

京都大学	博士 ( 医学)	氏 名	石 川 浩 之
論文題目	A novel cell-based assay for the high-throughput screening of epithelial-mesenchymal transition inhibitors: Identification of approved and investigational drugs that inhibit epithelial- mesenchymal transition (上皮間葉転換阻害剤のハイスループットスクリーニングのための新規細胞アッセイ：上皮間葉転換を阻害する承認薬および治験薬の同定)		
(論文内容の要旨)			
<p>背景と目的：遠隔転移を有している肺癌患者の予後は非常に不良であり、上皮間葉転換 (EMT) は、癌の転移に寄与している。このため、肺癌における EMT シグナルの解明と阻害は、肺癌患者の予後を改善する新たな治療戦略の一つとなりえる。本研究では、ヒト肺癌細胞、EMT を検出するための遺伝子マーカーとして E カドヘリンおよびビメンチンに注目して、各々のルシフェラーゼレポーター細胞株を作製し、EMT 阻害剤をスクリーニングするためのハイスループットスクリーニングシステム (HTS) を構築した。また、この材料とシステムを用いて、EMT を阻害する化合物の同定を目的とした。</p> <p>材料と方法：pNL2.2 ベクター (Promega Corporation, USA) は、発光化学反応の触媒酵素であるルシフェラーゼのレポーター遺伝子を有するプラスミドベクターである。E カドヘリンを上皮系、ビメンチンを間葉系の EMT マーカーとし、各々のプロモーターを、この pNL2.2 ベクターに遺伝子工学的に導入し、ヒト肺癌細胞株である A549 にトランスフェクトさせ、2 種類のルシフェラーゼレポーター細胞株を作製した。トランスフォーミング成長因子 B1 (TGF-β1) を、これらの細胞株に添加して EMT を誘導し、2,530 種類の化合物ライブラリーに対してレポーターアッセイを行い、EMT 阻害剤となる候補薬をスクリーニングした。化合物による毒性の影響を除外するために、アッセイで得られた数値を生細胞数で調整し、スコア化した。さらに、選択された化合物が、実際に EMT を阻害し、浸潤能を阻害することを検証した。</p> <p>結果：E カドヘリンの発現低下とビメンチンの発現上昇をともに阻害した 7 種類の化合物が同定された。7 種類の化合物のうち、3 種類の化合物は既知の TGF-β1 阻害剤であり、システムの蓋然性が示されていた。4 種類の化合物がスクリーニングされ、新規の EMT 阻害剤候補として選択された。ウェスタンブロットティング法では、これら 4 種類の化合物のうち、Avagacestat は、E カドヘリンの発現低下を特に強く阻害し、GDC-0879 と L-thyroxine はビメンチンの発現上昇を阻害しただけでなく、インヴェージョンアッセイにて浸潤能も有意に抑制した。</p> <p>結語：EMT 阻害候補薬を探索する目的で TGF-β1 で処理された非小細胞肺癌細胞株を用いて E カドヘリンとビメンチンを指標とするレポーターアッセイ法を構築した。既知の化合物で構成されたライブラリーをスクリーニングし、ヒット化合物に対して体系的な検討を行ったところ、実際に EMT 阻害および浸潤能を抑制する薬剤を同定した。EMT は、癌細胞における浸潤、転移、および薬剤耐性など多種多様に関与しており、これらの候補薬が、新たな抗癌剤として再利用できるか、今後が期待される場所である。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

上皮間葉転換 (EMT) は癌細胞の浸潤、転移など癌の進展に関与しており、EMT シグナルの解明と阻害は新たな治療戦略となりえる。本研究では、TGF-β1 で EMT を誘導した非小細胞肺癌細胞株によるレポーターアッセイ法を開発し、EMT 阻害薬の候補を既知の化合物ライブラリーから探索し効果を検証することを目的とした。ハイスループットスクリーニングシステムの構築のため、ヒト肺癌細胞 A549 を用いてルシフェラーゼレポーター細胞株を作製した。EMT 発現のマーカーとして E カドヘリンとビメンチンをプロモーターとした。既知の化合物ライブラリーを探索したところ、E カドヘリンの発現低下とビメンチンの発現上昇をともに阻害した 7 種類の化合物が同定された。3 種の化合物は既知の TGF-β1 阻害剤であり、システムの蓋然性が示され、残りの 4 種類の化合物が新規 EMT 阻害薬の候補とされた。ウェスタンブロットティング法で E カドヘリンの発現を検証し、4 種類の化合物のうち、Avagacestat が低下を強く阻害した。GDC-0879 と L-thyroxine はビメンチンの発現上昇を阻害しただけでなく、インヴェージョンアッセイにて浸潤能も有意に抑制した。これらの EMT 阻害薬候補が、新たな抗癌剤として期待される場所である。

以上の研究は、肺癌における上皮間葉転換のメカニズムの解明に貢献し新規阻害剤開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、令和 5 年 8 月 3 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降