

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	村 井 竜 也
論文題目	A novel screen using the <i>Reck</i> tumor suppressor gene promoter detects both conventional and metastasis-suppressing anticancer drugs (<i>Reck</i> 腫瘍抑制遺伝子プロモーターを用いた新たな抗がん剤スクリーニング系の開発)		
(論文内容の要旨)			
<i>Reck</i> は、活性化 <i>RAS</i> がん遺伝子により形質転換したマウス線維芽細胞の形質を正常復帰させる遺伝子として単離同定された。これまでの研究から、RECK はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を抑制すること、多くの悪性腫瘍において RECK の発現低下が見られ腫瘍における RECK の発現と予後の良否が正に相関していること、RECK が腫瘍細胞の浸潤、転移、血管新生を抑制することが明らかとなった。さらに、活性化 <i>RAS</i> が、遺伝子座上流 4.1 kb の範囲に渡って存在する <i>Reck</i> プロモーターの活性を抑制することが見いだされ、RECK が発がんに伴って転写レベルで発現抑制されていることが示された。以上の事柄を踏まえると、<i>Reck</i> のプロモーター活性を上昇させる化合物が見いだされたとすれば、それらを抗腫瘍薬、または転移を抑制し予防するための補助的治療薬として適応できる可能性が考えられる。加えて、それらによって RECK 発現制御の分子メカニズムに関する知見が得られる可能性が期待される。 しかし、どのような化合物が <i>Reck</i> プロモーター活性を増大させるのかについては、これまでほとんど知られていなかった。そこで、本研究では、<i>Reck</i> プロモーター活性の活性化効果を定量することを目的とした新規レポーター遺伝子導入細胞を作製した。Tet-off promoter system によって制御される誘導型 <i>HRAS^{12V}</i> 遺伝子及び、<i>Reck</i> プロモーター結合ヒト分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子が導入された評価系細胞株 YM3 を樹立した。そして、その細胞を用いた薬物スクリーニングを行い、広範な生物活性領域から選ばれた既存の小分子化合物 880 種類をまとめたケミカルライブラリーについて、それらの <i>Reck</i> プロモーター誘導活性を体系的に測定して解析を行った。その結果、ポジティブコントロールとして使用した hypothemycin より高い活性を示し、且つこの系において <i>HRAS^{12V}</i> の誘導を阻害する標準薬物として使用した doxycycline 以上の活性を有していたものとして 34 種類の化合物を見いだした。これら化合物を、それらの治療適応領域を基に分類したところ、代表的な適応領域を持つ化合物群 7 クラス及びそれらに属さないその他 1 クラスの併せて 8 カテゴリーに分類することができた。そして、特に、既存の抗がん剤が 10 種見いだされ、その分類表において一番大きなグループを形成していることが分かった。加えて、分類表のクラスにまたがって存在する共通の限定されたターゲットが複数見いだされており、<i>Reck</i> プロモーター活性の制御に対しては細胞内酸化ストレスまたは細胞内ストレス応答等の関与が示唆された。 また、異なったクラスから選択された高活性の薬物 4 種類及び hypothemycin については、プロモーター活性の上昇に加えて、数種の細胞株で RECK タンパク質発現の増加が認められた。さらに、今回のスクリーニングで最も活性が高かった抗酒癖薬の disulfiram は、高転移性ヒト線維芽肉腫細胞の形態をフラットにしてその移動度を抑制するとともに、ヌードマウス皮下移植モデル系では、			

その自然肺転移能を強く阻害した。 以上のことから、このスクリーニング系は効率的に抗腫瘍活性もしくは抗転移活性を有する化合物を選別していることが考えられた。そして、<i>Reck</i> プロモーター活性の活性化効果を基準としたこの新たな抗がん剤スクリーニングフォーマットの概念が有意義であると考えられた。今後は、この研究成果が新規抗がん剤の発見等のがん治療の進展に活かされることが期待される。 (論文審査の結果の要旨) 悪性転換抑制遺伝子 RECK は、膜結合型 MMP 制御因子をコードし、多くの悪性腫瘍において発現低下が見られる。RECK を腫瘍細胞で強制発現させると、浸潤、転移、血管新生などの抑制が見られる。そのため、RECK は非悪性細胞のマーカーであると同時に癌治療のエフェクターとしても有用と考えられた。 そこで、申請者らは、<i>Reck</i> プロモーター活性を上昇させる化合物のスクリーニング系を樹立し、既知の生理活性低分子化合物 880 種類を用いたスクリーニングを試みた。その結果、ポジティブコントロール (MEK 阻害剤 hypothemycin) より高い活性を示す化合物 34 種が検出されたが、この内、10 種が既知の抗がん剤だった。活性が上位の 4 種を用いた実験から、内在性 RECK タンパク質の発現誘導も確認された。また、最上位だった抗酒癖薬 disulfiram については、新規に樹立された自然肺転移モデル系における転移抑制効果が確認された。これらの結果は、本研究で開発された <i>Reck</i> プロモーター・リポーター系および自然転移モデル系が、新規抗がん剤の探索に有用であることを示唆する。また、今回見出された化合物は、<i>Reck</i> 遺伝子の転写制御機構解明に役立つものと考えられる。 以上の研究は、新たな抗がん剤の開発に貢献し、分子腫瘍学の発展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、平成 22 年 8 月 2 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。
--