細胞増殖抑制率を算出した。また、Am80 (200 μM)を 1 日間処置し、TUNEL 染色により初期アポトーシス細胞の検出を行

った。その結果、濃度、時間依存的に細胞の増殖抑制率は増加したが、アポトーシス細胞数は対照群と Am80 処置群の間に有意な差はみられなかった。この結果から、Am80 はアポトーシスを誘導せずに細胞の増殖を抑制することが示唆された。Am80 の細胞内動態について、細胞内レチノイン酸結合タンパク質 (CRABP: cellular retinoic acid-binding protein) に着目し検討を行った。CRABP には I と II の 2 種類が知られており、CRABP-I の発現はレチノイン酸の代謝に、CRABP-II の発現はレチノイン酸の受容体を介した遺伝子の転写活性調節に関連することが報告されている。A549 細胞に Am80 (50 μ M) を 6 日間処置したところ CRABP-II の mRNA 発現量が有意に増加し、Am80 (10 μ M) を 60 分処置したところタンパク質発現量が有意に増加した。一方、CRABP-I 発現量については遺伝子、タンパク質量ともに変動がみられなかった。以上の結果から、Am80 は核内移行シグナルである CRABP-II の発現を増加させることが示唆された。

次に、ヒト未分化肺がん細胞株 Calu-6 に対する分化誘導効果及び抗腫瘍効果を検討した。近年、がん細胞が治療抵抗性を示す要因として、がんは均一な細胞集団ではなく、一部の細胞が高い自己複製能と多分化能をもつ幹細胞として存在するとされており、がん幹細胞はがんの転移や再発の原因となることが考えられる。そこで、幹細胞様の特徴を持つ未分化細胞を悪性度の低い分化細胞に誘導することができる薬剤はがんの根治につながる可能性があると考え検討を行った。Am80 の未分化肺がん細胞に対する分化誘導効果を評価するため、Am80 (100 μ M) を Calu-6 細胞に 6 日間処置したところ、未分化細胞の割合が減少し、分化細胞割合が有意に増加した。また、Calu-6 細胞もアポトーシスによる細胞死を介さずに細胞の増殖が抑制されることが確認された。Calu-6 細胞を用いて担がんマウスモデルを作製し、Am80 の抗腫瘍効果を評価した。5 週齢の雄性ヌードマウス背皮下に Calu-6 細胞を 6×10^5 個移植して皮下腫瘍を作製し、Am80 (0.2 mg/kg) を週 2 回、4 週にわたり腫瘍内局所投与して経時的に腫瘍体積を測定した。投与開始から 4 週間後の腫瘍体積は対照群で $832 \pm 239 \text{ cm}^3$ 、Am80 投与群で $239 \pm 218 \text{ cm}^3$ となり、腫瘍の成長が有意に抑制された。これらの結果より、Am80 により未分化肺がん細胞 Calu-6 の分化が誘導され、腫瘍の成長が抑制されることを明らかにした。以上の結果より、Am80 は新規の肺がんに対する分化誘導療法剤として有用であることが示唆された。

最後に、抗体修飾リポソームを用いた Am80 の低用量化、CD90 発現細胞への

ターゲティング化を目的に、その細胞選択性、細胞増殖抑制効果、抗腫瘍効果を評価した。抗体修飾リポソームの細胞選択性について、CD90 を発現していた Calu-6 細胞と発現の弱かった A549 細胞における細胞内取り込みを免疫染色法にて検討した。処置 64 分後まで経時的に観察を行った結果、抗体修飾リポソームは Calu-6 において取り込みが増加し、CD90 発現細胞選択的に取り込まれることが示唆された。また、抗体修飾リポソームによる Calu-6 細胞に対する細胞増殖抑制効果を評価したところ、未封入時に比べ低用量でより高い増殖抑制効果を示した。最後に抗体修飾リポソームの抗腫瘍効果を検討した。ヌードマウスに、Calu-6 による腫瘍を作成した後、0.1 mg/kg の Am80 封入抗体修飾リポソーム溶液を週 2 回、腫瘍内局所投与し腫瘍体積の変化を観察した。その結果、Am80 を封入した抗体修飾リポソーム投与により Control と比較し、腫瘍体積が有意に減少した。以上の結果より、Am80 をリポソーム化し抗体修飾することでヒト未分化肺がん細胞に対するターゲティング及び Am80 低用量化に成功した。

本研究の成果は、幹細胞及び未分化細胞の分化誘導を基盤とし、難治性肺疾患である肺がんや COPD を同一の薬剤で根治させる新しい根治的治療戦略を提案するものである。また、この戦略は根治薬の開発に繋がるだけでなく、難治性肺疾患における幹細胞や未分化細胞に着目した新たな視点の研究であり病態の発症機構や関係性の解明に大きく貢献できるものと考えられる。