

学 位 論 文 題 名

癌細胞を正常細胞に誘導する物質アザチロシンの 作用機構に関する研究

学位論文内容の要旨

アザチロシンはヒトの活性化したc-Ha-ras遺伝子によってトランスフォームしたNIH3T3細胞の増殖を特異的に阻害し、またrasあるいはrafでトランスフォームした細胞を正常細胞様形態に誘導することが報告されているが、その作用機構に関しては不明のままであった。アザチロシンの根本的な作用機構が明らかになれば細胞増殖シグナル伝達における新しい経路の発見、ひいては新しい癌抑制メカニズムが明らかになることが期待される。そこでアザチロシンの作用メカニズムの解明を試みた。

c-erbB-2トランスフォーム細胞に対するアザチロシンの作用

c-erbB-2癌遺伝子の異常は臨床でのヒト悪性腫瘍においてその癌化及び悪性化に深く関わっていると考えられている。そこで活性化型c-erbB-2でトランスフォームしたNIH3T3細胞（A4細胞）を用いてアザチロシンの作用を検討した。アザチロシンはA4細胞の増殖を特異的に阻害し、形態を正常細胞様の扁平な形態に変化させる活性を有していた。

癌治療に用いられている抗癌剤の大部分は細胞の高分子合成能の阻害、または細胞周期の特定の時期で細胞を止めることによってその細胞増殖阻害作用を示すが、アザチロシンはA4細胞のDNA、RNAあるいは蛋白質合成能に対して明瞭な阻害作用を示さず、またアザチロシンの増殖阻害作用は細胞周期特異的ではなかった。従って、アザチロシンは典型的な抗癌剤とは異なる作用を有するものと考えられた。

c-ErbB-2により活性化されたシグナル伝達に及ぼすアザチロシンの作用

次にアザチロシンが活性化型c-ErbB-2により引き起こされたシグナル伝達のどの過程を阻害しているのかを検討した。活性化型c-erbB-2はRasの活性型であるGTP結合型の相対レベルを増加させることが知られている。そこで活性化型c-erbB-2で誘導されるRasの活性化に及ぼすアザチロシンの作用を検討したところ、アザチロシンはGTP結合型Rasの量に影響しないことが示された。Rasの下流因子と考えられているセリン/スレオニンキナーゼであるRafの活性化はRaf自身の過度のリン酸化によって達成されることが知られている。そこで活性化型c-erbB-2で誘導されるRafの自己リン酸化に及ぼすアザチロシンの作用を検討したところ、アザチロシンは活性化型c-erbB-2により誘起されたRafの自己リン酸化の増大を阻害することが示された。さらにRafの下流に存在すると考えられているc-Jun蛋白質のリン酸化の増大及びAP-1転写活性の促進をアザチロシンは阻害した。

これらの結果からアザチロシンは活性化型c-erbB-2により引き起こされた細胞増殖

シグナル伝達をRasの下流またRafの上流で阻害していることが明らかとなった。

アザチロシンの癌細胞正常化作用とrhoB発現促進

1992年 Krzyzosiakらは活性化型rasトランスフォーム細胞をアザチロシン存在化で培養するとrrg、collagen type III、rhoB等幾つかの遺伝子の転写が誘導されることを示した。これらの中でrhoB遺伝子産物はアクチンファイバーの形成を介して細胞の形態を制御していると考えられている蛋白質である。そこでアザチロシンによる癌細胞の正常化作用にrhoBの発現促進が関与しているか否かを検討した。

まずA4細胞のrhoB発現におけるアザチロシンの作用を調べた。A4細胞ではrhoB遺伝子の発現がNIH3T3細胞に比べ非常に減少していたのに対し、アザチロシン処理によりNIH3T3細胞の約半分にまで回復することが示された。またNIH3T3細胞では明瞭なアクチンファイバーが観察されるがA4細胞では観察されない。ところがアザチロシン処理により形態の正常化と共に再びアクチンファイバーの形成が見られた。

次にA4細胞にrhoB発現ベクターを導入し、癌化形質を調べた。rhoBを過剰発現している細胞を選択し細胞の形態を観察したところ、これらの細胞は正常なNIH3T3細胞に近い偏平な形態を示した。またアクチンファイバーの形成も回復し、さらに増殖速度もA4細胞より低下した。

これらの結果より、アザチロシンによるc-erbB-2トランスフォーム細胞の正常化にrhoBの発現誘導が関与していることが示された。

アザチロシンの蛋白質への取り込みと癌細胞正常化作用

構造上の類似性により、アザチロシンがチロシンの代わりに蛋白質に取り込まれ、結果としてアザチロシンの癌細胞正常化作用を引き起こしている可能性が考えられた。そこでA4細胞を³Hアザチロシンと共に培養し、蛋白質画分への取り込みを測定したところ、アザチロシンは細胞に取り込まれることが判明した。また過剰量のチロシンによりアザチロシンの蛋白質画分への取り込みが抑制され、またアザチロシンの癌細胞正常化作用も抑制されることが示された。従って、アザチロシンによる癌細胞の正常化作用はチロシンの代わりにアザチロシンが細胞の蛋白質に取り込まれることにより引き起こされていることが明らかとなった。

アザチロシンはrrg、collagen type III、rhoB等細胞の正常化に必要な遺伝子の発現を共通に制御する因子に取り込まれ、その因子の機能に影響を及ぼし、結果として細胞の正常化に必要な遺伝子の発現を誘起している可能性が考えられた。

まとめ

1) アザチロシンが典型的な抗癌剤とは異なる細胞増殖抑制作用を有することを明らかにした。

2) アザチロシンは活性化型c-erbB-2により活性化された増殖シグナルをRasの下流またRafの上流で阻害していることを示した。

3) アザチロシンにより誘導されたRhoが癌細胞を正常細胞様へと変化させるアザチロシンの活性に関与していることを示した。

4) アザチロシンはチロシンの代わりに細胞に取り込まれ、その結果、rhoB等の細胞の正常化に必要な蛋白質の発現を誘起し、トランスフォーム細胞を正常細胞様に復帰させることを明らかにした。

本研究より得られた結果は理想的な癌治療薬の開発において非常に有用な知見である。

学位論文審査の要旨

主査	教授	大塚	栄子
副査	教授	有賀	寛芳
副査	助教授	井上	英夫
副査	助教授	加藤	宏幸

学位論文題名

癌細胞を正常細胞に誘導する物質アザチロシンの 作用機構に関する研究

申請者は癌細胞を正常細胞に誘導する物質アザチロシンの作用を分子生物学的に解析する研究を行って来たが、アザチロシンのトランスフォーム作用、蛋白質への取り込みの機序に新しい知見を得た。

1) c-*erb*B-2 トランスフォーム細胞に対するアザチロシンの作用

c-*erb*B-2癌遺伝子の異常は臨床でのヒト悪性腫瘍においてその癌化及び悪性化に深く関わっていると考えられている。そこで活性化型c-*erb*B-2でトランスフォームしたNIH3T3細胞（A4細胞）を用いてアザチロシンの作用を検討した。アザチロシンはA4細胞の増殖を特異的に阻害し、形態を正常細胞様の扁平な形態に変化させる活性を有していた。

2) c-ErbB-2により活性化されたシグナル伝達に及ぼす アザチロシンの作用

次に申請者はアザチロシンが活性化型c-ErbB-2により引き起こされたシグナル伝達のどの過程を阻害しているのかを検討し

た。活性化型c-erbB-2はRasの活性化型であるGTP結合型の相対レベルを増加させることが知られている。そこで活性化型c-erbB-2で誘導されるRasの活性化に及ぼすアザチロシンの作用を検討したところ、アザチロシンはGTP結合型Rasの量に影響しないことが示された。Rasの下流因子と考えられているセリン／スレオニンキナーゼであるRafの活性化はRaf自身の過度のリン酸化によって達成されることが知られている。そこで活性化型c-erbB-2で誘導されるRafの自己リン酸化に及ぼすアザチロシンの作用を検討したところ、アザチロシンは活性化型c-erbB-2により誘起されたRafの自己リン酸化の増大を阻害することが示された。さらにRafの下流に存在すると考えられているc-Jun蛋白質のリン酸化の増大及びAP-1転写活性の促進をアザチロシンは阻害した。

これらの結果からアザチロシンは活性化型c-erbB-2により引き起こされた細胞増殖シグナル伝達をRasの下流またRafの上流で阻害していることを明らかにした。

3) アザチロシンの癌細胞正常化作用と *rho* B発現促進

A4細胞の*rho*B発現におけるアザチロシンの作用を調べたところ、A4細胞では*rho*B遺伝子の発現がNIH3T3細胞に比べ非常に減少していたのに対し、アザチロシン処理によりNIH3T3細胞の約半分にまで回復することが示された。またNIH3T3細胞では明瞭なアクチンファイバーが観察されるがA4細胞では観察されない。ところがアザチロシン処理により形態の正常化と共に再びアクチンファイバーの形成が見られた。

次にA4細胞に*rho*B発現ベクターを導入し、癌化形質を調べた。*rho*Bを過剰発現している細胞を選択し細胞の形態を観察したところ、これらの細胞は正常なNIH3T3細胞に近い扁平な形態を示した。またアクチンファイバーの形成も回復し、さらに増殖速度もA4細胞より低下した。

これらの結果より、アザチロシンによるc-erbB-2トランスフォーム細胞の正常化に*rhoB*の発現誘導が関与していることが示された。

4) アザチロシンの蛋白質への取り込みと癌細胞正常化作用

構造上の類似性により、アザチロシンがチロシンの代わりに蛋白質に取り込まれ、結果としてアザチロシンの癌細胞正常化作用を引き起こしている可能性が考えられた。そこでA4細胞を [³H]アザチロシンと共に培養し、蛋白質画分への取り込みを測定したところ、アザチロシンは細胞に取り込まれることが判明した。また過剰量のチロシンによりアザチロシンの蛋白質画分への取り込みが抑制され、またアザチロシンの癌細胞正常化作用も抑制されることが示された。従って、アザチロシンによる癌細胞の正常化作用はチロシンの代わりにアザチロシンが細胞の蛋白質に取り込まれることにより引き起こされていることが明らかとなった。

アザチロシンは*rrg*、collagen type III、*rhoB*等細胞の正常化に必要な遺伝子の発現を共通に制御する因子に取り込まれ、その因子の機能に影響を及ぼし、結果として細胞の正常化に必要な遺伝子の発現を誘起している可能性を示した。

以上の研究は博士（薬学）の学位を受けるのに十分値するものと認めた。