

## 審査の結果の要旨

氏名 孫 兵

本論文は黒色素細胞腫、結腸がん細胞、胃がん細胞、膵臓がん細胞など、様々ながん細胞で過剰発現しているタンパク質 AAG8 (Aging-Associated Gene 8 Protein)が、がん細胞内シグナル伝達において果たす役割と AAG8 阻害剤の抗がん作用に関する研究であり、全4章から構成されている。

第1章は序論であり、がん細胞の細胞内シグナル伝達ネットワーク、本研究で研究対象とした AAG8 に関する既往の研究、知見について概観し、本研究の背景と意義を述べ、本研究の目的と本論文の構成を示している。

第2章では、AAG8 が細胞質に局在化していること、また、AAG8 の特異的な阻害剤である BD1047、BD1063 の培地中への添加により、情報伝達の上流に位置する Ras の活性化を濃度依存的に阻害し、Ras-CRAF-MEK シグナル伝達経路を阻害することによってマウス黒色素細胞腫 B16F1 細胞の増殖や遊走を抑制し、細胞死を誘導できることを明らかにしている。しかし、100 $\mu$ M の阻害剤 BD1047 存在下で継続的に培養すると、5-7日後には B16F1 細胞の阻害剤耐性細胞 B16BR が出現すること、さらに、この耐性細胞 B16BR では Ras からの経路とは異なる経路で CRAF-MEK シグナル伝達経路が活性化されているため、AAG8 阻害剤に対する耐性を獲得していることを見出している。このような知見に基づいて、Ras の活性化を阻害する AAG8 阻害剤と MEK 阻害剤の併用によりマウス黒色素細胞腫に対する抗腫瘍効果が向上することを検証し、薬剤耐性の抑制にも有効であるため、AAG8 阻害剤と MEK 阻害剤の併用は黒色素細胞腫の治療法として有望な戦略になりうると述べている。

第3章では、AAG8 が腫瘍タンパク質であることを確認するために、gain and loss of function 法を用いて、各種のがん細胞内での AAG8 の役割を検討している。すなわち、AAG8 の高発現が *in vitro*、*in vivo* の双方において発がん性を亢進させ、また、結腸がん細胞 COLO205 と DLD-1、膵臓がん細胞 PANC1、胃がん細胞 AGS において、shRNA による AAG8 遺伝子のノックダウン、あるいは阻害剤による AAG8 活性の抑制によって、これらの細胞の増殖抑制、アポトーシスが誘導されること、AAG8 遺伝子をノックダウンした DLD-1 をマウスに移植した後の腫瘍形成が通常の DLD-1 を移植した場合と比較して遅くなることなどの実験結果から、AAG8 が腫瘍タンパク質であり、腫瘍化学療法の有力

なターゲット分子であると結論づけている。

AAG8 が発がん性を亢進させる分子メカニズムを明らかにする端緒となる現象として、PANC1 細胞、AGS 細胞、B16F1 細胞において阻害剤 BD1047 が転写因子 STAT3 の活性化を阻害することを発見し、AAG8 が STAT3 活性化の上流に位置する活性化因子であると述べている。また、AAG8 遺伝子をノックダウンしたがん細胞でも、サイトカイン IL6 依存的な JAK-STAT シグナル伝達経路を介して STAT3 を活性化することができたため、AAG8 による STAT3 の活性化メカニズムは、IL6 依存性とは異なるシグナル伝達経路を介したものであると考察している。

さらに、IL6 依存的な STAT3 活性化の阻害剤を 364 種類の化合物ライブラリーからスクリーニングし、API4 (Apoptosis inhibitor 4) の阻害剤として知られている YM155 がこれらのがん細胞で STAT3 活性を顕著に阻害することを見出している。しかしながら、API4 遺伝子をノックダウンした場合には、IL6 依存的な STAT3 活性化は阻害されなかったことから、API4 は STAT3 活性化のシグナル伝達経路には関与しておらず、YM155 によって阻害される何らかの分子が、YM155 による STAT3 活性化の阻害に関与していると考察している。

以上の知見に基づいて、IL6 非依存的な STAT3 の活性化因子である AAG8 のノックダウンと YM155 による IL6 依存的な STAT 活性化経路の阻害を併用した相乗効果によって、結腸がん細胞 DLD-1 の増殖を著しく抑制することに成功している。さらに、この IL6 依存的な STAT 活性化経路の阻害剤を併用するアプローチが、JAK 阻害剤 JSI-124、JAK3 阻害剤 VI を用いた場合にも有効であることを示している。

第 4 章では本論文の総括と展望を述べている。

以上本論文は、様々ながん細胞で過剰発現している AAG8 が、がん細胞内シグナル伝達において果たす役割と AAG8 阻害剤の抗がん作用に関する研究であり、AAG8 遺伝子のノックダウンや AAG8 の阻害剤により種々のがん細胞の増殖抑制、アポトーシス誘導が可能であることを示したものである。さらに、黒色素細胞腫 B16F1 細胞では AAG8 阻害剤と MEK 阻害剤を併用することによって、また、結腸がん細胞 DLD-1 においても AAG8 のノックダウンと IL6 依存性の JAK-STAT シグナル伝達経路のタンパク質の阻害剤を併用した相乗効果により、がん細胞の増殖を顕著に抑制できることを示したものである。これらの成果は、がん治療分野におけるケミカルバイオエンジニアリングの発展に寄与するところが多い。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。