

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 鍵炯

細胞増殖抑制に関わる細胞外因子 TGF- β を介したシグナル伝達系の異常は多くの癌細胞において正常な細胞増殖抑制作用を破綻させ、発癌や増悪化に深く関与していると考えられている。一方、この細胞増殖抑制因子の過剰な発現は肝線維症や免疫不全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。そのため、TGF- β カスケードの下流の転写を活性化させる化合物は癌細胞に対して増殖抑制作用を示すことが期待され、場合によって抑制する化合物は結果的に制癌作用に結びつく可能性もあると推定される。したがって、TGF- β シグナルをそれぞれの病態に応じ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。

本研究は、最近注目されてきた細胞増殖の制御と発癌過程における負のシグナル伝達経路に注目し、細胞増殖を抑制するシグナル伝達の活性化または阻害物質の単離を目的として TGF- β シグナルに特異的に作用する低分子化合物の探索を行い、得られた化合物の作用機構を解明したものであり、4章からなる。

研究の背景と意義を述べた第 1 章に続き、第 2 章では TGF- β シグナル伝達経路に作用する物質の探索系を構築した。TGF- β シグナルによって誘導される遺伝子 IgC α および PAI-1 プロモーターの下流にルシフェラーゼ構造遺伝子をつないだレポーター系を用いて、微生物培養抽出物および海綿抽出物を対象に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結果、数種類の活性サンプルを見だし、活性物質の単離・同定を行った。その内容と考察が第 3 章に述べられている。残念ながら全て既知物質であったが、得られた化合物が単純に TGF- β 応答性の遺伝子発現に影響を与えるのではなく、他の要因によってそれぞれの遺伝子発現に影響を与えている可能性が示唆された。

一方、海綿由来のマクロライド系化合物 13-deoxytedanolide (13-DT)、mycalamide 関連化合物 onnamide A と theopederin B が ng/ml 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明らかになっておらず、特に 13-DT の場合は pg/ml の極低濃度で培養癌細胞の増殖を阻害するとともに担癌動物で強力な抗腫瘍活性を示すことが報告されている。いまだ不明なその分子標的が明らかになれば、癌化学療法の基礎としても重要な知見となることが期待される。

第 4 章ではこれら海綿由来化合物の作用機構を解析した。13-DT の作用機構を解析する目的で様々なプロモーターに対してその効果を検討した結果、PAI-1 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 Smad2/3 の核移行を調べたところ、Smad2/3 の局在には影響が少なく、control として用いた温度感受性 p53 の劇的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 プロモーターの活性化は起こらず、28S リボソーム阻害を引き起こす anisomycin 等によっては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 プロモーターの活性化を誘導することが示唆された。anisomycin は 28S リボソーム 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 MAP キナーゼである p38 MAPK や 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 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、リボソーム 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 MAP キナーゼを活性化するかどうか調べたところ、低濃度で p38 MAPK および JNK の活性化を強く誘導した。さらに p38 MAPK の特異的阻害剤 SB202190 や 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。また、mycalamide 関連化合物である onnamide A と theopederin B に関してもそれらの構造が 13-DT とは異なるにもかかわらず、全く同様の作用を示したことから、上記の化合物は ribotoxic stress を誘導し、ストレス応答性 MAP キナーゼを通じて PAI-1 プロモーターの活性化を強く引き起こすと考えられた。特に、13-DT 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。

総括では、本研究のまとめとその結果の意義、今後の研究への応用について論じている。

以上、本論文は 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を解明したもので、学術上、応用上意義深いものである。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。