



Title	Antitumor Efficacy of Hypothemycin, A New Ras-signaling Inhibitor
Author(s)	田中, 秀和
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42775">https://hdl.handle.net/11094/42775</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

氏 名	たなか ひでかず 田 中 秀 和
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 8 7 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 2 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Antitumor Efficacy of Hypothemycin, A New Ras-signaling Inhibitor (新しい Ras シグナル阻害剤、hypothemycin の抗腫瘍効果について)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 宮坂 昌之  (副査) 教 授 金田 安史 教 授 野口眞三郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目的]

Ras 癌遺伝子はヒト膵臓癌、大腸癌、肺癌において、それぞれ90%、50%、30%の高率で変異が見つかっており、変異により活性化した Ras がもたらす細胞内シグナルは多種の腫瘍の成立に深く関わっていることが知られている。それゆえに、この Ras シグナルは抗腫瘍化学療法の標的として期待され、いくつかのタイプの阻害剤が探索研究されてきた。中でも Farnesyl transferase 阻害剤 (FTI) に関しては多数の化合物が開発されており、幾つかの化合物については現在、臨床試験が進められている。しかし FTI は H-Ras に比べ、K-、N-Ras に対しては効力が低いことが知られており、さらに近年、FTI の生体内での実際の分子標的は Ras 以外の分子 (Rho B など) である可能性が高いことが示唆されている。我々はより有効な新規 Ras シグナル阻害剤を探索するべく、新しい探索系を構築し、探索を行った。

### [方法ならびに成績]

#### 1) RRE を介した Ras 依存性の転写活性化

多くの腫瘍において、変異 Ras は転写調節領域の Ras-responsive element (RRE) を通じて、Matrix Metalloproteinase (MMP) -1、MMP-3、MMP-9、Transforming Growth Factor (TGF) - $\beta$  などの遺伝子の転写活性化を引き起こし、これらの産物は腫瘍の浸潤、血管新生、転移に促進する働きを持つ。我々は RRE の下流にレポーター遺伝子を繋げたベクターとヒト K-Ras 発現ベクターを NIH3T3 細胞に co-transfection することにより、Ras による転写活性化が RRE 特異的に起こることを確認した。

#### 2) Hypothemycin による RRE 依存性転写の抑制

次に SV40 プロモーターにレポーター遺伝子を繋げたベクターとそれに RRE を挿入したベクターを v-K-ras で形質転換した NIH3T3 細胞 (DT 細胞) に導入し、それぞれ安定導入株、DT-C 及び DT-R を得た。これらの細胞を被検化合物で処理した際、DT-R における転写のみを選択的に抑制するものを探索するアッセイ系を構築し、スクリーニングを行ったところ、*Hypothenemus trichothecoides* の産生物質である hypothemycin が濃度依存的に RRE 依存性転写を選択的に抑制することを見出した。この RRE に対する選択的抑制作用は DT 細胞を用いた transient transfection の系においても確認された。

#### 3) Hypothemycin による Ras 誘導性遺伝子の発現抑制

実際に hypothemycin が Ras 誘導性遺伝子の発現を抑制するかどうかをノーザン法により調べた。活性型 c-K-ras 遺伝子を持つマウス大腸癌細胞 Colon26 を hypothemycin で処理したところ、Ras 誘導性遺伝子である、MMP-1、MMP-9、TGF- $\beta$ 、VEGF などの発現が濃度依存的に抑制された。恒常的に発現している遺伝子である MMP-2 の発現は抑制されていないことから、これらの発現抑制は Ras 誘導性遺伝子に選択的であることが明らかとなった。

#### 4) Hypothemycin による MMP 産生の抑制

Hypothemycin の Ras 誘導性 MMP に対する発現抑制作用を zymography 法により調べた。Hypothemycin で処理した Colon26 細胞培養上清中の MMP-9、MMP-3 の量は濃度依存的に減少しており、蛋白レベルにおいても hypothemycin の Ras 誘導性遺伝子に対する発現抑制作用が確認された。

#### 5) Hypothemycin による足場非依存性増殖の抑制

活性化 Ras 遺伝子により形質転換した細胞の特徴のひとつである足場非依存性増殖に対する hypothemycin の影響を、メチルセルロース内でのコロニー形成能を指標に調べたところ、hypothemycin は DT 細胞の足場非依存性増殖を選択的に抑制することがわかった。

#### 6) Hypothemycin の抗腫瘍効果

Hypothemycin の抗腫瘍効果をマウスを用いた動物実験で調べた。背部皮内に Colon26、ヒト肺癌細胞株 Ma44、及びヒト大腸癌細胞 HCT116 を移植したマウスに、hypothemycin を連日、腹腔内に投与したところ、どの腫瘍においても用量依存性の有意な増殖抑制効果が認められた。

#### [総括]

私は本研究において、Ras シグナル経路の未知の分子をも標的にし得る、新しい Ras 阻害剤の探索系を構築した。本探索系は新しい抗腫瘍剤の開発に有用であると考えられる。さらにその探索系によって見出された hypothemycin が Ras 誘導性遺伝子に対して発現抑制作用を持ち、動物実験において抗腫瘍効果を示すことを初めて明らかにした。その抗腫瘍効果の機序は未だ明らかではないが、Ras 誘導性遺伝子の発現抑制がその抗腫瘍効果に寄与している可能性が推察され、hypothemycin は新しい作用機序を持った抗腫瘍剤の開発に繋がるものとして期待される。

### 論文審査の結果の要旨

本申請者は、固形腫瘍に有効な化学療法剤の創製という目的の下、本研究において、Ras に由来する細胞内シグナルを阻害する化合物の探索系を構築し、その系において新たに Ras 阻害剤として見出した hypothemycin の抗腫瘍効果の解析を行った。

Luciferase 遺伝子をレポーターに用いて、活性型 Ras から Ras Responsive Element (RRE) に至る細胞内シグナル経路を阻害する化合物を探索した結果、濃度依存的に RRE の活性化を阻害する化合物として、hypothemycin を見出した。本物質は MMP-1、MMP-9、TGF- $\beta$ 、VEGF などの Ras によって発現誘導される癌の悪性形質に関連した遺伝子の発現を選択的に抑制した。また、癌細胞の特徴である足場非依存性増殖を抑制した。さらにマウスを用いた実験腫瘍の増殖抑制試験では、hypothemycin を連日腹腔内投与することにより有意な効果を示すことを明らかにした。その抗腫瘍効果の作用機作として、Ras 誘導性遺伝子の発現抑制がその抗腫瘍効果に寄与している可能性が推察され、hypothemycin は新しい作用機序を持った抗腫瘍剤の開発に繋がるものとして期待される。

本研究は実験結果自体の意義もさることながら、今後の癌研究及び治療法の開発に大変重要な意義を持つものと考えられる。従って、今後の発展性や医学研究への貢献度を考慮した結果、本申請者は学位の授与に値すると考えられる。