

氏名(本籍)	ふな やま やす のり 船 山 康 則 (茨城県)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 乙 第 1,287 号
学位授与年月日	平成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
審査研究科	医 学 研 究 科
学位論文題目	トポイソメラーゼ阻害物質 (スラミン, ヘテロサイクリックアミン類) 癌細胞株に対する増殖抑制作用と酵素阻害作用についての検討
主 査	筑波大学教授 医学博士 三 輪 正 直
副 査	筑波大学教授 医学博士 大 塚 藤 男
副 査	筑波大学教授 医学博士 久 保 武 士
副 査	筑波大学教授 薬学博士 後 藤 勝 年
副 査	筑波大学助教授 医学博士 赤 座 英 之

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

DNA トポイソメラーゼは DNA 鎖の一時的な切断と再結合を介して DNA の高次構造の変換を触媒する一群の酵素であり, DNA の複製, 転写, 組み換え反応や染色体の凝集・分離過程において重要な役割を担っている。トポイソメラーゼ II は抗癌剤の重要な標的のひとつであり, 多くのトポイソメラーゼ II 阻害剤が臨床で用いられている。また, 近年トポイソメラーゼ I 阻害剤も臨床で使用されるようになってきている。これらの抗癌剤の作用機序の多くは DNA に切断が入った状態でのトポイソメラーゼ-DNA 共有結合複合体の安定化によるものであるが, トポイソメラーゼは DNA 代謝の様々な段階に作用しており, トポイソメラーゼ阻害剤の作用機序, 耐性機序を検討することにより, 癌化学療法における DNA 代謝の関与について新たな知見が得られるものと考えられる。本研究ではシグナル伝達機構に作用する物質であるスラミンのトポイソメラーゼ II に対する作用機序と DNA の除去修復を阻害する作用のあるヘテロサイクリックアミン類のトポイソメラーゼに対する作用を検討した。

(対象と方法)

スラミンを用いた検討では, 細胞増殖抑制効果は MTT assay を用いて評価した。トポイソメラーゼ II をスラミンに対する感受性の最も高かった PC-9 から 0.35 M の NaCl を用いて粗抽出し, その活性を decatenation assay により測定した。またトポイソメラーゼ II の発現量とリン酸化チロシン残基をそれぞれのモノクローナル抗体を用いた immunoblotting 法により測定した。Cleavable complex は SDS/KC1 を用いた沈降法により測定した。トポイソメラーゼ II のリン酸化は粗核抽出物を [γ - 32 P] ATP, スラミンと共に 37°C, 5 分間インキュベートし, 170 kD の蛋白質の放射活性を測定することによって評価した。プロテインキナーゼ C の活性は G1 ペプチドのリン酸化を薬剤により抑制させて測定した。

ヘテロサイクリックアミンのトポイソメラーゼ I および II に対する抑制作用は, DNA relaxation assay および decatenation assay を用いて検討した。DNA に対するインターカレーションの程度は DNA unwinding 法を用いて測定した。

(結果)

1. スラミンはヒト肺癌株に対して 160~350 μ g/ml の濃度で増殖抑制効果を示したがシスプラチン耐性株や P

糖蛋白質の発現しているエトポシド耐性株には交差耐性を示さなかった。

2. PC-9細胞を用いた検討によるとスラミンは、(1)約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でトポイソメラーゼⅡの酵素活性を抑制した。(2)トポイソメラーゼⅡの発現量、cleavable complex 形成量に変化を与えなかった。(3)トポイソメラーゼⅡのリン酸化を濃度依存的に阻害し、プロテインフォスファターゼ阻害剤であるオカダ酸の存在下でも同様にリン酸化は抑制された。(4)プロテインキナーゼCの活性を濃度依存的に抑制した。
3. Trp-P-1, Trp-P-2はDNAにインターカレートする濃度でトポイソメラーゼⅠおよびⅡを阻害した。ハルマン, ノルハルマンはTrp-P-1, Trp-P-2よりも10~100倍高い濃度でトポイソメラーゼ阻害作用を示した。これらの薬剤はトポイソメラーゼⅡとcleavable complexを形成しなかったが、DNAに対するインターカレーション活性を示した。

(考察)

1. スラミンは、プロテインキナーゼCを介したトポイソメラーゼⅡのリン酸化を阻害することによって、酵素活性を阻害している可能性が示唆された。この作用は既存のトポイソメラーゼⅡ阻害剤の作用機序とは異なっている可能性がある。
2. ヘテロサイクリックアミン類, 特にTrp-P-1やTrp-P-2はインターカレーション活性によってトポイソメラーゼ活性を阻害している可能性があり, またTrp-P-1のDNA除去修復阻害作用とトポイソメラーゼ活性の阻害作用とが関係している可能性がある。

これらの物質は、既存の物質と異なる新たな作用機序によってトポイソメラーゼ活性を阻害している可能性がある。また、今後の検討により、効果的な併用化学療法や、DNA代謝と抗癌剤の作用との関係について、より一層重要な知見が得られるものと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、DNAトポイソメラーゼに作用する物質の中で、シグナル伝達系に作用するスラミンの作用機構を解析したものである。その結果、スラミンは既存の抗癌剤とは異なり、トポイソメラーゼⅡの活性化に必要とされるリン酸化を阻害することを明らかにした。また、変異原物質であるヘテロサイクリックアミン類のトポイソメラーゼⅠおよびⅡに対する阻害機構を調べた結果、トポイソメラーゼ-DNA共有結合複合体の安定化によるものではなく、DNAへのインターカレーションによることが示唆された。以上の結果は、トポイソメラーゼ阻害剤の抗癌剤として作用する際の、新しいターゲットを示唆するものとして価値あるものと考えられた。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものとする。