

[別紙 2]

審査の結果の要旨

二村 真祐美

ヒト癌において Ras 遺伝子の変異は最も高頻度に検出されており、細胞の腫瘍化に Ras シグナル経路の活性化が重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では、Ras シグナル経路に注目した分子標的抗腫瘍薬の開発を目指し、2 種類の新規スクリーニング系を構築し、これらスクリーニングから同定した化合物の抗腫瘍活性の評価及び作用機序解析を行った。その結果、Ras シグナル阻害能を有する化合物が、実際に抗腫瘍剤として非常に有効であることを示した。また、それら化合物の作用機序解析から、Ras による腫瘍化シグナルに関する新しい知見を見出し、それに基づいた新たな分子標的やシグナル経路を提示した。

まず、第一の探索系である PC12 神経細胞の神経突起伸長を指標としたアッセイ系による阻害剤スクリーニングから、ヒストン脱アセチル化酵素として知られる trichostatin A が同定された。Trichostatin A の Ras シグナル阻害作用機序解析において、trichostatin A が NGF 刺激後一時間以内の反応に関与していることに注目し、Ras シグナルの下流における c-fos、c-jun、c-myc 等の遺伝子発現パターンの変化が Ras シグナルの抑制に重要であることを明らかにした。また、trichostatin A 処理によって高度にアセチル化されたヒストンが蓄積されることを確認した。更に、trichostatin A が ras-transformed NIH3T3 細胞の腫瘍化形態を正常細胞と同様の形態へ変化させることを明らかにし、trichostatin A が Ras による腫瘍化作用を抑制することを示した。これらの結果から、Ras シグナルによる転写因子遺伝子発現に関与するヒストン脱アセチル化酵素は、Ras 腫瘍活性に対する阻害剤ターゲットとして有用であることが示唆された。

また、第二の探索系である Ras responsive element (RRE)由来の転写の阻害を指標にしたスクリーニング系は、より Ras シグナルに選択的な阻害剤を探索することを目的に構築された。Ras responsive element を有する遺伝子は、腫瘍細胞の増殖や進展に深く関わっていることが知られており、本系は腫瘍の浸潤等に阻害作用を示すような薬剤を選択できる可能性があるスクリーニング系である。このスクリーニングの結果、RRE 由来の転写を特異的に阻害する malolactomycin D を同定した。その作用機序解析の結果、malolactomycin D が RRE をプロモーターに有する遺伝子の中でも特にマトリックス分解酵素をコードする MMP-1、MMP-9 遺伝子の発現を抑制し、癌細胞特有の増殖である Ras による足場非依存性増殖を阻害することを明らかにした。これらの結果から、MMP-1、

MMP-9 阻害が腫瘍増殖、転移、浸潤を抑制できる抗腫瘍剤のターゲットとして有用であることが示唆された。また、MMP-1、MMP-9 の発現阻害においては、malolactomycin D が Ras シグナル経路下流の p38 MAP kinase 及び JNK 経路を選択的に抑制していることを見出し、これら p38 MAP kinase 及び JNK 経路は、Ras の腫瘍化シグナルに重要である可能性を示した。このことから、Ras によって腫瘍化した細胞においては、p38 MAP kinase や JNK の活性化は知られているストレス刺激時の反応とは違う細胞反応に関与していることが示唆され、特に足場非依存性増殖等の腫瘍化シグナルに関与しているものと推測された。抗腫瘍剤開発において抗腫瘍作用の強さと正常細胞に対する毒性の軽減を両立させるという意味で、p38 MAPK/JNK 経路で制御されている Ras シグナル伝達経路はターゲットとして有用である可能性が本研究の結果から示唆された。

以上一連の研究から、腫瘍細胞は Ras シグナルの活性化等によってヒストンのアセチル化状態の異常がおき分化調節機構の破綻が起きている可能性があることが示唆され、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によってヒストンのアセチル化状態を回復させることにより分化異常を克服できる可能性があることを示した。

また、Ras シグナルによって腫瘍化した細胞では、通常炎症やストレス刺激時に使用される p38MAP kinase 及び JNK 経路を利用し MMP-1、MMP-9 の発現を上昇させ足場非依存性増殖能を獲得している可能性があることが示された。従ってこの経路を阻害することにより腫瘍細胞の増殖をより選択的に阻害できる可能性があるものと考えられる。

腫瘍細胞と正常細胞のシグナル制御の違いを探索することは、広い therapeutic window (safety margin) を持つ抗腫瘍剤の開発において非常に重要であるが、本研究で構築された細胞を用いた Ras シグナル阻害剤スクリーニングは腫瘍細胞に特徴的なシグナルを見出す手段として有用であることを一連の結果から示している。そして、スクリーニングで同定した化合物の作用機序解析によって、より高い腫瘍選択性を出すことができる抗腫瘍剤ターゲットを同定することが可能であることを示している。

本研究で明らかにした新たな標的因子や標的シグナル経路は、新たな分子標的薬剤の開発に繋がり、より腫瘍細胞に選択的な抗腫瘍剤の創製に結びつく可能性を開くものである。実際に、本研究の後に trichostatin A の抗腫瘍効果及び作用機序解析に関する知見が数多く報告され、trichostatin A の誘導体である SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) は、臨床開発試験段階に至っている。また、MMP-1 に関しても腫瘍との相関が非常に高いことが最近行われた患者の癌細胞の遺伝子発現解析等からも示されてきている。このように、本研究で行ってきた化合物の作用機序解析は、Ras 腫瘍化シグナルの機構解明に結びつく重要な知見を提供すると同時に、抗腫瘍剤開発に有用な情報を与える価値のあるものである。また、これら標的因子や標的シグナル経路に関して、腫瘍増殖や転移などに

対する作用機構を更に詳細に解析することで、腫瘍の本態に関する機構解明に重要な知見を提供するものである。よって、申請者の業績は、博士（薬学）の学位授与にふさわしいものと判断した。