



Title	低酸素環境選択的がん細胞増殖阻害物質 furospinosulin-1の標的分子の解明
Author(s)	河内, 崇志
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34391
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (河内 崇志)	
論文題名	低酸素環境選択的がん細胞増殖阻害物質furospinosulin-1の標的分子の解明
論文内容の要旨	
腫瘍内部は無秩序に血管網が存在するため、部分的な低酸素領域が存在する。このような低酸素環境に適応したがん細胞は、血管新生やがん転移に関わる因子を活発に産生し、化学療法や放射線療法に抵抗性を示すため、病態の悪化に大きく寄与している。その一方、生理条件下において低酸素環境は存在しないことから、低酸素環境のがん細胞選択的に細胞増殖阻害活性を示す化合物は、副作用の少ない新しい抗がん剤のリード化合物になることが期待される。また、がん細胞の低酸素適応に関わる転写因子としてHypoxia Inducible Factor-1α (HIF-1α) が知られており、HIF-1αを標的とするTarget-specific Screeningは活発に行われているが、臨床応用されている化合物は未だ存在しておらず、HIF-1αに代わる新しい薬剤標的分子も見出されていない。以上のことから、既存の化合物とは作用メカニズムが異なる医薬品の創製、およびがんの低酸素適応に関わる新規薬剤標的分子の開拓は重要な課題である。 このような背景のもと、著者は、がん細胞の低酸素適応に関わる新規責任分子を標的とする分子標的治療薬の創製を目的に、がん細胞に対する低酸素培養条件選択増殖阻害活性を指標とするPhenotypic Screening法を構築し、海綿を中心とする底生海洋生物の抽出エキスを海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーからの探索研究を行ってきた。そしてこれまでに、インドネシア産海綿<i>Dactylosporgia elegans</i>のMeOH抽出エキスから、フラノセスタテルペンfurospinosulin-1を活性物質として見出している。Furospinosulin-1は濃度依存的かつ低酸素環境選択的にヒト前立腺がんDU145細胞の増殖を阻害し、マウス肉腫S180細胞を皮下移植したマウスでの<i>in vivo</i>試験において、経口投与で良好な抗腫瘍活性を示した。また、furospinosulin-1はHIF-1の阻害剤ではなく、低酸素環境特異的に発現誘導される増殖因子insulin-like growth factor-2 (IGF-2) の発現を転写レベルで阻害するという、全く新しい作用メカニズムを持つ化合物であった。以上のことから、furospinosulin-1は抗がん剤シーズとして有望な化合物であるとともに、HIF-1以外の分子を標的としている可能性が高く、その標的分子にも興味をもたれた。 そこで本研究では、まず furospinosulin-1の<i>in vivo</i>での詳細な作用について検討を行った。低酸素領域に蓄積するpimonidazoleを用いて腫瘍組織中の低酸素領域を定量した結果、furospinosulin-1投与群の腫瘍はコントロール群と比較して、顕著な低酸素領域の減少が観察された。また、furospinosulin-1を投与することで腫瘍中のIGF-2タンパク質量の顕著な減少が見られたことから、furospinosulin-1は腫瘍組織中の低酸素領域に存在するがん細胞に作用し、IGF-2の産生を阻害することで腫瘍の増大を抑制することが示唆された。腫瘍組織内の低酸素領域に適応したがん細胞は治療抵抗性であり、かつ病態・予後の悪化に関与することから、furospinosulin-1は予後改善に向けた抗がん剤シーズとして非常に魅力的であると考えられる。 著者は次に、furospinosulin-1の標的分子の解析を行った。まず、IGF-2遺伝子のプロモーター領域に存在する転写因子結合配列のうち、furospinosulin-1が作用する配列をゲルシフトアッセイにより検討した。その結果、furospinosulin-1は低酸素環境下で培養した細胞の核抽出物とIGF-2遺伝子のP3プロモーター領域内のSp1-like配列との複合体形成を阻害することが明らかになった。そこでこの知見をfurospinosulin-1の標的タンパク質解析に応用し、furospinosulin-1によりSp1-like配列への結合が阻害されるタンパク質の同定を試みた。すなわち、低酸素条件で調製したDU145細胞の核抽出物と3'末端をビオチン標識したSp1-likeオリゴヌクレオチドを混和し、Streptavidinビーズでプルダウンした後、Sp1-likeオリゴヌクレオチドに結合したタンパク質をLC-MSにより網羅的に解析した。さらに、furospinosulin-1を競合物質として添加した条件および通常培養条件で調製した核抽出物を用いた条件との比較解析から、標的タンパク質を選別した。その結果、furospinosulin-1の標的タンパク質の候補として、これまでがん細胞の低酸素適応に関与することが全く報告されていない2つの転写制御因子、p54^{nrb}およびLEDGFを見出した。 以上の結果から、p54^{nrb}およびLEDGFがfurospinosulin-1の標的タンパク質であることが強く示唆されたため、次にfurospinosulin-1をプローブ分子化したfurospinosulin-1 probeを用いて、両タンパク質が各probeと結合するか否かを検討した。その結果、p54^{nrb}については、通常培養条件の細胞由来のp54^{nrb}とfurospinosulin-1 probeとは結合せず、低酸素条	

件で培養した細胞由来のp54^{mb}とのみ結合することが明らかとなった。一方、LEDGFについては、furospinosulin-1 probeは通常培養および低酸素培養した細胞由来のLEDGFともに結合することが確認された。さらに、リコンビナントp54^{mb}タンパク質およびリコンビナントLEDGFタンパク質を調製し、furospinosulin-1 probeとの結合親和性を表面プラズモン共鳴法 (BIACORE) により解析した結果、furospinosulin-1はp54^{mb}およびLEDGFタンパク質と直接結合し、特にp54^{mb}に関しては低酸素条件で培養した細胞由来のp54^{mb}タンパク質と選択的に結合することが明らかとなった。また、これらのことからp54^{mb}は低酸素条件で何らかの翻訳後修飾を受けることが強く示唆された。

一方、p54^{mb}およびLEDGFはがん細胞の低酸素適応に関与することはこれまでに報告されていない。そこで、DU145細胞のp54^{mb}遺伝子およびLEDGF遺伝子の発現をsiRNAを用いて抑制したときの表現型を解析することで、各遺伝子のがん細胞の低酸素適応に寄与するか否かを検討した。その結果、p54^{mb}をノックダウンした細胞では、furospinosulin-1で処理した細胞と同様に、顕著なIGF-2タンパク量の減少が見られた。一方、LEDGFノックダウン細胞では、IGF-2タンパク質の発現量に変化は見られなかった。さらに、各遺伝子の発現抑制がDU145細胞の増殖に与える影響を検討した結果、p54^{mb}遺伝子およびLEDGF遺伝子のいずれをノックダウンした細胞も、低酸素環境選択的な細胞増殖阻害を受けることが明らかになった。以上の結果から、p54^{mb}は低酸素条件下、IGF-2遺伝子の発現を促進することにより、LEDGFは未知の低酸素応答遺伝子群の発現を制御することにより、低酸素環境下でのがん細胞の生存、増殖に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (河 内 崇 志)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	小林 資正
	副 査	教 授	藤岡 弘道
	副 査	教 授	宇野 公之
	副 査	教 授	小比賀 聡

論文審査の結果の要旨

血管網が無秩序に存在する腫瘍内部には部分的な低酸素領域が存在し、このような環境に適応したがん細胞は、血管新生やがん転移に関わる因子を活発に産生し、化学療法や放射線療法に抵抗性を示すことが知られている。生理条件下においては存在しない低酸素環境に適応したがん細胞の増殖を選択的に阻害する薬物は、副作用の少ない新しい抗がん剤のリード化合物になることが期待される。これまで、がん細胞の低酸素適応に関わる転写因子としてHIF-1 α が知られているが、まだ、臨床応用されている化合物は存在しない。

申請者は、低酸素環境に適応したがん細胞に選択的に増殖を阻害する活性物質を探索する活性試験法を考案し、海洋生物の抽出エキスや海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーから探索した。そして、海綿からフラノセスタテルペンfurospinosulin-1を活性物質として見出した。

Furospinosulin-1は、濃度依存的かつ低酸素環境選択的にがん細胞の増殖を阻害し、マウスモデルでの*in vivo*試験においても経口投与で良好な抗腫瘍活性を示した。またfurospinosulin-1は、HIF-1の機能は阻害せず、低酸素環境特異的に発現誘導される増殖因子insulin-like growth factor-2 (IGF-2)の発現を転写レベルで阻害するという、新しい作用メカニズムを有することを*in vitro*および*in vivo*の実験で明らかにした。

申請者は次に、furospinosulin-1が作用するIGF-2遺伝子のプロモーター領域に存在する転写因子結合配列をゲルシフトアッセイにより解析し、IGF-2遺伝子のP3プロモーター領域内のSp1-like配列との複合体形成を阻害することを明らかにした。さらに、3'末端をビオチン標識したSp1-likeオリゴヌクレオチドを用いて、furospinosulin-1によりSp1-like配列への結合が阻害されるタンパク質の同定を試みた。その結果、furospinosulin-1の標的タンパク質が、これまでがん細胞の低酸素適応に関与することが全く報告されていない2つの転写制御因子、p54^{mtb}およびLEDGFであることを見出した。さらに、furospinosulin-1 probeとの結合実験、表面プラズモン共鳴法 (BIACORE) による結合実験やノックダウン細胞を用いた解析から、p54^{mtb}は低酸素条件下でIGF-2遺伝子の発現を促進することにより、またLEDGFは未知の低酸素応答遺伝子群の発現を制御することにより、低酸素環境下でのがん細胞の生存、増殖に関わることを明らかにした。

以上の成果は、博士（薬学）の学位論文として十分価値のあるものと認められる。