

氏 名 (本籍) はら かずき  
**原 一樹** (鹿児島県)

学 位 の 種 類 博士 (薬学)

報 告 番 号 甲第 1464 号

学位授与の日付 平成 25 年 9 月 13 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当 (課程博士)

学 位 論 文 題 目

**超分子化合物 [2]Rotaxane のカスパーゼシグナル  
伝達を介したアポトーシス誘導性細胞死に関する研究**

|              |      |    |       |
|--------------|------|----|-------|
| 論文審査委員 (主 査) | 福岡大学 | 教授 | 小野 信文 |
| (副 査)        | 福岡大学 | 教授 | 見明 史雄 |
|              | 福岡大学 | 教授 | 高野 行夫 |
|              | 福岡大学 | 教授 | 山野 茂  |

超分子化合物[2]Rotaxane のカスパーゼシグナル伝達を介した  
アポトーシス誘導性細胞死に関する研究

原 一樹

福岡大学薬学部医薬品情報学教室, 福岡市城南区七隈 8 丁目 19-1

**Research on apoptotic cell death through the caspase signaling pathway of the  
supramolecular substance, [2] rotaxane**

Kazuki Hara

Medicinal Informatics and Research Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka  
University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

**Abstract**

We studied the influence of novel supramolecular substance, [2] rotaxane (TRO-A0001), on caspase signaling and cell viability in melanoma and colon cancer cell lines. TRO-A0001 suppressed concentration-dependently in the proliferation of cancer cells. The morphological analysis demonstrated that TRO-A0001 increased the levels of apoptotic cells. The expression of cleaved-form caspase-3 and PARP was significantly increased in cells exposed to TRO-A0001. The expression of Bax was increased by TRO-A0001. Furthermore, the downregulation of Bax by siRNA resulted in growth activation. These results suggest that TRO-A0001 induces apoptosis in cancer cells and holds potential as a new anti-tumor medicine.

**Keywords:** [2] rotaxane, supramolecular substance, apoptosis, caspase

## <研究背景>

超分子 (supramolecule) は、複数の分子が集合体あるいは複合体を形成し、構成分子単体では持ち得ない特定の機能や構造を獲得している物質である。分子認識の概念が認知されるようになり、多岐にわたる分野において超分子構造の研究が進められており、ロタキサンを代表とする超分子化合物の合成研究も発展を続けている。

ロタキサンやポリロタキサンは、細胞への薬物や遺伝子の送達にも応用されている。シクロデキストリン環とポリエチレングリコールで合成されたポリロタキサンを用いて、薬剤やDNAなどの遺伝子を細胞内に導入するドラッグデリバリーへの応用研究が報告されている。このように、医療分野への有用性が期待されている中で、ロタキサン化合物が生体へ及ぼす作用は、未だ明らかになっていないことが課題である。

このロタキサンの中でも、Fig. 1 に示した新規合成した[2]rotaxane (TRO-A0001) に注目し、マウスとヒト由来のメラノーマおよび大腸がん細胞株に対して、有効な抗がん剤であるかを目的として研究を行った。

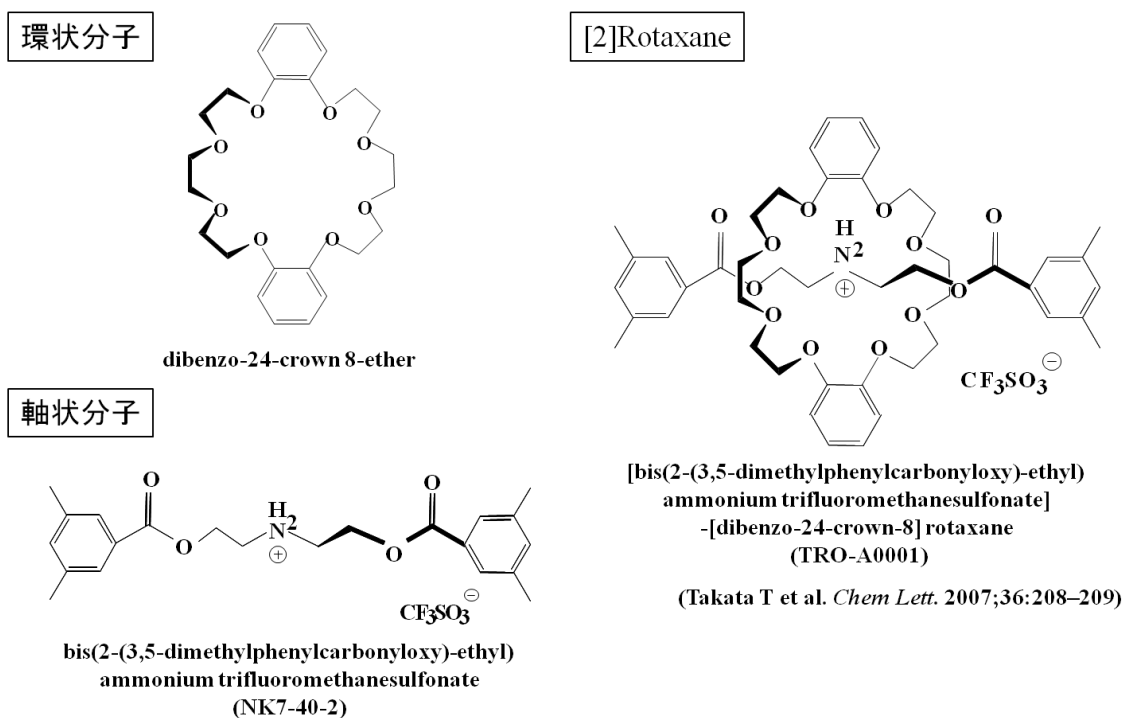


Fig.1 [2]Rotaxane およびその構成分子の構造

## <研究内容>

### 1. TRO-A0001 の腫瘍細胞増殖に及ぼす効果

メラノーマ、大腸がん細胞の細胞増殖へ及ぼす効果について TRO-A0001、その環状構成分子である dibenzo-24-crown 8-ether、ならびに直鎖状分子である NK7-40-2 分子のそれぞれについて検討した。

(1) TRO-A0001 の細胞増殖に及ぼす影響

マウス由来の腫瘍細胞 B16/BL6 (メラノーマ)、Colon-26 (大腸がん) では、TRO-A0001 濃度 1.0 $\mu$ M より高濃度で、またヒト由来の腫瘍細胞 DLD-1 (大腸がん)、G361 (メラノーマ) においては TRO-A0001 濃度 0.5 $\mu$ M より高濃度で細胞生存率を抑制した (Fig.2)。

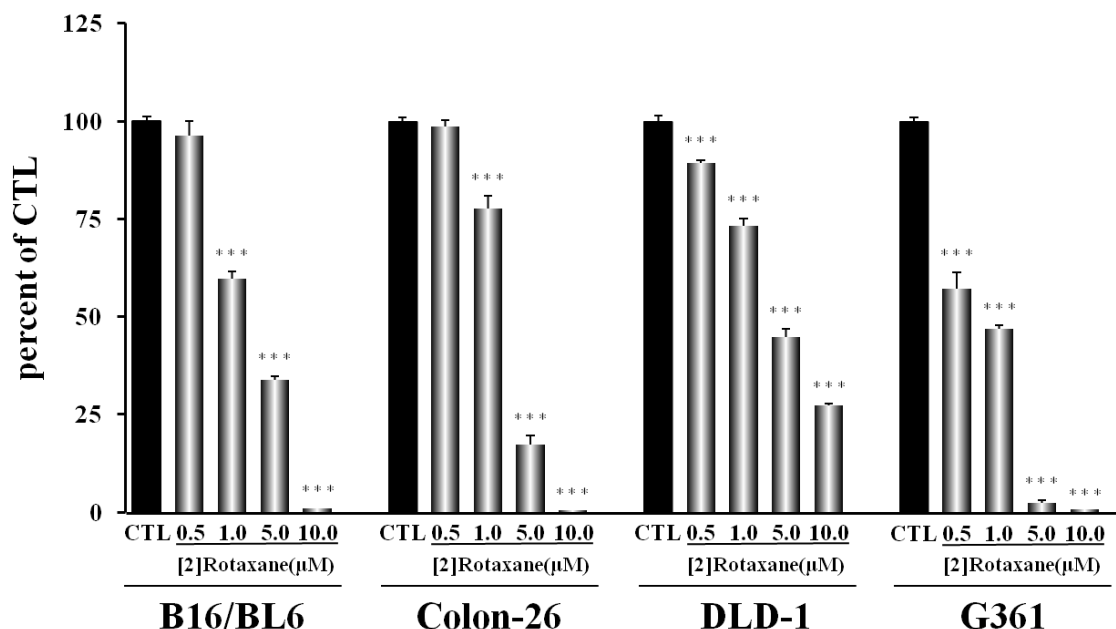


Fig. 2 TRO-A0001 暴露後 24 時間経過時の細胞生存率

(2) Dibenz-24-crown 8-ether、NK7-40-2 の細胞増殖に及ぼす効果

Dibenz-24-crown 8-ether、NK7-40-2 分子は細胞生存率に変化を及ぼさなかった。また、Dibenz-24-crown 8-ether、NK7-40-2 分子を同時に暴露させても、細胞生存率に変化を及ぼさなかった。

2. TRO-A0001 が引き起こす細胞死の形態学的検討

TRO-A0001 が引き起こす細胞死の形態学的特徴について細胞核や細胞骨格の形態変化を検討した。また、アポトーシス細胞を検出するため、Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling (TUNEL)染色を行った。

(1) 細胞核、細胞骨格染色

ファロイジンを使用した F-アクチン染色で細胞質繊維状態及び細胞骨格の変化を観察した。TRO-A0001 を添加した細胞では全ての細胞に共通して細胞骨格の外環が細長く縮小している状態や円形状に縮小している状態が認められた。

細胞核は Hoechst33342 試薬を使用して染色を行った。TRO-A0001 を添加した細胞に濃染された核凝縮様の状態が見られる細胞種があるものの、クロマチン凝集体や小球状の断片化核小体集合像は観察されなかった。

## (2) TUNEL 染色

アポトーシスによって DNA 断片化を検出するため TUNEL 染色を行った。TRO-A0001 を暴露した全ての細胞で、TUNEL 陽性細胞数の明らかな増加が認められた。

## 3. TRO-A0001 がアポトーシス関連タンパク質発現に及ぼす変化

TRO-A0001 が引き起こす細胞死が、形態学的にアポトーシス性細胞死であることから、カスパーゼシグナル伝達の活性化を検討するため、エフェクターカスパーゼである caspase-3, -7 タンパク質発現について検討した。

さらに、TUNEL 染色で DNA 断片化を引き起こしていることが示唆されたため、DNA 修復に関与する poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) タンパク質発現について検討した。

また、ミトコンドリアに関与するアポトーシスシグナル伝達における Bcl-2-associated X protein(Bax)タンパク質発現を検討した。さらに、Bax タンパク質の発現を低下させることで、アポトーシスの進行を抑制することが考えられるため、Bax タンパク質発現を低下させた細胞では、アポトーシス性細胞死が抑制されるかを検討した。

### (1) エフェクターカスパーゼ発現

全ての細胞における cleaved caspase-3 タンパク質は、Control 群ではほとんど発現がみられなかったことに対し、TRO-A0001 暴露群での発現増加がみられた。

ヒト由来の DLD-1、G361 での cleaved caspase-7 の発現は Control 群と比較すると、TRO-A0001 暴露群に発現増加がみられた。

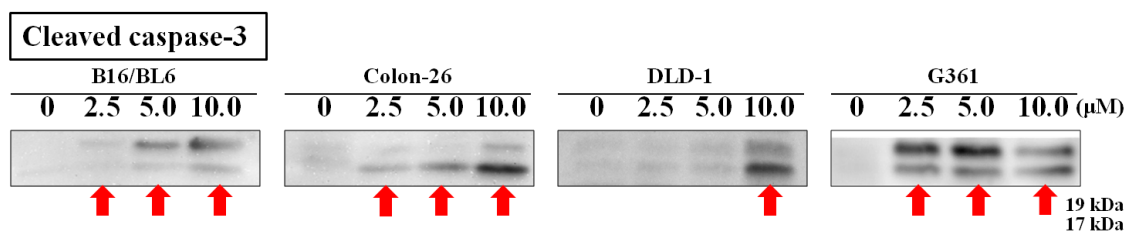


Fig.3 TRO-A0001 暴露後の Cleaved caspase-3 発現

### (2) PARP タンパク質発現

全ての細胞における cleaved PARP タンパク質は、Control 群ではほとんど発現がみられなかったことに対し、TRO-A0001 暴露群の発現増加がみられた。



Fig.4 TRO-A0001 暴露後の Cleaved PARP 発現

### (3) Bax タンパク質発現の変化と細胞生存への影響

B16/BL6細胞のBaxタンパク質発現はControl群と比較して同等であった。一方、Colon-26、G361 および DLD-1 細胞のBaxタンパク質発現は、Control群と比較して増加する傾向がみられた。

B16/BL6細胞、Colon-26細胞及びDLD-1細胞において、Bax siRNA処理を行った細胞はControl siRNAで処理した細胞と比較して、TRO-A0001暴露による細胞生存率を有意に改善した。一方、G361細胞は同様の条件下でTRO-A0001暴露による細胞生存率を改善する傾向はみられたものの、統計的に有意な差はみられなかった。

#### <総括>

本研究の結果から明らかとなった、メラノーマや大腸がん細胞における、ロタキサンのカスパーゼシグナル伝達を介するアポトーシスは、抗腫瘍薬としての応用が十分に期待できると考える。ロタキサンの有する特徴的な構造と構造分子のバリエーションによって、将来数多くのさらに有効な抗悪性腫瘍薬の開発が期待される。

## 審査報告書

本論文は既存の医薬品には見られない新規構造を特徴とする超分子化合物[2]Rotaxane (TRO-A0001) の医療における応用の可能性について培養細胞で研究したものである。背景として、わが国では死因として最も高い疾患は悪性腫瘍であり、多くの治療薬が存在するが副作用や薬剤耐性などの問題から効果の高いものは少なく、新しい治療薬の必要性が求められている。TRO-A0001 は、2種の分子が複合体を形成し、構成内での動的運動性を有する既存の医薬品には見られない構造の物質である。その構成は、輪状のクラウンエーテルと軸となる直鎖状の *n*-アルキル基で、輪状の中を *N*-アルキル基が貫通し、クラウンエーテルは実情をシャトリングと回転の運動を行うことができる。

1 マウス由来のメラノーマ細胞 B16/BL6、ヒト由来 G361、カルシノーマとしてマウス由来 Colon-26 細胞ならびにヒト由来 DLD-1 細胞を用いて、細胞増殖に対する作用を検討し、ヒト細胞では、500nM、マウス由来細胞では 1 $\mu$ M より抑制を示し、10 $\mu$ M では増殖は起こらず細胞死を起こし、既存の抗腫瘍薬と同等の効果を示した。しかしながら、構成成分のクラウンエーテルと *n*-アルキル基それぞれの単体ならびに2成分の混合体では細胞増殖に全く影響を与えなかった。したがって、その作用は TRO-A0001 のロタキサン単一構造によることを明らかにした。

2 TRO-A0001 の細胞死について細胞核ならびに細胞骨格染色法により形態学的検討を行った。ファロイジンをを用いた F-アクチン染色で、TRO-A0001 はいずれの細胞も共通して細胞骨格の外環が細長く縮小した状態や円形状に縮小し、また接着面からの剥離した細胞が観察された。細胞核は Hoechst33342 試薬により染色した。TRO-A0001 核凝縮様の状態が見られた。これらの変化により、TRO-A0001 の細胞死はアポトーシスであることが示された。

3 DNA 断片化を TUNEL 染色により検討し、TRO-A0001 (10 $\mu$ M) は対照の DNase と同様の断片化を示し、アポトーシスに関与することを認めた。

4 TRO-A0001 はすべての細胞に対しカスパーゼ-3 の発現を誘導した。カスパーゼ-7 に対してはヒト由来の両細胞に発現が認められた。カスパーゼの切断体より生ずる Cleaved PARP はすべての細胞において発現が増加した。

5 Bax はミトコンドリアを起源とし、アポトーシスを誘導するタンパクである。TRO-A0001 は濃度依存的に生存を減少させるが、Bax siRNA 処理により、すべての細胞の生存率を有意な回復またはその傾向が認められ、カンプトテシンと同様であった。これらの実験結果は、TRO-A0001 のアポトーシスによる抗腫瘍作用を強く示すものである。

審査の結果、本論文は既存の医薬品に見られない化学構造の[2]Rotaxane がメラノーマならびにカルシノーマがん細胞で増殖抑制を初めて報告し、その機構にミトコンドリアを介するカスパーゼ系の促進による機構を解明し、新しい抗腫瘍薬の可能性を示唆した点が学位に値すると判断された。