

氏名	矢 熊 弘 二
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	薬博第 536 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	抗がん剤プレオマイシンのゲノム機能解析とその分子作用機作に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 辻本豪三 教授 杉浦幸雄 教授 川寄敏祐

論文内容の要旨

第一編 プレオマイシン誘導性肺線維症における遺伝子ネットワークに関する研究

プレオマイシン (BLM) は、皮膚癌などに対し注射薬や塗布薬として使用されている抗腫瘍性抗生物質であり、DNA 鎖の切断および DNA 合成の阻害により効果を発揮する。BLM は優れた抗腫瘍活性を示すが、一方で副作用として肺線維症を誘発しやすい。肺線維症とは、肺組織に瀰慢性の線維増殖が起こり、肺の拡張不全、容量の減少による呼吸機能障害を示す一連の疾患で、肺傷害に対する修復機能異常が原因であると考えられている。また肺線維症は BLM 投与により誘発されるほか、多様な原因で引き起こされるが、そのうちの大多数は原因がはっきりと特定できず、未だに有用な薬剤は少ない。

本研究は、BLM による肺線維症の発症機構に関与している特異的遺伝子を探索し、ゲノムスケールでの発症メカニズムの解明を目的としている。そのため、多数の遺伝子発現を網羅的に解析できる cDNA マイクロアレイを用い、BLM 投与マウスの肺における遺伝子解析を行った。さらに、Medline データベースに登録されている文献情報から遺伝子ネットワークを作成し、マイクロアレイ実験により得られた遺伝子の共発現情報に基づくネットワーク解析を行った。

(第一章) cDNA マイクロアレイを用いたマウス肺におけるプレオマイシン応答遺伝子群の探索

cDNA マイクロアレイには、ラット肺基準化 cDNA ライブラリー由来の 4224 クロオンを配置した。ターゲット DNA は、病態モデルマウスにプレオマイシンを、コントロールマウスに生理食塩水のみを気管内投与して、2, 5, 7, 14 日後に摘出した肺から得られた mRNA を逆転写することで調製した。病態モデルマウスの肺は、コントロールよりも明らかに重く、線維が蓄積していることを確認した。

得られたターゲット DNA と cDNA マイクロアレイとのハイブリダイゼーションを行い、2, 5, 7, 14 日目のいずれかで 1.5 倍以上の変動があった遺伝子について k-means 法を用いてクラスター解析を行った。その結果、投与 5 日目に発現変動が最大になるクラスターにはシグナル伝達、免疫、アポトーシスなどに関する遺伝子群、14 日目に発現変動が上昇するクラスターには癌関連、蛋白分解関連、呼吸関連などの遺伝子群が得られた。細胞外マトリックスは 2 日目付近から発現量が上昇した。また、surfactant protein C が 2 日目に、globin は 5 日目に発現が最も抑制されていた。

以上より、BLM 誘導性肺線維症の発症過程は前半の炎症過程と後半の線維化過程に分けられることが確認された。炎症過程では大規模な遺伝子の発現変動が認められるが、それらは線維化による肺障害の修復とともに抑制される。通常は炎症の鎮静とともに線維の増加はおさまるが、何らかの原因で機能異常が起こり、多重の線維蓄積によって肺の弾性が弱まり、呼吸障害などを起こすようになると考えられる。

(第二章) MEDLINE-based ネットワークと遺伝子発現情報を用いたプレオマイシン誘導性肺線維症の遺伝子ネットワーク解析

MEDLINE データベースに登録されている文献の予約テキストから遺伝子間の相互関係を抽出するプログラムを作成し、遺伝子間相互作用ネットワークを構築した。ここで構築した MEDLINE に基づく遺伝子間ネットワークは、個々の文献に

同時に出現する遺伝子間を相互に結合することによって作成した大規模ネットワークであり、遺伝子間の生物学的関連を網羅的に表現するものである。従って、この関連遺伝子間ネットワークに、マイクロアレイ実験から得られた遺伝子発現情報を重ね合わせることにより、ネットワーク構造を反映した共発現遺伝子クラスターの抽出が可能となる。そこで、プレオマイシン誘導肺線維症マウスのマイクロアレイデータを用いて、このMedline-based 遺伝子ネットワークから疾患関連遺伝子クラスターの抽出を試みたところ、今回作成したマイクロアレイ上には存在しない複数の遺伝子が肺線維症に関係する可能性が示された。それらの遺伝子の中には肺線維症に深く関係することが明らかにされている cytosolic phospholipase A2 などが含まれていた。

第二編 プレオマイシンとDNAの分子レベルでの相互作用に関する研究

プレオマイシンは癌細胞内のDNAを(5')G-C(3')配列あるいは(5')G-T(3')配列特異的に認識し、その主鎖を切断することにより抗癌作用を示すことが知られている。また、プレオマイシンは鉄や銅などの金属イオンとキレートした状態を人為的にコバルトに置換したプレオマイシンは、強い光エネルギーを与えない限りDNA切断を行わない。そこでプレオマイシンのDNA認識機構を解明するため、コバルトとキレートしたプレオマイシンとDNAフラグメントとの複合体の結晶化を行い、X線結晶構造解析における初期段階の研究を行った。結晶の空間群はP212121、格子定数は $a = 34.52$, $b = 59.88$, $c = 72.93 \text{ \AA}$ であった。また表面プラズモン共鳴を用いた実験でプレオマイシンとDNAの解離定数を求めた。

論文審査の結果の要旨

第一編第一章「cDNAマイクロアレイを用いたマウス肺におけるプレオマイシン応答遺伝子群の探索」では、プレオマイシンにより誘発される肺線維症の発症機構の解明を目的として、同疾患における遺伝子発現プロファイルの時系列データの解析を行っている。データ解析に結果、プレオマイシン誘導性肺線維症ではまず炎症反応に関与する遺伝子が発現亢進し、続いて線維化に関与する遺伝子の発現が亢進することが明らかにされている。また、遺伝子発現プロファイルの経時変化から組織レベルの状態変化を推定することに成功しており、遺伝子発現プロファイルの妥当性が示されている。本論文におけるプレオマイシン誘導性肺線維症で発現変動が確認された遺伝子群は同疾患に直接関与している可能性が高く、創薬ターゲット候補として非常に興味深い内容であると認める。

第一編第二章「MEDLINE-basedネットワークと遺伝子発現情報を用いたプレオマイシン誘導性肺線維症の遺伝子ネットワーク解析」ではマイクロアレイデータとMEDLINE文献情報とを融合した新規ネットワーク解析を開発し、プレオマイシン誘導性肺線維症の解析を行っている。マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析法は、現在のゲノム解析において欠かせない技術となっているが、その解析対象はmRNAに限定される。本論文において開発された新規ネットワーク解析法は、マイクロアレイでは解析が不可能であるタンパク質、脂質、生体内低分子に関する知見を得ることを可能としたものであり、優れた新規ポストトランスクリプトーム解析法として価値あるものと認める。

第二編「プレオマイシンとDNAの分子レベルでの相互作用に関する研究」ではプレオマイシンのDNA認識機構を解明することを目的として、プレオマイシン：DNA複合体の結晶化を行い、X線結晶構造解析における初期段階の研究を行っている。プレオマイシン：DNA複合体のX線構造解析に関する報告は本論文が最初である。またプレオマイシン：DNA複合体結晶の結晶学的データと構造既知のDNA単独結晶の結晶学的データを比較し、複合体結晶の分子構造についての検討が行われている。本論文で提示されている分子構造は妥当なものであるが、プレオマイシンとDNAの分子間相互作用を明らかにするためにはX線反射データの位相付けを行い、正確で詳細な立体構造を得る必要があると考えられる。今後、プレオマイシン：DNA複合体結晶のX線構造解析を完遂し、プレオマイシンのDNA認識およびDNA切断に関する分子レベルでの詳細な作用機構を解明することで、より治療効果が高く、副作用の少ない抗がん剤を設計することが可能になるものと期待される。

以上、本論文ではプレオマイシンによる肺線維症の発症および進行に関わる遺伝子、薬物の探索とプレオマイシン：DNA複合体の結晶化について論じられている。肺線維症の発症および進行に関わる遺伝子、薬物は創薬ターゲット分子候補として非常に興味深いものであり、またプレオマイシン：DNA複合体の結晶化は、プレオマイシンとDNAの分子レベルでの詳細な作用機構の解明に繋がり、有用な抗がん剤の開発の一助となるものと期待される。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年2月26日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。