

(論文内容の要旨)

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は、ヒストンおよびその他の細胞内タンパク質 (転写因子等) のリジン残基からアセチル基を取り除く加水分解酵素である。近年、アセチル化はリン酸化等の翻訳後修飾と並んで、分子の機能制御に大きく関与していることが明らかにされてきている。HDAC阻害剤は、HDACの機能を阻害することで細胞内タンパク質の過剰なアセチル化を引き起こし、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導、転写抑制、転写誘導等、様々な作用を発揮する。その作用の特徴から抗癌剤への適用が注目される一方、免疫抑制作用を有することも報告されている。特に臓器移植領域では新規の免疫抑制剤の創出が強く求められており、多様な作用を併せ持つHDAC阻害剤はその有力な候補の一つである。本研究では、HDAC阻害剤の免疫抑制作用ならびに主たる副作用として認められる血小板減少作用に焦点を当て、それぞれの作用機作の解析を行った。これらの研究により、HDACの転写制御における役割を明らかにするとともに、無数に存在する化合物の中から臓器移植領域における免疫抑制剤としての有効性が高くかつ毒性の低い特性を有する新規なHDAC阻害剤を、効率よく信頼性高く選択するための評価系を構築することを目的とした。得られた成果の概要は以下の通りである。

(1) 臨床現場において臓器移植時の拒絶反応を抑えるために用いられているカルシニューリン阻害剤は、拒絶反応で中心的な役割を担う T 細胞において転写因子 NFAT の活性化抑制を介し、その増殖に必須なサイトカイン interleukin-2 (IL-2) の転写を強く抑制する。しかしながら、カルシニューリン阻害剤は免疫抑制作用が非常に強力である一方、NFAT 阻害に基づくと考えられる腎毒性が報告されている。HDAC 阻害剤も IL-2 転写を抑制することが知られていることから、本研究ではその作用に着目してメカニズムの解析を行った。GeneChip 解析およびレポータージーンアッセイ等の結果、HDAC 阻害剤は NFAT の活性化を阻害することなく IL-2 転写を抑制すること、特に高用量域では転写因子 NF κ B の活性化を顕著に抑制することがわかった。これらの結果は、HDAC 阻害剤がカルシニューリン阻害剤とは異なる作用機作によって免疫抑制作用を発揮すること、新規免疫抑制剤として有望であることを示唆している。

ヒトの HDAC には、これまでのところ 11 種類のアイソザイムの存在が報告されており、細胞内においてメンバーごとの機能分担があることが予想されている。最近、HDAC4 が IL-2 promoter へ結合しうることが報告されたことから、HDAC4 の IL-2 転写制御への関わりについて調べた。RNAi を利用した HDAC4 の選択的なノックダウン、および酵素活性を失わせた変異体の過剰発現等により、HDAC4 が IL-2 転写誘導に必須であることを初めて明らかにした。

さらにIL-2転写誘導において、HDAC4の酵素活性に依存したHDAC4とコリプサーN-CoRとの複合体形成が重要であり、HDAC阻害剤はこの複合体形成を阻害することを見出した。これらの結果は、HDAC4/N-CoR複合体が新たな免疫機能抑制の標的になりうること、ひいてはHDAC4選択的なHDAC阻害剤が有望な免疫抑制剤になりうることを示唆している。

(2) HDAC阻害剤の副作用の一つである血小板減少に関する作用機作の解析を行った。これまでに複数のHDAC阻害剤の臨床試験で血小板減少が副作用として報告されており、HDAC阻害剤を投与したラットでも同様に血小板減少が確認された。また、その特徴は骨髄毒性によるものではなく、血小板産生細胞である巨核球数の増加を伴うものであることが判明した。この特徴が転写因子GATA-1欠損マウスのそれとよく類似していたことから、HDAC阻害剤と転写因子GATA-1の関係をラットにおいてreal-time PCRおよび*in situ hybridization*により調べたところ、巨核球におけるGATA-1の投与量依存的な発現抑制が初めて確認された。さらに、ヒト巨核球系HEL細胞を用いたレポータージーンアッセイにより、*in vitro*で容易にHDAC阻害剤によるGATA-1転写抑制が検出できることを示した。これらの結果は、HDAC阻害剤の血小板減少という副作用の回避に有用で、強力な抗癌剤および免疫抑制剤の創出に役立つ発見である。

(3) 9種類のHDAC阻害剤を用いて、*in vivo*における免疫抑制作用と血小板減少作用の関係を*in vitro*で予測可能にする評価系を構築した。免疫抑制作用としてIL-2転写抑制、血小板減少作用としてGATA-1転写抑制のそれぞれについてレポータージーンアッセイにおけるIC50値を求め、それらをGATA-1/IL-2の比(G/I比)として算出したところ、この値が*in vivo*で明確な免疫抑制作用を発揮する用量における血小板減少率と高い相関を示すことがわかった。この結果は、G/I比が血小板減少作用の少ない免疫抑制作用の強いHDAC阻害剤を効率よく、かつ信頼性高く選び出すための指標となることを示しており、強力な抗癌剤および免疫抑制剤の創出に役立つ有用な知見として応用が期待される。

氏名

松岡秀明

(論文審査の結果の要旨)

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤は、リジン残基からアセチル基を取り除く加水分解酵素HDACを阻害することで細胞内タンパク質の過剰なアセチル化を引き起こし、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導等、様々な作用を発揮する。特に臓器移植領域では新規の免疫抑制剤の創出が強く求められており、多様な作用を併せ持つHDAC阻害剤はその有力な候補の一つである。本論文では、HDAC阻害剤の免疫抑制作用ならびに主たる副作用として認められる血小板減少作用に焦点を当て、それぞれの作用機作の解析を行った。

本論文で評価すべき主要な点は以下の通りである。

(1) HDAC 阻害剤が、転写因子 NF κ B の活性化抑制を介して IL-2 転写を抑制するメカニズムを明らかにし、カルシニューリン阻害剤とは異なる作用機作を有する有望な免疫抑制剤であることを示唆した。また、HDAC4/N-CoR 複合体が IL-2 転写誘導に必須であり、HDAC 阻害剤がその複合体形成を阻害することを初めて解明した。

(2) HDAC 阻害剤による血小板減少が血小板産生細胞である巨核球での転写因子 GATA-1 の転写抑制に基づくことを明らかにした。

(3) *In vitro* における GATA-1 および IL-2 レポーター遺伝子アッセイの IC₅₀ 値の比を求めることで、*in vivo* において血小板減少作用の少ない免疫抑制作用の強い HDAC 阻害剤を効率よく信頼性高く選び出すことが可能であることを示した。

以上のように、本論文は、HDAC阻害剤による免疫抑制および血小板減少に関する作用機作を、分子生物学的手法を用いて解析し、HDACの転写制御における役割を明らかにするとともに、無数に存在する化合物の中から臓器移植領域における免疫抑制剤として、有効性が高くかつ毒性の低い特性を有する新規なHDAC阻害剤を、効率よくかつ信頼性高く選び出すことを可能にしたものである。これらの研究成果は、遺伝子の発現制御にかかわる転写因子の役割解明を通じて、強力な抗癌剤および免疫抑制剤の創出に役立つ有用な基礎知見を得たものであり、分子生物学、細胞生物学、生化学などの分野に寄与する所が大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成20年6月20日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。