

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成11年度博士課程 入学

氏 名 徐 慶雲
指導教官名 福井 泰久

論文題目

Basic research and screening for therapeutic drugs of signet-ring cell carcinoma
(印環細胞癌治療のための基礎研究及びその治療薬の検索)

消化管の腺癌はその分化程度により高分化型腺癌と低分化型腺癌にわけられる。高分化型腺癌細胞は正常細胞と同様に細胞同士の接着と細胞極性を持ち固形腫瘍を作る可能性が高く外科手術による治療が可能な場合が多い。それに対し、低分化型腺癌細胞は細胞の極性が失われ、細胞間接着が消失する。そのため生体内の一ヶ所で増殖せず、他の臓器に転移し腫瘍を作るため外科手術による治療が困難である。高分化型腺癌細胞は何らかの原因により低分化型腺癌細胞に形質転換する場合もある。印環細胞癌は東洋人に多発する低分化型腺癌の一種で、それ由来の細胞は細胞間接着がなく、細胞内に巨大な液胞を持ち核が指輪のような形に変形するなどの特徴を有する。ホスファチジルイノシトール3-kinase (PI3-kinase) は増殖因子の刺激に応じて活性化され、細胞骨格の構築、小胞輸送、遺伝子の転写活性化及び細胞増殖など多彩な細胞応答に関与する。また最近になり、PI3-kinase は癌遺伝子として発癌と癌の悪性化に関わっていることが明らかになった。当研究室では、大腸や胃の高分化型腺癌の細胞株である HCC2998 株や MKN45-1 株に活性型 PI3-kinase を発現させたところ、細胞がお互いの接着性を失うことにより球状になり、さらに巨大な液胞を持つ細胞に形質が変化した。これらの細胞は印環細胞癌に酷似した。これは PI3-kinase が印環細胞癌の形態獲得に重要な役割を有することを示唆する。さらに PI3-kinase の下流因子のどの分子がこの現象に関与しているかを検討したとこ

ろ、p38 MAP kinase の活性化が見い出された。また p38 MAP kinase の阻害剤 (SB203580) を作用させたところ、活性型 PI3-kinase 発現による HCC2998 株や MKN45-1 株よりの印環細胞癌形成が顕著に阻害され、これらの結果から印環細胞癌形成に p38 MAP kinase が関与している可能性が示唆された。本研究では PI3-kinase 活性化による上記の細胞形態の変化を指標に、印環細胞癌に対する有効な治療薬の探索を行った。また、印環細胞癌における PI3-kinase の経路関連因子の役割を検討した。

1. 印環細胞癌の形成を抑制する薬剤のスクリーニング

前述したように、これまでの結果から PI3-kinase が印環細胞癌の形成に深く関係があり、そのシグナルの一部は p38 MAP kinase を介して伝達されることが示唆された。このような実験事実から印環細胞癌様の細胞を *in vitro* で作ることができ、薬剤によってこれを阻害できる可能性が示された。先に述べたように、高分化型腺癌に活性型 PI3-kinase の発現を誘導する際に、p38 MAP kinase 阻害剤 SB203580 を加えることにより、細胞間接着能の低下及び球状細胞への形態変化が抑制された。しかし、SB20358 は巨大な液胞の形成の抑制作用は持たなかった。そこで本章では前述したこの *in vitro* で印環細胞癌様の細胞形成システムを用い、その形成をより強く、より特異的に抑制する薬剤のスクリーニングを行った。本研究では SB203580 の様な細胞の接着性が上昇させる活性を持つ薬剤を陽性対照薬剤に用いた。しかし、当初の方法ではアッセイ用の細胞がシャーレ上に接着を完了した後、PI3-kinase 発現のためのアデノウィルス処理するため、ウィルスの感染や培地交換など操作が煩雑であった。また、細胞が完全に形態変化するまでウィルス感染後の 2 日以上かかるため、大量の候補化合物をスクリーニングするには、より簡単なスクリーニング方法が必要となった。種々の検討を行った結果、シャーレ上に接着する前の細胞に直接アデノウィルス処理し、予め薬剤をいれた 96 well plate に細胞を培養するスクリーニング系を確立した。この方法を用いて、40,000 種類の未知の薬剤から一次スクリーニングで 94 個のポジティブな薬剤が得られた。その比率は 0.24% であった。これらと構造が類似する 720 個の薬剤を新たに検討した結果、8.75% の化合物がポジティブとなった。これは一次スクリーニングの時の比率 0.24% に比較すると大きく上昇しており、本スクリーニング系の有効性を示すものである。続いてこの 94 種類の薬剤を天然の印環細胞癌由来の細胞である NUGC4 及び KATOIII 細胞に対する効果を検討した。その結果、NUGC4 細胞に対しては 7 種類、KATOIII 細胞に対しては 5 種類の薬剤で接着能を上昇する活性が見られた。ところで、SB203580 は NUGC4 細胞ではその活性が極めて弱く、KATOIII 細胞に対してはより印環細胞を増やすなどの毒性がみられた。しかし、本スクリーニング方法で得られた薬剤は天然の印環細胞

胞由来の細胞の接着力を強力に増強させる作用を有していた。続いて得られた薬剤の構造の解析を行った。その結果、構造の類似性から4種類のグループに分けられた。このように構造上、ある種の共通性が存在するという事は、本アッセイ系が印環細胞癌形成を抑制する薬剤をスクリーニングするために有効かつ信憑性があると考えられる。次に得られた薬剤の薬理機構を調べるために、その中の代表的な5種類を選び、ヒト癌細胞パネルアッセイを行った。そのアッセイはヒト癌細胞39系に対する *in vitro* 薬剤感受性試験結果をデータベースプログラムで解析することにより、新しい作用機作を持つ抗癌物質、すなわち既存の抗癌剤と異なるユニークな抗癌物質を選別できる系である。その結果、既知の抗癌剤と異なる新たな機能を持つことが判明した。当研究室の別の研究から cAMP が弱いながら印環細胞癌培養細胞の表現型を抑制する効果があることがわかった。そこで、これらの薬剤についても検討してみると、転写因子である CREB のリン酸化を上昇することが見られた。従ってこれらの化合物は cAMP 経路を活性化することが考えられた。しかし、cAMP の濃度と A-kinase の活性には影響を与えなかったため、その作用点の解明には今後の研究が必要である。また、現在、得られた候補化合物についてヌードマウスを用いた抗腫瘍活性の検討を行っており、それらの *in vivo* での効果を検討している。

2. 印環細胞癌における PI3-Kinase の下流因子の役割

これまでの結果から、PI3-kinase 経路は印環細胞癌の形成に関わっているが、PI3-kinase の経路の如何なる因子が関与するかについては、まだ解明されていない。そこで、前述の薬剤スクリーニング系で用いた印環細胞癌様の細胞形成システムを用いてその因子の同定を試みた。特に印環細胞癌の特徴である細胞間接着の喪失と巨大な液胞の形成を指標に解析を行った。先に述べたように、高分化型腺癌の活性型 PI3-kinase の発現により起こる、細胞間接着が消失し、細胞が球状になるという形態変化は、p38 MAP kinase 阻害剤 SB203580 を加えることにより抑制された。また、p38 MAP kinase の上流分子である MKK6 の活性型 (MKK6DA) を高分化型腺癌に導入したところ、活性型 PI3-kinase を発現する細胞と同様に細胞間の接着が消失し、細胞が球状になることが観察されたので、p38 MAP kinase は印環細胞癌の形態変化に重要な PI3-kinase の下流因子であることが示唆された。この事実をさらに支持する実験結果として、本系において MKK6 の上流に位置する Small GTPase Rac の活性型を導入することにより、細胞を球状化することと Rac の dominant negative 変異体は PI3-kinase による細胞の球状化を抑制することがわかった。Rac は PI3-kinase によって活性化されるので、シグナル伝達経路としては PI3-kinase-Rac-p38 MAP kinase と流ることが示唆された。また、LY294002 は天然の印環細胞癌株の足場非依存的な増殖を完全に抑え、また SB203580 によっても部分的であるが抑制された。

この事実は PI3-kinase/p38 MAP kinase 経路は印環細胞癌の腫瘍形成能に重要な役割を果たしていることが示唆された。

一方、巨大な液胞の形成は分泌系が亢進した結果であり、糖蛋白質ムチンの細胞内への分泌と蓄積に相関がある。活性型 PI3-kinase を発現し、印環細胞癌様の細胞に形態変化した場合には、巨大な液胞の形成やムチンの分泌が観察された。しかし、MCK6DA を導入し、形態変化を起こした細胞では、そのような現象が見られなかったため、分泌の亢進は p38 MAP kinase 経路に非依存的事であることが示唆された。同様に PI3-kinase 阻害剤 LY294002 は天然の印環細胞癌株のムチンの分泌を抑制したが、SB203580 は全く効果が見られなかった。従って印環細胞癌における PI3-kinase の下流は (1) p38 MAP kinase 依存性と (2) p38 MAP kinase 非依存性、の少なくとも二つの経路が存在し、(1) は細胞間相互作用に (2) は蛋白質の分泌亢進に関わっていると考えられた。

まとめ

以上の実験により、印環細胞癌株の形成を特異的に抑制する薬剤が得られた。そのうちの 5 種類の薬剤は新たな機能をもつことが期待される。また、本研究により得られた薬剤の薬理特性から印環細胞癌の形成には CREB をリン酸化する経路の負の関与が示唆された。一方、印環細胞癌形成には少なくとも二つの経路を関与していると考えられる。すなわち、p38 MAP kinase 依存性経路は細胞接着および足場非依存性腫瘍形成の獲得に関与し、それぞれは印環細胞癌形成の細胞間相互作用と分泌系に関わっている。ムチンの分泌及びそれによる液泡形成は p38 MAP kinase 非依存性経路が関与していることが示唆された。本研究により東アジアで問題になっている印環細胞癌におけるシグナル伝達とその治療に関して価値がある知見が得られた。