

論文の内容の要旨

論文題目 Ras シグナル阻害能を有する抗腫瘍活性物質の同定と
その作用機構に関する研究

氏名 二村 真祐美

ras 遺伝子はヒト癌において高頻度に異常が認められる癌遺伝子であり、その変異率は膀胱癌では 90%と最も高く、大腸癌では 40%、甲状腺癌では 50%、肺の腺癌で 30%と報告されている。また、Ras の上流因子である EGF や PDGF などの受容体の高発現や、Ras の下流の Raf の変異も高頻度に見つかっており、これらをあわせると腫瘍全体の約 80%で Ras シグナル経路の活性化がおきていると言われている。そこで、著者は Ras シグナル経路を構成する分子を標的とした抗腫瘍剤開発を目指して 2 種類の Ras シグナル阻害剤スクリーニング系を構築し、これらを用いて阻害剤の探索を行った。更に、同定した化合物について Ras に依存した腫瘍活性に対する阻害能を評価し、抗腫瘍剤としての有効性を検証した。また、これら化合物の Ras シグナル経路に対する阻害メカニズムの解析から、Ras 腫瘍化シグナルにおける重要な因子を同定し、Ras の腫瘍化メカニズムの一端を解明すると共に、それに基づく新たな抗腫瘍剤開発に有用なターゲットを提示した。

[PC12 細胞を用いた Ras 経路阻害剤スクリーニングによる trichostatin A の同定と、その作用機構解析]

Ras 経路の阻害を評価する高感度かつ簡易的なスクリーニング系として、MMTV-LTR プロモーターで制御される Ras 発現ベクターを導入した PC12 細胞を樹立し、デキサメサゾン誘導性の Ras 発現で起きる神経突起伸長を指標にしたアッセイ系を構築した。この系を用いて阻害剤スクリーニングを行い、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と

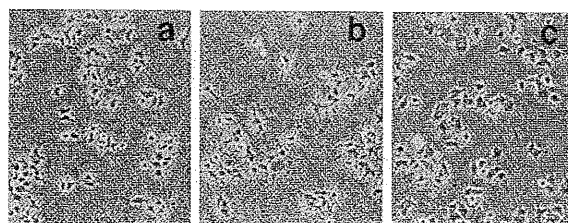


Figure 1 Effect of trichostatin A on *ras*-induced neurite outgrowth of PC12 cells. c-Ha-*ras*-PC12 cells were cultured for 16 h without dexamethasone or trichostatin A (a), with 1 μ M dexamethasone and without trichostatin A (b), or with 1 μ M dexamethasone and 80 ng ml⁻¹ of trichostatin A (c)

して知られる trichostatin A(TSA)を同定した。TSA は 80 ng/ml で、デキサメサゾン誘導性の oncogenic Ras シグナルによる神経突起伸長、及び normal Ras シグナルを介する NGF による神経突起伸長をそれぞれほぼ完全に阻害した(Figure 1)。また、TSA が NGF 刺激後の 1 時間以内の反応に関与していることを見出し、解析を行った結果、TSA が早期応答遺伝子である *c-fos*、*c-jun*、*c-myc* 遺伝子の発現を変化させることで Ras シグナル阻害作用を示すことを明らかにした(Figure 2)。また、PC12 細胞を TSA(80ng/ml)で処理すると、処理 1 時間後からアセチル化ヒストンが増加し、処理時間の増加と共にアセチル化ヒストンの蓄積が認められた。このことから、TSA のヒストン脱アセチル化酵素阻害作用によって早期応答遺伝子発現が影響されたと示唆された。

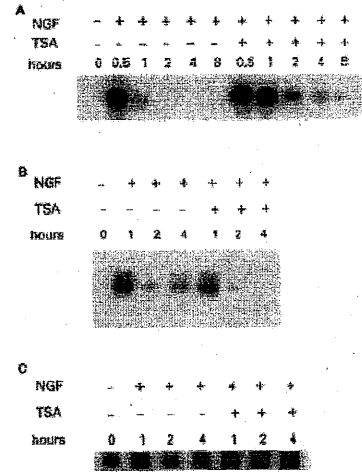


Figure 2 Effect of trichostatin A on induction of early-response. Northern blotting analysis of *c-fos* (A), *c-jun* (B), and *c-myc* (C)

更に TSA が ras-transformed NIH3T3 細胞の形態正常化作用を有すること、及び normal NIH3T3 細胞よりも ras-transformed NIH3T3 細胞の増殖を積極的に抑制することを見出し、TSA が抗腫瘍活性を有することを示した。以上の結果から、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によって、Ras シグナルの増幅で異常になった細胞増殖を是正できる可能性があることが示唆された。即ち、Ras シグナルの下流において、ヒストン脱アセチル化酵素は、腫瘍化を引き起こす因子群の転写制御に深く関与しているものと推察される。従って、ヒストン脱アセチル化酵素の活性異常を是正することで抗腫瘍活性作用を発揮させることができると考えられる。

[Ras responsive element で制御される転写の阻害剤スクリーニングによる malolactomycin D の同定と、その作用機構解析]

前述の TSA はヒストン脱アセチル化酵素阻害活性により広範囲の遺伝子発現に影響を与え、正常細胞にも少なからず影響を及ぼすと考えられる。そこで、より oncogenic Ras シグナルに選択的な阻害剤を探索するため、Ras responsive element (RRE) に制御される転写に対する阻害剤スクリーニング系を構築した。RRE は、*c-fos* やマトリックス分解酵素である MMP-1、MMP-3、MMP-9 等の遺伝子上流にあると報告されている。従って、RRE で制御される転写を阻害することで、抗腫瘍活性を期待することができる。

まず著者は、RRE で制御される転写が実際に Ras シグナルで活性化することを確認した。その後、RRE の下流に luciferase 遺伝子を挿入したベクター (pRRE-luc) と oncogenic Ras 発現ベクターを導入した NIH3T3 細胞、及びコントロール細胞として、プロモーターのない luciferase ベクター (pRL0-luc) と oncogenic Ras 発現ベクターを導入した NIH3T3 細胞を用いて、RRE による転写に対する阻害剤のスクリーニングを行い、malolactomycin D (malo-D) を同定した。Malo-D は pRRE-luc 及び、pRL0-luc の転写をそれぞれ IC₅₀ 0.9 µg/ml、11.9 µg/ml で阻害した。

Malo-D の抗腫瘍活性を評価するため、ras-transformed NIH3T3 細胞の足場依存性及び非依存性増殖に対する作用を調べた。その結果 malo-D は、足場非依存性増殖を IC₅₀ 1.2 µg/ml で抑制した。一方、足場依存性増殖に関しては、IC₅₀ 8.3 µg/ml であった。このことから、malo-D は正常細胞の増殖よりも Ras による足場非依存性増殖をより積極的に抑制することが示された。

次に RRE をプロモーターに有する遺伝子 MMP-1、MMP-9、c-fos に焦点を当てて malo-D の作用を探索した(Figure 3)。その結果、malo-D 濃度依存的に MMP-1、MMP-9 の mRNA 発現レベルの低下が認められた。一方、malo-D は、RRE が無い遺伝子 MMP-2 の発現にはほとんど影響しなかったことから、malo-D が RRE をもつ MMPs の発現に選択的に作用することが示唆された。興味深いことに、癌細胞の多くが MMP を強く発現しており、その活性が癌の増殖、浸潤、転移能など、いわゆる「癌の悪性度」と関係していることが確認されている。従って malo-D は MMP-1 及び MMP-9 等、Ras シグナルで誘導される遺伝子発現を阻害することで Ras による腫瘍細胞の増殖、転移、浸潤を抑制する可能性が考えられる。

一方、malo-D は RRE をプロモーター内に有する c-fos 遺伝子の発現には影響を与えなかった。c-fos 遺伝子は、Ras シグナル経路の他にも種々の増殖シグナルによって発現が上昇することが知られており、腫瘍細胞の増殖と同様に正常細胞の増殖にも重要な役割を果たしていることが分かっている。従って、malo-D が c-fos 遺伝子の発現に影響しないことは、malo-D が腫瘍細胞の特質である足場非依存性増殖を抑制する一方で、正常細胞の増殖の特徴である足場依存性増殖に対してほとんど影響を与えないという現象を説明する一つのメカニズムとして考えることができる。

次に malo-D が MMP-1、MMP-9 と c-fos の mRNA 発現に対して異なる作用を示したことから、これら遺伝子の発現制御に関わっていると思われるシグナル経路分子に対する malo-D の影響を検証した(Figure 4)。bFGF は NIH3T3 細胞において MMP-1、MMP-9、c-fos の発現を上昇させることが報告されている。

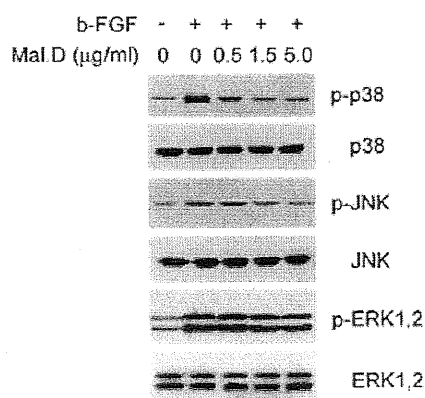


Figure 4 Effect of malolactomycin D on MAP kinase. Serum starved NIH3T3 cells were incubated with bFGF alone or in combination with various concentration of malolactomycin D for 10 min. The level of activated p38 MAP kinase, JNK and ERK1,2 were determined by Western blot analysis using phosphospecific antibodies. The level of total also determined using anti-p38 MAP kinase, anti-JNK.

ras-transformed NIH3T3 細胞を bFGF 刺激すると、p38 MAP kinase、JNK および ERK1,2 の活性化が観察された。同条件下、5.0 µg/ml の malo-D を共存させると、bFGF による p38 MAP kinase 及び JNK の活性化はコントロールの群に対しそれぞれほぼ抑制及び約 30%にまで抑制された。一方 bFGF による ERK1,2 活性化に関しては、malo-D による顕著な影響は見られなかった。この結果から、p38 MAP kinase 及び JNK シグナル経路は、Ras による腫瘍化シグナルにおいて、特に足場非依存性増殖制御に関与する可能性が示唆された。

【まとめ】

今回、構築した 2 種類の Ras 経路阻害剤スクリーニング系を用いた探索から、実際に抗腫瘍活性物質が得られることが示された。即ち、Ras シグナル阻害能を有する物質は抗腫瘍剤として非常に有効であることが実証された。また、同定

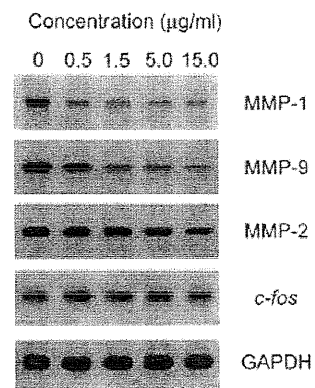


Figure 3 Effect of malolactomycin D on the expression of Ras-inducible genes. Ras-transformed NIH3T3 cells were incubated with malolactomycin D at indicated concentrations for 24h. Northern blot analysis of MMP-1, MMP-2, MMP-9, c-fos and GAPDH mRNA were performed.

した TSA の作用機序解析から、Ras シグナル早期応答遺伝子の発現パターン変化は Ras シグナル調節に重要であることが示唆され、これら遺伝子発現調節に関わるヒストン脱アセチル化酵素は、抗腫瘍剤の有効なターゲットになることを示した。更に、RRE 転写の阻害活性を示した malo-D が、p38 MAP kinase 及び JNK シグナル経路を選択的に阻害することで、RRE をプロモーターに有する遺伝子の中でも MMP-1、MMP-9 の発現を特異的に抑制し、Ras による足場非依存性増殖を選択的に抑えることを明らかにした。このことから、malo-D の腫瘍増殖、転移、浸潤の抑制剤としての可能性が示された。また、MMP-1、MMP-9 は Ras による足場非依存的増殖において重要な役割を果たしていることが示唆され、Ras 腫瘍活性に対する阻害剤のターゲットとして有効であると考えられた。今後、更にこれらの系を用いてスクリーニングを行うことで、新規 Ras 経路阻害剤が同定できると期待される。同時に、Ras 経路阻害剤スクリーニングで同定した化合物の作用機序解析により、Ras シグナルと腫瘍悪性化メカニズムの更なる解明と、新規抗腫瘍剤ターゲットの同定が可能であり、抗腫瘍剤開発に貢献できるものと確信している。