

## 新規 GGCT 阻害剤を用いた新しいがん治療戦略の創生

### 研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	い い ひろみ 飯居 宏美
所属等	病態薬科学系臨床腫瘍学分野
プロフィール	私は、現在六歳になる女兒の母親です。大学院と博士研究員として留学先でしていた研究領域とは異なる分野で助教として現職に就任し、まだ間もないころに結婚・出産をしたことから、外部研究資金の獲得も難しい状況です。しかし、共同研究者や上司に恵まれ自由に研究に取り組めたことから、いつも前向きに研究を進めてきました。女性が仕事をすることが当たり前で、家庭と仕事を両立できる社会がこれからの日本の科学技術、医療を支える力となると信じています。今後も、明るく前向きに研究も子育ても頑張りたいと思っています。

### 1. 研究の概要

本研究では、申請者らが開発した新規 $\gamma$ -glutamylcyclotransferase (GGCT) 阻害剤、pro-GA を用いて、がん細胞増殖への GGCT の寄与とその阻害による抗腫瘍効果のメカニズムの解明を目指し、以下の3つ実験を計画した。

1. 担癌マウスにおける pro-GA の抗腫瘍効果。
2. GGCT 代謝産物のがん細胞増殖に対する寄与。
3. Pro-GA によるグルタチオン減少と脂質酸化増大の細胞老化への関与。

本研究では GGCT 阻害が担癌動物においても治療効果として再現できるかが最重要ポイントであった。さらに、GGCT がどのようにがん細胞増殖に寄与しているかを GGCT 代謝産物に着目して検討した。また pro-GA 処理下において GGCT の代謝産物より合成されると考えられているグルタチオンの減少ががん細胞増殖抑制に関与するか、という点を明らかにすることが必要と考え、研究を進めた。

### 2. 研究の動機、目的

悪性腫瘍患者が増加の一途を辿っており、有用な抗癌剤開発が望まれている。数々の分子標的薬や新規化学療法薬などが上市されてきたが、残念ながらその効果は限定的、かつ、短期的で、一方、有害事象は比較的高度である。よって申請者はその問題の解決のため、正常細胞に影響の少ない、つまり副作用の少ない効果的な分子標的治療薬の開発を目指している。申請者の標的としている GGCT の阻害剤は、従来の薬剤が提唱するアポトーシス細胞死とは異なる新規の細胞死機構を介しての抗がん作用をもつ可能性のある分子である。多種の腫瘍でその高発現は確認されており、このたび創出した化合物で治療効果が実証されれば、多岐にわたる癌種にも有効な新規抗癌治療薬の創出が期待できると考えた。さらに、新薬の開発には、その抗腫瘍効果メカニズムの解明も必須である。よって、申請者らは GGCT の代謝産物に注目し、GGCT 代謝産物である 5-オキシプロリン、または、システインの pro-GA によるがん細胞増殖抑制効果に対する関与についても検証した。

### 3. 研究の結果

#### 1. GGCT 阻害剤投与担癌マウスにおける GGCT 阻害剤の抗腫瘍効果と毒性の評価

前立腺癌細胞株 PC-3 細胞または乳がん細胞株 MCF7 細胞を SCID マウス皮下または、乳腺に移植し、担癌マウスに 50 mg/kg で pro-GA を週に 2 回腹腔投与し、抗腫瘍効果を検討した。また、マウスにおける腫瘍形成抑制効果と体重の変化を見るとともに正常組織や正常細胞に対する障害の有無について、肺、腎臓、肝臓組織を採取して HE 染色し評価した。

結果、PC3 細胞担癌マウスにおいて pro-GA による抗腫瘍効果が見られた(図 1A)。さらに、コントロール群と比較し、pro-GA 投与群マウスでの顕著な体重減少は見られず(図 1B)、また、肺、腎臓、肝臓においても顕著な障害は見られなかった(図 1C)。MCF7 細胞担癌マウスにおいても同様の結果が得られた(データは示していない)。よって、pro-GA の生体内での安全性とその抗腫瘍効果が立証できた。

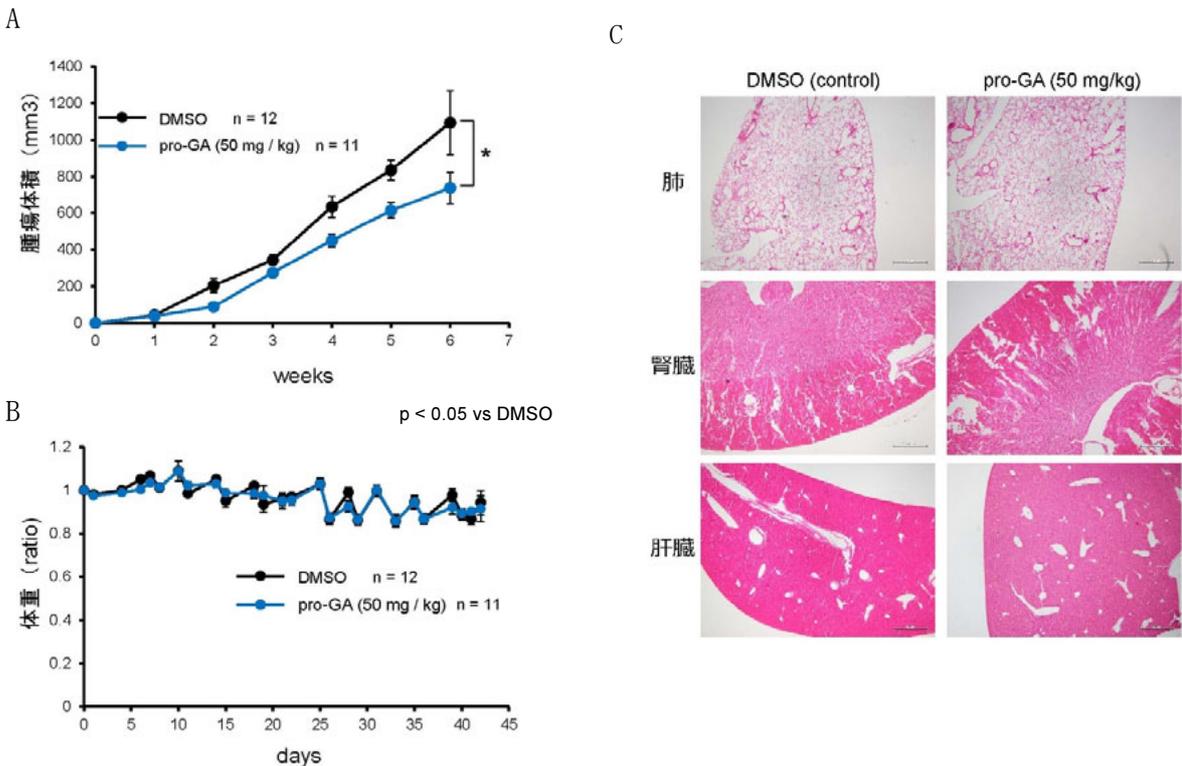


図 1. PC3 細胞担癌マウスにおける pro-GA の抗腫瘍効果

#### 2. GGCT 代謝産物のがん細胞増殖に対する寄与

GGCT は、 $\gamma$ -glutamyl アミノ酸を基質として、5-oxoproline と遊離アミノ酸を産生する酵素である。よってまず、GGCT 代謝産物の内、基質のアミノ酸に寄らず供給される 5-オキソプロリンを添加し、pro-GA による細胞増殖抑制が回復するか検討した。その結果、5-オキソプロリンの添加による pro-GA のがん細胞増殖抑制効果の回復は見られず(図 2A)、がん細胞の増殖に GGCT による 5-オキソプロリンの供給が関与する可能性は低いと考えられた。一方、 $\gamma$ -glutamyl サイクルの構成因子には、グルタチオンの前駆体である  $\gamma$ -グルタミルシステインが知られており、GGCT は、 $\gamma$ -グルタミルシステインの分解を行う酵素であること、また反対にグルタチオンの合成に使われるシステインの供給をすると考えられてきた。本研究では、細胞内にシステインを供給する *N*-アセチルシステインをもちい、pro-GA による細胞増殖抑制効果がシステインの補充により回復するか検討したところ、明らかな回復効果が見られた(図 2B)。よって、pro-GA によるがん細胞増殖抑制効果には、細胞内システイン濃度が関与している可能性があると考えられた。今後は、細胞内のシステインの量を測定するべきだと考えている。

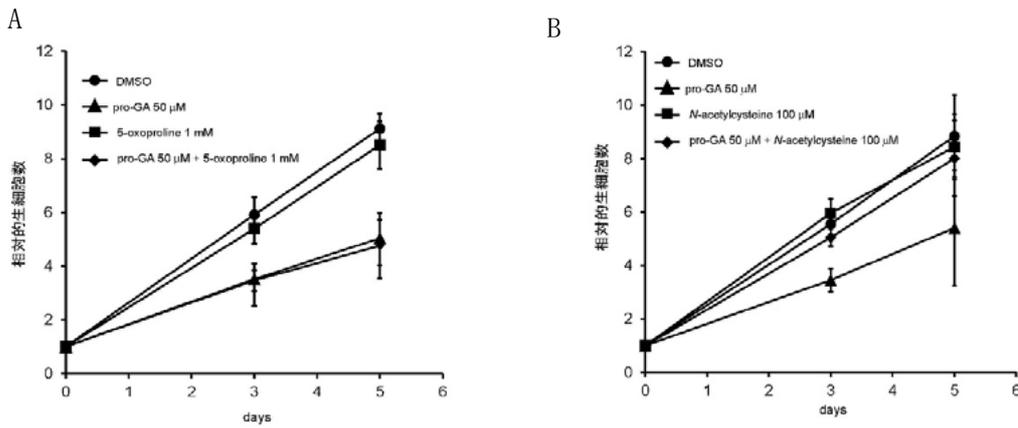
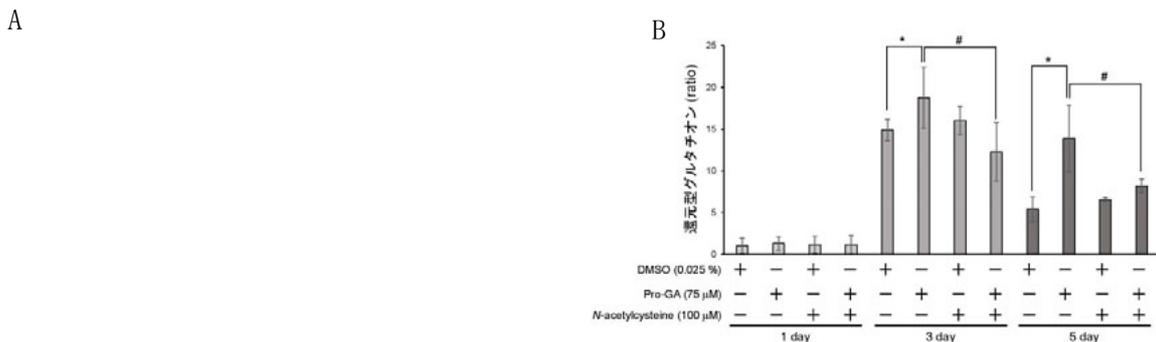


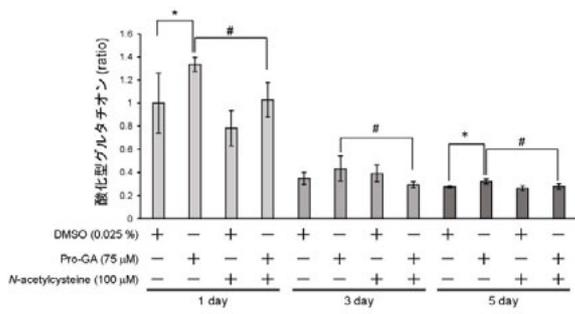
図 2. 5-オキソプロリン(A)または *N*-アセチルシステイン (B) の pro-GA による細胞増殖抑制効果に対する回復効果

### 3. GGCT 阻害による GGCT 代謝産物のグルタチオンの変動

これまでに pro-GA を処理すると、細胞増殖の抑制が見られ、さらに細胞老化が誘導されることを見出している。よって、GGCT 阻害時に細胞内で変化すると考えられるグルタチオンの減少とそれに伴う脂質酸化の増大が細胞老化誘導メカニズムに関与すると予想し、まずは、pro-GA 処理による経時的なグルタチオンの変動について検討した。図 3 では、pro-GA を 1、3、5 日処理した細胞由来のグルタチオン量を測定し、1 日目のコントロールを 1 としたときの相対量の酸化型グルタチオンを A に、還元型グルタチオンを B に示した。結果、予想に反し、pro-GA 処理によりコントロールに比べて酸化型、還元型ともに増大傾向を示した。このことは、GGCT 阻害により細胞内グルタチオンの減少が誘導されることが細胞増殖抑制に寄与すると考えていた予想とは反対の結果であった。また、面白いことに、酸化型グルタチオンは経時的に減少し、還元型グルタチオンは、3 日目に一番高値を示し、5 日目には減少傾向が見られた。細胞は酸化ストレスを受けると酸化型グルタチオンから還元型グルタチオンに変換されることから、その変化率は、酸化ストレスのマーカーとなることが知られている。さらに、その酸化ストレスは、細胞老化現象を不可逆的に保つのに寄与しているという報告があることから、pro-GA による細胞増殖抑制効果との関連性も理にかなっている。本研究の結果から、細胞は培養中に増殖とともに酸化ストレスに曝され、酸化型のグルタチオンは減少していくのではないかと考えている。また、そのことが pro-GA による細胞老化誘導を不可逆的に調節している可能性もあると考えている。*N*-アセチルシステインの処理による結果については、*N*-アセチルシステインが活性酸素の除去作用を有することから、pro-GA による還元型細胞内グルタチオン量の増大とともに活性酸素が増大するが、その活性酸素を *N*-アセチルシステインが抑制していることによって、細胞増殖が回復する可能性があると考えられる。

よって今後、活性酸素種代謝の一翼を担う、システインを含むγ-グルタミルサイクル構成因子に対する代謝ストレスが pro-GA によるがん細胞増殖抑制・細胞老化誘導に関与するかを明らかにする必要があると考えている。





\*p < 0.05 vs DMSO, #p < 0.05 vs pro-GA (75 μM)

#### 4. これからの展望

本研究成果は、GGCT 阻害が抗腫瘍効果を示し、その機序には、細胞内システインの変動が関与すると考えられた。これまで GGCT は、グルタチオン合成に必要なシステインの供給酵素としても、グルタチオン前駆体であるガンマグルタミルシステインの分解にも関与すると考えられていたので、GGCT の阻害が細胞内グルタチオンを増大させるか減少させるかは不明であった。本研究により GGCT 阻害は細胞内に抗酸化物質であるグルタチオンの産生を増大させることが判明した。一方、*N*-アセチルシステインは、活性酸素除去作用を有することから、GGCT 阻害による細胞増殖抑制効果に GGCT 阻害による活性酸素の増大が関与している可能性が考えられた。よって、活性酸素の関与は今後検討していくべき課題である。また、細胞内グルタチオンの増大は、細胞内活性酸素の増大に伴う代償作用による現象の可能性もあることから、まだ測定することが出来ていない脂質酸化も指標に細胞老化と関連性を検証していきたい。さらに、今回私達が開発した pro-GA の *in vivo* での効果を確かめられたことで、より一層生体内での安定性を高めた GGCT 阻害剤の開発も必要だと考えた。よって、現在 GGCT 阻害化合物のスクリーニングにより GGCT を阻害する低分子化合物も見出している。今後は、その低分子化合物の有用性に関して研究を発展させていきたいとも考えている。

#### 5. 社会に対するメッセージ

本奨励金により進めた研究成果は、GGCT 阻害剤の新規がん治療薬としての有用性を示したと考えられます。これまでの研究により、GGCT の阻害が生体内で高度な有害事象を示さず、がんの増殖を抑制すると考えられ、今後の開発を進める大きな後ろ盾となるデータが得られたと思われまます。ここまで研究を進められたのは、他の研究資金を一つも獲得できていなかった私が本奨励金を頂き、一筋の希望を持てたからです。女性であるという事は、研究者としてそれだけで不利であるという意見も何度も聞いたり言われたりしてきました。後世の女性の研究者達がそのような暴言に悩まされることなく、自身の力を存分に発揮するためには、女性だからこそ獲得できる研究助成金は非常に重要です。今後もどうか本奨励金によって勇気づけられた女性研究者が活躍できるよう、奨励金に対するご支援をお願いしたいと存じます。どうぞよろしくお願い致します。