

京都大学	博士 (医学)	氏 名	八尾 尚幸
論文題目	AV-65, a novel Wnt/ β -catenin signal inhibitor, successfully suppresses progression of multiple myeloma in a mouse model (新規 Wnt/ β -カテニンシグナル伝達阻害剤 AV-65 はマウスに移植された多発性骨髄腫細胞の増殖を有意に抑制する)		
(論文内容の要旨)			
<p>Wnt/ β-カテニンシグナルの異常活性化が多くの腫瘍の増殖と進展に関与していることが知られている。β-カテニンは Wnt/β-カテニンシグナル経路の下流のエフェクター分子であり、cyclinD1 や c-Myc などの増殖に関与する遺伝子を制御している。多発性骨髄腫(MM)でもβ-カテニンの過剰発現が増殖に関与しており、申請者らはβ-カテニン siRNA による MM の増殖抑制効果を確認しており、β-カテニンが MM の治療ターゲットとなりうることを明らかにしている(Ashihara E, et al. Clin Cancer Res. 2009.)。今回、siRNA 技術を応用したハイスループット スクリーニングにより見出された新規 Wnt/β-カテニンシグナル阻害剤 AV-65 による MM 治療に対する有効性とその抗腫瘍作用の機序を解析した。</p> <p>AV-65 は時間及び用量依存性にMM細胞の細胞質内と核内β-カテニンの発現を減少させ、その結果、作用 72 時間の時点では、8 つのMM細胞株に対して 11.7~82.1 nMと非常に低いIC₅₀値で増殖抑制効果を示した。AV-65 により細胞質内β-カテニンのユビキチン化が促進されていることを確認し、これらにより細胞質内β-カテニンが分解され、核内β-カテニンが減少していると考えた。レポーターアッセイ法にてAV-65 によるβ-カテニン/TCF転写活性の低下を確認し、さらにウエスタンブロット法にてWnt/β-カテニンシグナル経路の標的遺伝子である cyclinD1 やc-Mycなどの発現低下を認めた。加えてAnnexin V-FITC、PI染色によるFACS解析にて、AV-65 が用量依存性にMM細胞をアポトーシスへと導くことが明らかとなった。以上のことから、AV-65 により核内β-カテニンの発現が減少し、Wnt/β-カテニンシグナルの標的遺伝子であるcyclinD1 やc-Mycなどの転写が抑制された結果、MM細胞をアポトーシスに誘導し、MM細胞の増殖を抑制することを明らかとした。</p> <p>次にAV-65の作用機序についても検討した。β-カテニンはユビキチンリガーゼβ-TrCPによりユビキチン化され、26S プロテアソームに運ばれて分解される。AV-65 はβ-TrCP の発現を促進し、β-TrCP とβ-カテニンの結合を増強することでβ-カテニンの分解を促進し、発現を減少させることが明らかとなった。そこでβ-TrCP をノックダウンした細胞株を作製し、AV-65 によるβ-カテニンの発現減少がみられないことを確認し、β-TrCP が AV-65 によるβ-カテニンの分解メカニズムに重要な役割を果たしていることを実証した。</p> <p>また、MM 細胞株 IM-9 を骨髄に生着させることにより正所性 MM マウスモデルを作製し、このマウスに AV-65 の投与を行った。その結果、AV-65 投与群(8 mg/kg/body)では AV-65 未投与群に対して、有意差を持ってマウスの生存日数が延長した。このことから、AV-65 が <i>in vivo</i> においても高い治療効果を有していることが確認できた。さらに AV-65 の骨髄造血能への影響を調べるため、AV-65 投与後のマウス骨髄細胞を用いてコロニーアッセイを行ったところ、AV-65 投与による造血能への影響は認めなかった。</p> <p>以上のことから、AV-65 が Wnt/β-カテニンシグナルを阻害することにより MM 細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。これらの結果から、AV-65 が MM に対する新たな機序をもった分子標的治療薬となりうる可能性が示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

多発性骨髄腫(MM)の分子病態が解明され、種々の分子標的薬が開発されているが、なお薬剤による完治を得ることは困難である。次々と明らかにされる MM の分子病態を基に、新しいメカニズムを持った新しい分子標的薬の開発は喫緊の課題である。この目的のため、申請者は新規 Wnt/ β -カテニン阻害剤 AV65 の MM 細胞に対する有効性を検討した。

AV65 が低濃度のIC₅₀(11.7~82.1 nM)でMM細胞株の増殖を阻害することを確認した。AV-65 投与によりMM細胞の β -カテニンが分解され、核内 β -カテニンの集積が減少する。それに伴いcyclinD1 やc-MycなどのWnt/ β カテニンシグナル経路の標的遺伝子の発現が減少し、アポトーシスによる細胞死が誘導されることを確認した。また申請者は、AV65 の作用機序がユビキチンリガーゼ β -TrCPの活性増強による β カテニンの分解亢進であることを明らかにした。さらにMM細胞株を用いた正所性MMマウスにおいて、AV-65 投与マウスでは生存期間の延長を認めており、本薬剤がMMに有効な治療薬となりうることを*in vivo*で実証した。

以上のことから、AV-65 が Wnt/ β -カテニンシグナルを阻害することにより MM 細胞の増殖を抑制することを明らかにした。これらの結果は、AV-65 が MM に対する新たな機序をもった分子標的治療薬となりうる可能性を示唆するものである。

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、平成 24 年 2 月 10 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