

氏名（本籍） <sup>はも</sup> <sup>や</sup> <sup>たか</sup> <sup>ひろ</sup> 鱧屋隆博（大阪府）  
学位の種類 博士（工学）  
学位記番号 甲第1066号  
学位授与の日付 2020年3月17日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
学位論文題目 **Research on the chemopreventive effect of approved drugs on colorectal cancer and its mechanisms**  
(既存薬を利用した大腸がん予防とその作用機序解明)

論文審査委員 (主査) 教授 十島 二郎  
教授 清水 公德 教授 田村 浩二  
客員教授 武藤 倫弘(連携) 准教授 瀬木 恵里  
教授 太田 尚孝

## 論文内容の要旨

本論文では、ドラックリポジショニングの考えの下、既存薬を利用した大腸がん化学予防剤の開発を促進させる目的で、2種類の薬剤(エリスロマイシン・アルテスネイト)をスクリーニングにより見出し、実験動物を用いた有効性を検証すると共に詳細な作用機序の解明を行なった。

1981年以降、日本における死因の1位は、変わることなく悪性腫瘍(がん)である。また、近年の高齢化や食生活の変化などにより、がんの罹患者数は増加しており早急に有効ながん対策を施行する必要がある。がんの治療においては、近年第4の柱として免疫療法が注目されているが、どの疾患においても予防が一番有効であり、未然に防ぐ予防という観点から研究を行なうことが今後重要である。現在、比較的成果が報告されているがん予防研究としては、胃がんに対するヘリコバクター・ピロリ菌の除去や大腸がんに対する低用量アスピリン投与などが挙げられる。その他、子宮頸がんワクチンの効果も期待されるが、わが国における接種率は極端に低い。ヘリコバクタ

一・ピロリ菌や子宮頸がんワクチンなど感染症対策は政策レベルにまで達しているが、未だがん化学予防剤と呼ばれる薬は研究レベルに留まっている。その要因として考えられるのが、薬剤開発には高額な資金と膨大な時間を有するが、がん予防薬開発後の利潤が明らかに低いことが挙げられる。この要因を打破するための一つの方法として、現在市販されている既存薬の中からがん予防薬となる薬を見出す方法がある。ドラッグリポジショニングの考えによる新規疾患を標的にした薬剤開発には、育毛剤などがあるが、ドラッグリポジショニングの考えは、がんの予防に用いるのに最適ではないかと私は考えた。私は、ヒト大腸がん由来細胞である DLD-1 細胞および HCT116 細胞を用いて既存薬のがん化学予防剤スクリーニングを行なっている。その方法は、大腸発がんの初期段階に寄与すると考えられている細胞増殖/分化・炎症・酸化ストレスの3つの状態をそれぞれ代表とすることの出来る転写因子(TCF/LEF・NF- $\kappa$ B・NRF2)の活性を評価することで、薬剤を選別する方法である。今回は、東京大学創薬機構が管理する約 1280 種類の既存薬ライブラリーを用い、それぞれの転写因子の活性を reporter gene assay により簡便に測定した。3つの転写因子を複合的に評価した結果は既に報告してあるが、今回は、スクリーニングによって選択された薬剤の中から安全性が高く、NF- $\kappa$ B 転写活性抑制の強かったエリスロマイシン及び TCF/LEF 転写活性抑制の強かったアルテスネイトに着目し、これら二つの薬剤について *in vitro* 及び *in vivo* にてがん予防効果の検証と作用機序の解明を行なった。

一つ目の薬剤であるエリスロマイシンは、マクロライド系の抗生物質と知られ、慢性びまん性汎細気管支炎の治療薬として臨床で広く用いられている。また、抗炎症や抗酸化ストレス作用を有することがいくつかのがん細胞を用いた研究で報告が挙げられているが、大腸がんに対する予防効果に関しては報告がない。そこで、まずはヒト大腸がん由来細胞である SW48 および HCT116 細胞を用い、エリスロマイシンを添加した際の抗炎症作用について検討を行なった。今回は、がん組織が前炎症状態にあると考えられているため、炎症性サイトカインを用いて疑似的な慢性炎症状態を作成した。その結果、エリスロマイシンは炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ や TNF $\alpha$  添加により活性化された NF- $\kappa$ B の転写活性とその下流因子(IL-6, COX-2)の mRNA 発現レベルを抑制することを見出した。さらに、家族性大腸腺腫モデルマウスである Min マウスに対し、5 週齢から 13 週齢の 8 週間 500 ppm のエリスロマイシンを混餌にて投与を行なった。Min マウスはがん抑制遺伝子 *Apc* に変異のあるマウスであり、小腸を中心に腺腫(前がん病変)が多発するマウスである。その結果、投与 8 週後において、小腸近位

部位における腸ポリープの生成数が非投与群に比べて減少していた。また、腸ポリープ部位において炎症関連因子(IL-6 や COX-2)の抑制が確認された。さらに、酸化ストレスの変化については、肝臓および血液サンプルにおける活性カルボニル化合物(過酸化脂質の分解により生成される生体内の酸化ストレスマーカー)の存在量を評価し、エリスロマイシンを投与することで、この化合物の減少が確認された。以上の結果より、エリスロマイシンは炎症の抑制や抗酸化ストレス作用により、大腸がんを予防する能力があることを見出した。

二つ目の薬剤であるアルテスネイトは、2015年に中国の研究者である Tu Youyou 博士が抗マalaria薬として開発した薬剤であり、ノーベル賞を受賞する功績となった薬剤である。現在、抗マalaria薬として世界的に使用されている。また、近年、抗がん作用があることが報告され、いくつか検討されてきているが、作用機序等は未だ明確にはなっていない。そこで、私は、スクリーニングの結果をもとに、アルテスネイトをがん予防薬としても開発できると考え、アルテスネイトが遺伝子変異によって生じる過剰な Wnt シグナルに与える影響について検討を行なった。その結果、ヒト大腸がん由来細胞である DLD-1 および HCT116 細胞においてアルテスネイトは Wnt シグナルが調節する TCF/LEF の転写活性レベルおよびその下流因子(c-Myc, Cyclin D1)の mRNA 及びタンパク発現レベルを抑制した。またこの効果により、アルテスネイトの長期投与において、細胞増殖の抑制も見られた。

*in vitro* の結果を *in vivo* で確認するために、Min マウスに対してアルテスネイトの混餌投与を行なった。Min マウスは *Apc* の変異により Wnt シグナルが過剰活性化することにより、腸ポリープが生成すると考えられているマウスである。その結果、腸ポリープ生成数の抑制及び腸ポリープ部位における細胞増殖関連因子(c-Myc, Cyclin D1)の mRNA 発現の抑制が確認された。これまでの研究では、Wnt シグナルの抑制は、Wnt シグナルの調節に関わるとされる $\beta$ -catenin の存在量およびリン酸化への影により説明されてきたが、本検討では、これらの量的変化やリン酸化への影響が見られなかったことから、アルテスネイトが作用する特異的なタンパク質があると考え、その同定を試みた。今回、ナノ磁性微生物である FG ビーズを用いてアルテスネイト結合磁気ビーズを作成し、ビーズに結合したタンパクを含む液を結合タンパク抽出液として mass spectrometry にて推定タンパクの同定を行った。最終的に、推定タンパクをコードする遺伝子をノックダウンすることにより、核移行関連タンパク Ran をアルテスネイト結合タンパクであり、かつ Wnt シグナルを阻害する分子として同定した。また、アルテスネイトによる Wnt シグナルの抑制効果の減弱が Ran を siRNA にてノックダウ

ンを行なった細胞において確認された。このことは、アルテスネイトによる Wnt シグナルの抑制効果に Ran が寄与していることを示している。

TCF/LEF の転写活性化には TCF が細胞質から核内に移行する必要がある。Western blot および細胞蛍光免疫染色によりアルテスネイト投与後の TCF1 の核内量が減少していることがわかった。このことは、アルテスネイトが Ran の核内移行を助ける機能を阻害することで転写活性を抑制している可能性を示している。以上の結果より、アルテスネイトは大腸がんにおいて Ran の機能を抑制することで、過剰な Wnt シグナルが及ぼす細胞増殖を抑制すると考えられた。

最後に本研究では、既存薬ライブラリーのスクリーニングによって絞り込まれた薬剤から選択したエリスロマイシン及びアルテスネイトが *in vitro* および *in vivo* 実験にて大腸がんの抑制効果があることを示した。エリスロマイシンは、炎症や酸化ストレス作用介して腸がん抑制作用を示すことが明らかになった。また、アルテスネイトは、薬剤が直接結合しているタンパク質 Ran を介して過剰な Wnt シグナルの制御を行ない、腸がん抑制作用を示すことが明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨

近年の日本においてがんの罹患者数は増加しており、死因の一位となっており、早急に有効ながん対策を施行する必要がある。申請者の研究室では、以前ヒト大腸がん由来細胞である DLD-1 細胞および HCT116 細胞を用いて大腸がんの初期段階に寄与すると考えられている細胞増殖/分化・炎症・酸化ストレスの3つの状態を指標とした既存薬のがん化学予防剤スクリーニングを行ない、複数のがん予防剤の候補を見出した。本研究において、申請者はこれらの薬剤の中から安全性が高く、炎症抑制効果の強かったエリスロマイシン及び細胞増殖/分化の抑制効果が強かったアルテスネイトに着目し、これら二つの薬剤について *in vitro* 及び *in vivo* にてがん予防効果の検証と作用機序の解明を行なった。

エリスロマイシンは、マクロライド系の抗生物質と知られ、慢性びまん性汎細気管支炎の治療薬として臨床で広く用いられている。また、抗炎症や酸化ストレス作用を有することがいくつかのがん細胞を用いた研究で報告が挙げられているが、大腸がんに対する予防効果に関しては報告がない。申請者はヒト大腸がん由来細胞である SW48 および HCT116 細胞を用い、エリスロマイシンを添加した際の抗炎症作用について検討を行なった。その結果、エリスロマイシンは炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  や TNF $\alpha$  添加により活性化された NF- $\kappa$ B の転写活性とその下流因子(IL-6, COX-2)の mRNA 発現レベルを抑



制することを見出した。また、家族性大腸腺腫モデルマウスである Min マウスに対し、5 週齢から 13 週齢の 8 週間 500 ppm のエリスロマイシンを混餌にて投与を行なった結果、投与 8 週間後において、小腸近位部位における腸ポリープの生成数が非投与群に比べて減少することを見出した。さらに、腸ポリープ部位において炎症関連因子(IL-6 や COX-2)の抑制が確認された。以上の結果より、エリスロマイシンは炎症の抑制や抗酸化ストレス作用により、大腸がんを予防する能力があることを明らかにした。

アルテスネイトは世界的に使用されている抗マラリア薬であり、近年、抗がん作用があることが報告されているが、その作用機序等は未だ明らかにはなっていない。申請者はスクリーニングの結果をもとに、アルテスネイトの大腸がんの原因となる Wnt シグナルに与える影響について検討を行なった。その結果、ヒト大腸がん由来細胞である DLD-1 および HCT116 細胞において、Wnt シグナルが調節する TCF/LEF の転写活性およびその下流因子(c-Myc, cyclin D1)の mRNA 及びタンパク発現を抑制することを見出した。また、Min マウスに対してアルテスネイトの混餌投与を行ない、腸ポリープ生成数の抑制及び腸ポリープ部位における細胞増殖関連因子(c-Myc, cyclin D1)の mRNA 発現が抑制されることを示した。さらに、アルテスネイト結合磁気ビーズを作成し、結合タンパクを mass spectrometry にて同定した。この結果、核移行関連タンパク RAN をアルテスネイト結合タンパクとして同定した。さらに、アルテスネイトによる Wnt シグナルの抑制効果が RAN のノックダウンにより抑制されることからアルテスネイトによる Wnt シグナルの抑制に RAN が寄与していることが示唆された。これらの結果より、アルテスネイトは大腸がんにおいて RAN の機能を抑制することで、過剰な Wnt シグナルが及ぼす細胞増殖を抑制することが示唆された。

エリスロマイシンおよびアルテスネイトは既存の薬剤であり、副作用なく長期投与することが可能であることが明らかになっている。本研究で得られた結果は、これらの薬剤が *in vitro* 及び *in vivo* 実験にて大腸発がんの抑制効果があり、これらのがん予防薬として使用することができる可能性を示す重要な研究成果である。したがって、本論文は博士(工学)の学位論文として十分価値のあるものと認められる。