

氏名	田中智 ^{たなか さとし}
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	論博薬科第74号
学位授与の日付	平成29年3月11日
学位授与の要件	学位規則 第4条第2項該当
学位論文題目	乳がん治療における新規なターゲット分子に関する 基礎的研究
論文審査委員	(主査) 教授 福永 理己郎 (副査) 教授 春沢 信哉 (副査) 准教授 坂口 実

論文内容の要旨

乳がんは、女性において最も一般的な腫瘍性疾患の一つであり、現在生涯で乳がん
に罹患する日本人女性は12人に1人といわれている。また乳がんによる死亡数は1980
年では年間約4,000人であったのに対して、2015年では約13,000人と、過去35年間
で3倍以上に増加しており、今日では30~50歳代の女性のがん患者における死因の第
1位となっている。乳がんの50~70%は、女性ホルモンであるエストロゲン感受性であ
ることから、乳がん治療には外科手術、放射線療法に加えて、内分泌療法と化学療法
の併用療法がよくおこなわれている。この併用療法は、薬物の毒性や副作用を低減さ
せたり、薬物療法に対する抵抗性の発現を防止したりする目的で行われる。しかし、
長期にわたる薬物治療では、高い確率で薬物抵抗性が現れることから、治療の選択肢
が限られてくる。そのため、現在新規な作用機序の薬物の開発が進められており、特
にPI3K/AKT/mTOR経路、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)4/6、アンドロゲン受容体
などをターゲットにした薬物の臨床試験が行われている。そこで、本研究は乳がん治
療における新たなターゲット分子として、プロリルオリゴペプチダーゼ(POP)とヒス
タミンH₃受容体(H₃R)に注目して、POP活性阻害薬およびH₃R拮抗薬が培養乳がん
細胞の増殖に及ぼす作用とそのメカニズムの解析を行った。

POP (EC 3.4.21.26) は、オリゴペプチド中の Pro 残基のカルボキシ基側のペプチド結合を加水分解するエンドペプチダーゼで、細胞質に局在する。動物における POP の生理的な役割は、Pro を含むペプチドホルモンや神経ペプチドの代謝に関与していると考えられており、これまでに多くの生理活性ペプチドを分解することが *in vitro* で報告されてきた。しかし、細胞内における POP の役割は十分解明されていない。哺乳動物体内における POP 活性は、脳、精巣、肝臓などで高いことが知られているほか、成体組織よりも新生児などの若く増殖が盛んな組織においてより活性が高く、正常組織と比較して多くのがん組織でも活性が上昇していることが報告されている。また、H₃R は、7 回膜貫通型の G タンパク共役型受容体であり、1983 年に Arrang らによって最初に同定された。H₃R は、ヒスタミン遊離を調節するオートレセプターとして、中枢神経系において高密度に発現しており、近年、乳がんの腫瘍部においてヒスタミン含量が高く、H₃R が発現していると報告されていることから、H₃R が腫瘍形成において重要な役割を担っている可能性が示唆されている。

(1) ヒト乳がん細胞における POP の機能解析

培養乳がん細胞株として、エストロゲン受容体陽性 (ER(+)) の MCF7 細胞と T47D 細胞、ER (-) の MDA-MB-231 細胞、正常乳腺上皮細胞として MCF12A 細胞を使用し、POP 活性阻害薬である 3-({4-[2-(E)-styrylphenoxy]butanoyl}-L-4-hydroxypropyl)-thiazolidine (SUAM-14746) が、これらの細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。その結果、SUAM-14746 は、ER (+)、ER (-) に関わらず、どの乳がん細胞に対しても濃度依存的に増殖を抑制したが、MCF12A 細胞の増殖に対しては影響を及ぼさなかった。さらにそれぞれの乳がん細胞の細胞周期に及ぼす影響を解析した結果、SUAM-14746 は、どの乳がん細胞に対しても G₁ arrest を引き起こすことで増殖を抑制し、その一部は G₀ 期に移行させることを明らかにした。また MCF7 細胞の細胞周期制御因子の発現量に及ぼす影響を解析した結果、サイクリン D、CDK4、E2F1 などの増殖促進因子の減少、増殖抑制因子である p27^{Kip1} の増加が認められた。一般的に、G₀/G₁ arrest には G₁/S チェックポイントで機能している p53 経路が関与していることがよく知られている。SUAM-14746 添加後の MCF7 細胞における p53 の発現量に関しては未検討であるが、MCF7 細胞の p53 は野生型であることが報告されている。そこで、SUAM-14746 の増殖抑制作用における p53 経路の関与を調べる目的で、p53 遺伝子欠失細胞であるヒト胃がん由来 KATO III 細胞を用いて同様に検討した。その結果、SUAM-14746 は KATO III 細胞の増殖に対しても、乳がん細胞と同様に抑制作用を示したことから、SUAM-14746 による増殖抑制作用は、p53 経路が主経路ではないことが示唆された。

さらに、POP と相互作用する細胞内因子を探索する目的で、POP 固相化アフィニティーカラムや免疫沈降法によって POP と結合するタンパク質を探索した結果、解糖系の酵素であるグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を同定した。細胞内における POP と GAPDH の相互作用を proximity ligation assay によって検出した結果、両酵素の結合は SUAM-14746 によって増加することが分かった。がん細胞では、ワールブルグ効果によって解糖が亢進していることが知られている。したがって、SUAM-14746 は、POP と GAPDH の相互作用を強め、GAPDH の高次構造に影響を与えることによって、がん細胞におけるエネルギー代謝を抑制して増殖を抑制している可能性が考えられた。これらのことより、POP の活性を阻害する薬物は、乳がんをはじめとする種々のがん細胞に対して増殖抑制効果が期待できることを明らかにした。

(2) ヒト乳がん細胞の増殖と生存に及ぼす H₃R リガンドの影響

MCF7 細胞と MDA-MB-231 細胞を使用して、H₃R 作動薬および拮抗薬がこれらの細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。その結果、H₃R 作動薬である (R)-(-)- α -methylhistamine は MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞の増殖を促進したが、H₃R 拮抗薬である OUP-186 によってその作用が拮抗されたことから、H₃R は乳がん細胞の増殖を促進的に調節していることが示唆された。さらに春沢らが開発した非イミダゾール系 H₃R 拮抗薬である OUP-186 は、ER (+)、ER (-) に関わらず、乳がん細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、細胞死を誘導することを明らかにした。OUP-186 の MDA-MB-231 細胞に対する増殖抑制作用 (IC₅₀ 値 10 μ M) は、既知の H₃R 拮抗薬である clobenpropit (IC₅₀ 値 50 μ M) や pitolisant (IC₅₀ 値 >100 μ M) よりも強力であった。さらに OUP-186 が誘導する細胞死は、annexin V 陽性細胞の増加、アポトーシス実行因子である caspase-3/7 の活性化および poly (ADP-ribose) polymerase の断片化が認められ、汎カスパーゼ阻害薬 Z-VAD-FMK が細胞死を抑制したことからアポトーシスであると考えられた。しかし、RIP1 阻害薬である necrostatin-1 によっても抑制される細胞死が含まれ、カスパーゼ非依存的な細胞死も誘導されていることが明らかになった。これらの結果より、H₃R 拮抗薬が乳がん細胞に対して細胞死を誘導することが明らかになり、OUP-186 の乳がん細胞の増殖抑制作用は既知 H₃R 拮抗薬より極めて強力であった。

以上の知見は、POP および H₃R が、乳がん治療における新規なターゲット分子であり、POP 活性阻害薬や H₃R 拮抗薬が新たな乳がん治療薬の開発につながる可能性を示唆する興味深い結果である。

論文審査の結果の要旨

乳がんは、女性において最も一般的な腫瘍性疾患の一つである。乳がんによる死亡数は過去 35 年間で 3 倍以上に増加しており、今日では 30~50 歳代の女性のがん患者における死因の第 1 位となっている。乳がん治療には外科手術、放射線療法に加えて、内分泌療法と化学療法の併用療法もよく行われており、この併用療法は、副作用を低減させたり、薬物療法に対する抵抗性の発現を防止したりする目的で行われている。しかし、長期にわたる薬物治療では、高い頻度で薬物抵抗性が現れることから、治療の選択肢が限られてくる。そのため、現在 PI3K/AKT/mTOR 経路、サイクリン依存性キナーゼ 4/6、などをターゲットにした新しい作用機序の薬物の開発が進められている。

プロリルオリゴペプチダーゼ (POP, EC 3.4.21.26) は、オリゴペプチド中の Pro 残基のカルボキシ基側のペプチド結合を加水分解するエンドペプチダーゼで、細胞質に局在する。動物における POP の生理的な役割は、Pro を含むペプチドホルモンや神経ペプチドの代謝に関与していると考えられており、これまでに多くの生理活性ペプチドを分解することが *in vitro* で報告されてきた。しかし、細胞内における POP の役割は十分解明されていない。哺乳動物体内における POP 活性は、脳、精巣、肝臓などで高いことが知られているほか、成体組織よりも新生児などの若く増殖が盛んな組織においてより活性が高く、正常組織と比較して多くのがん組織でも活性が上昇していることが報告されている。

一方、ヒスタミン H₃ 受容体 (H₃R) は、7 回膜貫通型の G タンパク共役型受容体であり、1983 年に Arrang らによって最初に同定された。H₃R は、ヒスタミン遊離を調節するオートレセプターとして、中枢神経系において高密度に発現しており、近年、乳がんの腫瘍部においてヒスタミン含量が高く、さらに H₃R が発現していると報告されていることから、H₃R が腫瘍形成において重要な役割を担っている可能性が示唆されている。

以上の背景のもと、田中智君は、乳がん治療における新たなターゲット分子として POP と H₃R に注目し、POP 活性阻害薬および H₃R 拮抗薬が培養乳がん細胞の増殖に及ぼす作用とそのメカニズムについて検討し、以下の結果を得た。

(1) ヒト乳がん細胞における POP の機能解析

田中君は、種々の乳がん細胞由来培養細胞に対する POP 活性阻害薬 3-({4-[2-(E)-styrylphenoxy]butanoyl}-L-4-hydroxy-prolyl)-thiazolidine (SUAM-14746)の影響について検討し、この阻害薬がエストロゲン受容体(ER)陽性乳がん細胞 (MCF7, T47D)と ER 陰性乳がん細胞 (MDA-MB-231) のどちらに対しても濃度依存的に増殖を抑制するのに対し、正常乳腺上皮細胞 (MCF12A) に対しては増殖抑制を示さないことを見出した。次いで、MCF7 細胞を用いて細胞周期制御の解析を行った結果、SUAM-14746 処理によって細胞周期促進因子であるサイクリン D、CDK4、E2F1 などの発現が減少するのに対し、細胞周期抑制因子 p27^{Kip1} の発現は増加し、細胞は G₁ 期停止と一部を G₀ 期に移行することが明らかになった。そこで、この G₀/G₁ 停止に G₁/S チェックポイント制御因子 p53 経路が関与しているか否かを調べる目的で、p53 遺伝子欠失細胞であるヒト胃がん由来 KATO III 細胞を用いて同様に検討した。その結果、SUAM-14746 は KATO III 細胞の増殖に対しても、乳がん細胞と同様に抑制作用を示したことから、この抑制作用は、p53 経路とは異なるシグナル経路によって引き起こされていることが示された。

一方、POP と相互作用する細胞内因子を探索する目的で、POP 固相化ゲルを用いたアフィニティー精製法によって POP 結合タンパク質を探索した結果、解糖系の酵素であるグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を同定した。細胞内における POP と GAPDH の相互作用を proximity ligation assay によって解析した結果、両酵素の結合は SUAM-14746 によって増加することが示された。

以上の結果は、POP が細胞周期の制御に機能することを示唆しており、POP が乳がんをはじめとする種々のがん細胞の化学療法における新たな標的となる可能性を示すものである。

(2) ヒト乳がん細胞の増殖と生存に及ぼす H₃R リガンドの影響

田中君は、H₃R 作動薬である(R)-(-)- α -methylhistamine が ER 陽性乳がん細胞 (MCF7) や ER 陰性乳がん細胞 (MDA-MB-231)の細胞増殖をわずかに促進するのに対し、H₃R 拮抗薬である OUP-186 は逆に増殖を強く抑制して細胞死を誘導することを示し、H₃R が乳がん細胞の生存と増殖に関与する可能性を示した。OUP-186 の MDA-MB-231 細胞に対する増殖抑制作用 (IC₅₀ 値 10 μ M) は、既知の H₃R 拮抗薬である clobenpropit (IC₅₀ 値 50 μ M) や pitolisant (IC₅₀ 値 >100 μ M) よりも強力であり、さらに OUP-186 が

誘導する細胞死は、annexin V 陽性細胞の増加、アポトーシス実行因子である caspase-3/7 の活性化および poly (ADP-ribose) polymerase の断片化を伴うアポトーシスであることが示唆されたが、カスパーゼ非依存的な細胞死も誘導されていることが示された。以上の結果は、H₃R が乳がんの増殖に関与する可能性を示唆しており、さらに H₃R 拮抗薬である OUP-186 が、乳がん治療薬のリード化合物となる可能性を示している。

田中智君は本研究により、POP 活性阻害薬および H₃R 拮抗薬が乳がん細胞の増殖を顕著に抑制することを示した。この成果は、POP および H₃R が乳がん治療における新規なターゲットとなる可能性を提起する重要な基礎的知見である。

以上により、上記の論文は、博士(薬科学)論文として適当と判断する。