

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成10年度博士課程進学

氏名 李 鍵炯

指導教官 堀之内 末治

論文題名

TGF- β の標的遺伝子発現を指標にした抗腫瘍活性物質の探索とその作用機構

高等生物の細胞増殖の制御は、増殖促進と抑制のシグナルのバランスによって制御されていると考えられている。発がんのメカニズムの解明を目指した増殖因子を介する正のシグナル伝達機構についての研究が世界的に進展したのに加え、近年細胞増殖の抑制あるいは細胞死（アポトーシス）の誘導に積極的に関与するシグナル伝達系の存在が注目されるようになってきた。例えば多くのがん細胞において細胞増殖抑制に関わる細胞外因子TGF- β （Transforming growth factor- β ）を介したシグナル伝達系の異常によりその細胞増殖抑制作用を回避している例が認められ、TGF- β カスケードの下流の転写を活性化させる化合物はがん細胞に対して増殖抑制作用を示すことが期待される。一方、この細胞増殖抑制因子の過剰な発現は肝線維症、免疫不全やアルツハイマーなど多くの疾病の発症や進行に関与すると考えられている。TGF- β カスケードのシグナリングには伝達因子としてSmadファミリーと呼ばれる一連のタンパク質とp38 MAP kinaseやJNKの関連性が示唆されているが、遺伝子発現に至るまでのシグナル伝達機構はまだ不明な点が多い。したがってこのよ

うな細胞増殖における負のシグナル伝達を特異的阻害剤によって人為的に調節することが可能になれば、これらの疾病の治療法につながると同時に、未だ不明な点の多いその分子機構解明のための有用な解析試薬になると考えられる。そこで本研究では、細胞増殖を抑制するシグナル伝達を阻害または活性化する物質の単離を目的としてTGF- β 誘導性PAI-1遺伝子プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーター系を用いて転写活性化物質の探索を行った。

1. TGF- β の信号伝達経路に作用する物質の探索

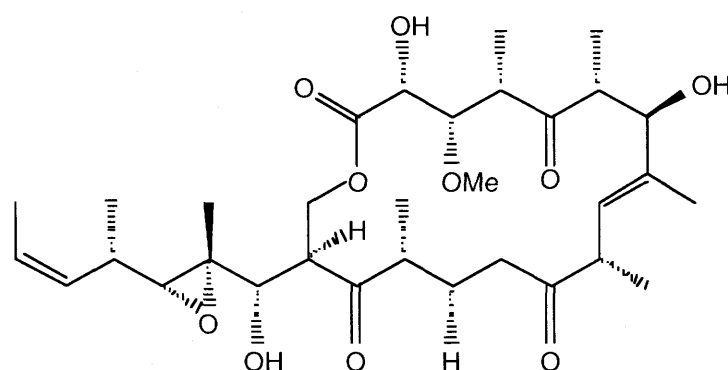
TGF- β は多彩な活性を有するサイトカインであり、細胞周期においてCDKインヒビターの発現誘導を引き起こす増殖抑制因子として作用する。また、TGF- β は細胞外マトリックスの産生を促進し、一方でマトリックスを分解する酵素の活性を抑制することから、結果として細胞外マトリックスの沈着を促進して肝硬変や腎炎などの繊維化や硬化をきたす疾患の進展や脳血管への β -アミロイドの沈着を促進し、アルツハイマー病の発症に密接に関与していると考えられている。一方、免疫調節作用ではB細胞の増殖や機能を抑制し、IgGとIgMの産生を抑制するが、IgAの産生は促進する。また、マクロファージ、T細胞、NK細胞などの増殖や機能を抑制することから、免疫能を全般的に抑制する働きを持っていると考えられている。そこで本研究では特異的阻害剤によってTGF- β 作用を正と負に制御することを目的とし、レポーター遺伝子を利用した探索系を用いたスクリーニングを行った。

TGF- β シグナルによって誘導されるPAI-1遺伝子のプロモーターとTGF- β に応答しないCMV又はSV40プロモーターの下流にそれぞれルシフェラーゼ遺伝子をつないだ細胞を用い、controlプロモーターの活性に影響を与えず、50 pMのTGF- β によって誘導されるPAI-1プロモーターの遺伝子発現を強く促進または阻害する物質の探索を行った。微生物培養抽出物および海綿抽出物を対象に探索を行った結果、海綿由来のマクロライド系化合物13-deoxytedanolide、heterocyclic系化合物 onnamide Aとtheopederin BがnMオーダーの低濃度でPAI-1プロモーターを強く活性化させることを見いだした。いずれの化合物も1990年前後に細胞毒性と抗腫瘍活性で同定されたものの詳細な作用機構については不明であった。

2. 13-deoxytedanolideの作用機構

13-deoxytedanolide (13-DT) は数nMの低濃度で培養がん細胞の増殖を阻害するとともに担がん動物で強力な抗腫瘍活性を示すことが報告されているが、13-DTの分子レベルでの作用機構については不明であった。13-DTの作用機構を解析する

目的で様々な遺伝子プロモーターにルシフェラーゼをつないだレポーター系に対してその効果を検討した結果、TGF- β で誘導されることが知られるPAI-1遺伝子プロモーターを特異的に強く活性化した。そこでTGF- β カスケードのsignal transducerであるSmad2の核移行を調べたところ、予想外にもSmad2の局在には影響がなく、controlとして用いた温度感受性p53の迅速な核内移行活性が認められた。温度感受性p53は蛋白質合成阻害剤によって核移行が誘導されることが知られているので、細胞内高分子の合成に与える影響を調べたところ、蛋白質合成を特異的に阻害することが判明した。そこで既存の蛋白質合成阻害剤についてもPAI-1プロモーター活性化能の有無を調べたところ、強い蛋白質合成阻害活性を有するpuromycinではPAI-1遺伝子の活性化は起こらず、28Sリボゾーム阻害を引き起こすanisomycin等によってはPAI-1の活性化が誘導されたことから、13-DTはanisomycinと同様のメカニズムでPAI-1遺伝子の活性化を誘導することが示唆された。anisomycinは28SリボゾームRNAに直接結合し、ペプチド転移反応を阻害することが知られている。また、anisomycinや28S rRNAを切断するリシンAなどはストレス応答性のMAPキナーゼであるp38 MAPKやSAPK/JNKを活性化することも知られている。これらのストレス応答性のMAPキナーゼの活性化は、anisomycinによる蛋白質合成阻害作用よりも低濃度で誘導されることから蛋白質合成そのものに起因するのではなく、リボゾームRNA障害に対するストレス応答であるribotoxic stress responseであると考えられている。そこで13-DTがanisomycinと同様にこれらのストレス応答性のMAPキナーゼを活性化するかどうかが調べたところ、低濃度でp38およびSAPK/JNKの活性化を強く誘導することが明らかになった。さらにp38の特異的阻害剤SB202190やSAPK/JNK阻害剤JNK Inhibitor IIの前処理により、PAI-1プロモーターの誘導効果が抑制されること、anisomycinによってもPAI-1が活性化することからPAI-1プロモーターはストレス応答性MAPキナーゼの標的遺伝子のひとつであることが示唆された。



13-deoxytedanolideの構造

3. mycalamide関連化合物の作用機構

onnamide Aとtheopederin Bはmycalamide関連化合物である。mycalamide関連化合物は異種の海綿から数多く単離され、細胞毒性と培養がん細胞における抗腫瘍活性などが同定されているが、その作用機構についてはまだ不明な点が多い。そこでonnamide Aとtheopederin Bに関しても細胞内高分子の合成に与える影響を調べたところ、いずれの化合物も蛋白質合成阻害活性を示す一方、濃度依存的にPAI-1プロモーターを強く活性化させ、同濃度で顕著なp38 MAP kinaseおよびSAPK/JNKのリン酸化を誘導することが明らかになった。また、ストレス応答性MAPキナーゼの特異的阻害剤の前処理により、PAI-1プロモーターの誘導効果が抑制された。以上の結果から、上記の化合物は蛋白質合成阻害活性から起因したribotoxic stressを誘導し、ストレス応答性のMAPキナーゼを通じてPAI-1プロモーターの活性化を引き起こすことが示唆された。

まとめと考察

今回得られた海綿由来化合物13-deoxytedanolide、onnamide A、theopederin Bはいずれも強い蛋白質合成阻害作用を示し、当初の目的であったTGF- β シグナルカスケードの活性化を特異的に引き起こしているのではないと考えられた。その強いPAI-1プロモーター活性化作用はanisomycinと同様、リボゾームを介したribotoxic stressの誘導によるものと考えられた。すなわち、これらはribotoxic stress responseを通じてp38及びSAPK/JNKを活性化し、リン酸化されたATF-2やc-Junを介してPAI-1プロモーターが活性化されることが強く示唆された。実際、PAI-1プロモーター領域には、ATF-2やc-Junの認識配列に類似する配列が存在し、これらの配列が転写活性化に関与することが予想される。これらの化合物の持つ抗がん活性は、蛋白質合成阻害作用よりもむしろ、ストレス応答性MAPキナーゼの活性化に起因する可能性が高い。また、TGF- β シグナルの下流でストレス応答性MAPキナーゼが活性化される例も報告されており、ribotoxic stress responseとのクロストークにも興味を持たれる。今回見いだした13-deoxytedanolideやtheopederin Bは、よく研究されてきたanisomycinよりも100倍以上強力であることから、今後これらの化合物が未だにその機構が不明なribotoxic stressの応答メカニズム解明のために有用なツールとなることが期待される。