

氏 名 李 陸暉

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 281 号

学位授与年月日 平成 30 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程
薬科学専攻

学位論文題目
ハナモツ水抽出物/Laccaic acids は IFN- γ シグナルと
CTGF 発現を調節することによりがん悪性化進展を抑える
(Lac water extract/Laccaic acids inhibit tumor progression
by regulating IFN- γ signaling and the expression
connective tissue growth factor)

論文審査委員

(主査) 教授 櫻井 宏明

(副査) 教授 東田 千尋

(副査) 教授 早川 芳弘 (指導教員)

論文内容の要旨

(本文)

Tumor microenvironment consists of not only cancer cells but also various stromal cells such as immune inflammatory cells, cancer-associated fibroblasts, myeloid progenitor cells, and vascular endothelial cells. The interaction between cancer cells and other stromal cells affects tumor initiation, progression, and metastasis through the inflammatory cytokine and growth factors. Acute inflammation mediated through inflammatory cytokines has anti-tumor function, but chronic inflammation by persistent exposure to inflammatory cytokines can lead to immune resistance and promote tumor initiation and malignancy. These inflammatory microenvironment can also induce tumor plasticity such as epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). As a consequence, various neutralizing antibodies and antagonists have been approved for targeting such tumor-promoting inflammatory cytokines and growth factors.

Amongst the cancer-associated inflammatory cytokines and growth factors, Interferon (IFN)- γ is an important cytokine for the immune surveillance in tumor development. IFN- γ is regarded as an effector molecule of anti-tumor immunity to inhibit tumor growth, but recent studies have shown that IFN- γ also shows tumor-promoting function under the certain circumstances. On one hand, persistent IFN- γ exposure leads to immunosuppressive response by upregulation of PD-L1, which triggers cytotoxic T lymphocytes exhaustion and increases the resistance of cancer cells to natural killer cell lysis. On the other hand, IFN- γ regulates tumor cell plasticity and EMT, invasion, and metastasis, along with other cytokines and growth factors, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and transforming growth factor beta (TGF- β). In addition to those inflammatory cytokines, IFN- γ also regulates the secretion of connective tissue growth factor (CTGF), which is known to be important for cancer cell proliferation, migration, and invasion. Therefore, a pharmacological inhibition of its IFN- γ signaling can be an

attractive strategy for cancer therapy by suppressing its tumor-promoting function.

In this thesis, I aim to identify a new pharmacological tool to control the interaction between cancer cells and stromal cells within tumor microenvironment, especially from natural products. Natural products are a rich source of compounds for drug discovery, and many drugs are developed from natural products including anti-cancer agents. Clinically, the derivatives of natural products such as vincristine, taxol, camptothecin, etoposide, etc, have been used for cancer patients. In chapter 1, I aim to identify a natural product which suppress IFN- γ signaling. Amongst 112 kinds of natural products, I identified lac water extract as a potent inhibitor of IFN- γ signaling. Laccaic acids, major components of lac water extract, suppressed IFN- γ signaling through JAK2-STAT1-IRF1 axis. In chapter 2, I further focused on the effects of laccaic acids on cancer cell behavior, including cell migration and proliferation. CTGF negatively regulates cancer cell invasion and metastatic potential, and the stimulation with inflammatory cytokines induces cancer cell migration in concert with the suppression of CTGF expression. Importantly, laccaic acids inhibit inflammatory cytokine-induced cell migration and induce CTGF expression of cancer cells.

In summary, I propose that laccaic acids can be a lead compound to control the interaction between cancer cells and stromal cells within tumor microenvironment through regulating IFN- γ signaling and CTGF expression.

学位論文審査の要旨

がん病態の成立にはがん細胞自身だけではなく、がん細胞を取り巻く腫瘍微小環境において様々な宿主因子との相互作用が非常に重要な役割を果たす事が指摘されている。これらのがん細胞を取り巻く腫瘍微小環境の理解とその制御が新たながん治療法の開発に向けて非常に重要である。腫瘍微小環境にはがん細胞に加えて、宿主免疫細胞、がん関連線維芽細胞、骨髄由来細胞、血管内皮細胞などの様々な間質細胞を含む。がん細胞とこれら間質細胞との相互作用は、様々な増殖因子や炎症性サイトカインを介しており、腫瘍の増殖・進展や転移に影響を及ぼす。宿主免疫システムは腫瘍微小環境を構成する重要な要素であり、がん病態の成立において二面性を持つ。すなわち、がん病態の形成過程において免疫応答は腫瘍を監視する事で抑制的に働く抗腫瘍免疫応答と、慢性的な炎症によってがん促進的に働く免疫応答が存在することが知られている。炎症性サイトカインによって惹起される急性炎症は抗腫瘍作用を有するが、一方で慢性的な炎症性サイトカインへの暴露は免疫抵抗性をもたらし、腫瘍の進展・悪性を促進することが明らかになりつつある。特に、がん抗原特異的免疫応答に関わる細胞傷害性 T リンパ球の抑制やナチュラルキラー細胞に対する抵抗性を増加させる抑制性分子の PD-1 に対するリガンド分子、PD-L1 のがん細胞における発現誘導によって IFN- γ が免疫抑制的に機能してがん細胞の免疫逃避に関わることが注目されている。加えて、これらの炎症性腫瘍微小環境はがん転移に重要な上皮間葉転換 (EMT) などの腫瘍可塑性を誘発する可能性も指摘されている。IFN- γ は他のサイトカインおよび成長因子とともにがん細胞の EMT を制御する。IFN- γ は、がん細胞の増殖や浸潤・転移に重要であることが知られている結合組織成長因子 (CTGF) の分泌を誘導することも知られている。このような腫瘍促進に関わる IFN- γ 経路の腫瘍促進的な機能を抑制することは、がん治療において新たな治療戦略となり得る。

以上の背景を踏まえ、本博士論文では IFN- γ シグナルを阻害する作用を持つ天然物を探索し、腫瘍微小環境における IFN- γ を介したがん細胞-間質細胞の相互作用を制御するための新たな薬用資源としてのハナモツ水抽出物/Laccaic acids (ラッカイン酸) の有用性を明らかにした。第 1 章では IFN- γ シグナルのターゲット分子である PD-L1 のプロモーターを用いたレポーターアッセイを作成し、112 種類の天然薬物エキスライブラリーのスクリーニングによって、ハナモツ水抽出物 (Lac) が IFN- γ ターゲット分子の発現を最も強く抑制することを明らかにした。さらに Lac は IFN- γ シグナルの下流分子として知られている MHC クラス I 発現も PD-L1 発現同様に阻害したことから、Lac は PD-L1 ではなく、IFN- γ 経路を抑制していることが示唆された。分子生物学的な解析から、Lac が JAK2-STAT1-IRF1 シグナル経路を阻害していることが示された。加えて化学的なプロファイリングから IFN- γ シグナルを阻害す Lac の活性成分として Laccaic acid A、B、C、E を含むラッカイン酸を同定した。第 2 章では結合組織成長因子 (CTGF) のがん細胞増殖・浸潤における重要性、特に

上皮間葉転換における役割について明らかにした。ヒト非小細胞肺癌株での *in vitro* における浸潤能は CTGF 分泌のレベルと逆相関しており、また遺伝子導入、またはノックダウンによって肺癌細胞の CTGF 産生を増加または減少させることにより、がん細胞の浸潤・転移能がそれぞれ低下または促進された。さらに CTGF によるがん細胞の浸潤・転移制御において p38 経路が重要な下流シグナルであることを分子生物学的な手法で示した。重要なことに、Cancer Genome Atlas の肺腺がんデータセットの解析から、CTGF と p38 のリン酸化状態との間の負の相関も明らかになった。また p38 阻害剤である SB203580 の処理によって、CTGF の発現が低いがん細胞株において転移能を低下させることも示した。さらに、CTGF の発現は IFN- γ を含む炎症性サイトカインによって調節されることが知られていること、第 1 章でラッカイン酸が IFN- γ シグナル伝達の阻害効果を示したことをふまえて、がん細胞における CTGF 発現ならびに増殖・浸潤に対するラッカイン酸の効果を検討した。ラッカイン酸は炎症性サイトカインによって活性化されるがん細胞移動の阻害、ならびにがん細胞における CTGF の発現低下を回復させた。ラッカイン酸は炎症性サイトカインにより低下した CTGF 発現だけでなく、がん細胞における内在性 CTGF の発現の増加や細胞移動と増殖の阻害効果を示した。加えてラッカイン酸はがん細胞の EMT 関連分子である E-cadherin や vimentin の発現調節作用を示し、高濃度では PARP の活性化や BCL-2 の発現低下と併せて、がん細胞に対する直接的な細胞毒性も示した。

以上の成果から、ラッカイン酸が腫瘍微小環境におけるがん細胞と間質細胞との相互作用を、IFN- γ シグナルならびに CTGF 発現の制御によって調節する新たな抗がん作用を示す天然物として非常に有用であることが明らかになった。主査及び副査は、申請者 李 陸暉 氏の本学位論文の内容を精査するとともに面接審査を行い、李 陸暉 氏が博士(薬科学)の学位を受けるに十分に値すると判断した。

1. Li, L., Yokoyama, S., Han, N., & Hayakawa, Y. (2018). Lac water extract inhibits IFN- γ signaling through JAK2-STAT1-IRF1 axis in human melanoma. *RSC Advances*, 8, 21534-21540.
2. Kato, S., Yokoyama, S., Hayakawa, Y., Li, L., Iwakami, Y., Sakurai, H., & Saiki, I. (2016). P38 pathway as a key downstream signal of connective tissue growth factor to regulate metastatic potential in non-small-cell lung cancer. *Cancer science*, 107, 1416-1421.