

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	花木 祐輔
論文題目	Structure-Activity Studies on the Simplified Analog of Aplysiatoxin and Identification of the PKC Isozymes Involved in Its Anti-Proliferative Activity (アプリシアトキシン単純化アナログの構造活性相関とがん細胞増殖抑制に関わる PKC アイソザイムの同定)		
(論文内容の要旨)			
セリン／スレオニン特異的リン酸化酵素であるプロテインキナーゼ C (PKC) は、細胞の増殖、分化、アポトーシスなどに関わるシグナル伝達を制御していることから、がん治療における標的酵素の一つとして注目されている。12-<i>O</i>-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) や debromoaplysiatoxin (DAT) などの天然の発がん促進物質が PKC を強力に活性化することから、古くから PKC 阻害剤が抗がん剤として期待されてきたが、それらを用いた臨床試験はあまり良い結果が得られていない。近年、多くのがん細胞において PKC の機能が低下または欠損していることが明らかになり、PKC を活性化する薬剤が有望な抗がん剤候補として見直されてきている。実際に、天然の PKC 活性化剤は数種のがん細胞株に対して増殖抑制活性を示すことから、これらがもつ発がん促進性ならび炎症性を選択的に取り除くことができれば抗がん剤として利用できる可能性がある。 最近、DAT の単純化アナログである aplog-1 や 10-methyl-aplog-1 が、発がん促進性や炎症性を示さず、数種のがん細胞株に対して顕著な増殖抑制活性を示すことから、新しい抗がん剤シードとして期待されている。しかしながら、10-methyl-aplog-1 の構造は最適化されていない上、これらの化合物のがん細胞増殖抑制における各 PKC アイソザイムの役割も不明であった。本論文は、aplog 類の構造活性相関を調べるとともに、がん細胞増殖抑制における PKC の役割をアイソザイムレベルで解析した結果を取りまとめたものである。 第 1 章では、PKC アイソザイムの細胞内情報伝達における役割、ならびにこれまでに報告されている天然の PKC 活性化剤の各種生物活性とその作用機構について概説し、本研究の目的および意義について述べている。 第 2 章では、aplog-1 の活性発現に重要な役割を果たしている 27 位水酸基を修飾した誘導体 3 種の合成と生物活性について述べている。27-(<i>R</i>)-Methyl-aplog-1 は aplog-1 と同程度に PKCδ を活性化し、試験した 39 種のがん細胞株のうち、約 9 種の細胞株の増殖を顕著に抑制した。一方で、27-(<i>S</i>)-methyl-aplog-1 および 27-<i>O</i>-methyl-aplog-1 は PKCδ を活性化せず、39 種類すべてのがん細胞株に対する増殖抑制活性も低かった。以上の結果は、aplog 類の細胞株選択的な増殖抑制活性に PKC アイソザイムの活性化が関与していることを示唆している。 第 3 章では、10-methyl-aplog-1 のフェノール性側鎖における構造活性相関について述べている。10-Methyl-aplog-1 の側鎖の <i>m</i>-ヒドロキシフェニル基をフェニル基またはシクロヘキシル基にそれぞれ変換した誘導体を合成した。フェニル基に変換した誘導体は 10-methyl-aplog-1 と同程度の PKCδ-C1B ドメイン (δ-C1B) 結			

合能を示したが、シクロヘキシル基に変換した誘導体の結合能は 1 オーダー低下した。ドッキングシミュレーションによって各誘導体と δ -C1B との結合様式を調べたところ、10-methyl-aplog-1 の *m*-ヒドロキシフェニル基が δ -C1B の Met-239 および Pro-241 残基との間に、それぞれ水素結合形成または CH/ π 相互作用の存在が予想された。一方、シクロヘキシル基ではこのような相互作用がないため、結合能が低下したものと考えられる。さらに、シクロヘキシル基に変換した誘導体は、弱い発がん促進性ならびに顕著な炎症性を示した。これらの結果は、10-methyl-aplog-1 のフェノール性側鎖と C1 ドメインとの相互作用が、PKC との結合能を高めることによって、副作用の抑制に関与していることを示唆している。

第 4 章では、がん細胞増殖抑制における PKC の役割をアイソザイムレベルで解析した結果について述べている。10-Methyl-aplog-1 は、試験した 9 種のがん細胞株のうち A549 と SW620 の細胞周期を阻害し、Colo-205 に対してアポトーシスを誘導した。また、これらの作用は PKC 阻害剤存在下で有意に低下したことから、PKC アイソザイムの関与が示唆された。そこで、これら 9 種のがん細胞株における各 PKC アイソザイムの発現量を定量したところ、PKC α および δ の発現量が他のアイソザイムと比較して 10 倍以上高いことが判明した。そこでまず、A549 における PKC α の発現を siRNA でノックダウンしたところ、10-methyl-aplog-1 の増殖抑制活性は顕著に低下したのに対し、PKC δ のノックダウンの影響は小さかった。一方、SW620 および Colo-205 においては、PKC α または δ のいずれか一方の発現をノックダウンしても効果はなく、両者を同時にノックダウンした場合にのみ増殖抑制活性が有意に低下した。以上より、10-methyl-aplog-1 は、PKC α 、あるいは PKC α および δ の活性化によって、細胞周期の阻害やアポトーシスを引き起こすことが示唆された。一方で、天然の PKC 活性化剤である DAT および TPA のがん細胞増殖抑制活性についても、細胞株選択性や増殖抑制に関わる PKC アイソザイムは 10-methyl-aplog-1 と同じであった。

以上の結果より、本論文は、発がん促進性や炎症性などの副作用を抑えた PKC α および δ の活性化剤は、新しいタイプの抗がん剤シードになる可能性がある」と結論している。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 3 8 字×3 6 行で作成し、合わせて、3, 0 0 0 字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、4 0 0 ~ 1, 1 0 0 words で作成し
審査結果の要旨は日本語 5 0 0 ~ 2, 0 0 0 字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

Debromoaplysiatoxin (DAT) は、細胞内情報伝達の鍵酵素であるプロテインキナーゼ C (PKC) の強力な活性化剤であり、発がん促進性や炎症性を示す一方で、数種のがん細胞株に対して増殖抑制活性を示す。DAT の単純化アナログである aplog-1 および 10-methyl-aplog-1 は、発がん促進性や炎症性を選択的に取り除いた PKC 活性化剤であり、新しいタイプの抗がん剤シードとして有望視されている。本論文では、aplog 類の構造活性相関を系統的に調べるとともに、がん細胞増殖抑制における PKC の役割をアイソザイムレベルで精密に解析したものである。評価すべき主要な点は以下の通りである。

1. PKC 活性化に関わっていると推定された 27 位水酸基またはフェノール性側鎖における誘導体 5 種を合成し、それらの各種生物活性を評価した。その結果、aplog 類のがん細胞株選択的な増殖抑制活性に PKC アイソザイムが関与していることを示した。また、aplog 類のフェノール性側鎖が、発がん促進性や炎症性の抑制に関与していることを明らかにした。
2. これまで、aplog 類のがん細胞増殖抑制活性に関わる PKC アイソザイムは不明であったが、各がん細胞株における PKC アイソザイムの発現量の定量並びに siRNA によるノックダウン実験により、PKC α 、あるいは PKC α および δ が増殖抑制に関与していることを明確にした。PKC α および δ の活性化は、特定のがん細胞株に対してのみ細胞周期の阻害やアポトーシスを引き起こすことから、特定のがんに対する副作用の少ない治療法の開発につながる成果である。

以上のように、本論文は、PKC 活性化を介したがん細胞増殖抑制機構の一端を示すとともに、天然の PKC 活性化剤を利用した新しいがん治療戦略を提示するものであり、生命有機化学、酵素化学並びに医薬品化学の発展に寄与するところが大きい。

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 30 年 2 月 16 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。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から 3 ヶ月以内）