

氏 名 (生年月日) ^{たかぎ}高木 ^{ひろこ}寛子 (1993年11月4日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬 第215号

学位授与の日付 2022年3月19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 γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ(GGCT)および GGCT-PHB2 タンパク質
相互作用の阻害によるがん細胞の増殖抑制メカニズムの解明

論文審査委員 (主査) 准教授 中 田 晋

(副査) 教授 西 口 工 司

(副査) 教授 藤 室 雅 弘

論文内容の要旨

序章 (はじめに)

γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ(GGCT)は、泌尿器系がん組織に高発現するタンパク質として発見された。その後、乳がん、肺がん、子宮頸がん等を含む様々ながん種において正常組織と比較して高発現することが報告され、GGCT の高発現は予後不良因子であることも示されている。一方、RNA 干渉法を用いた GGCT ノックダウンおよび GGCT 阻害剤による酵素活性の阻害は、*in vitro* および *in vivo* において種々のがん細胞の増殖を抑制することが報告されている。また近年、GGCT の相互作用タンパク質として **prohibitin2(PHB2)**が新たに同定された。GGCT は、転写抑制性調節因子である PHB2 の核内移行を促進する因子として機能し、PHB2 の細胞増殖抑制因子 *p21^{WAF1/CIP1}* (*p21*)プロモーターへの結合を促進して、その転写を抑制することが明らかとなっている。これらの背景から、GGCT および GGCT-PHB2 相互作用は、がんの治療標的として有望である可能性が推測された。そこで本研究では、前立腺がん PC3 細胞に対する GGCT 阻害剤 **pro-GA** による増殖抑制効果を評価し、そのメカニズムについて解析を行った。また、前立腺がんに標準的に用いられる殺細胞性抗悪性腫瘍薬ドセタキセルの効果を、**pro-GA** の併用処理が増強する可能性について検証した。さらに、PHB1/2 阻害剤であるトリフルオロチアゾリン類似化合物 **fluorizoline** によるがん細胞の増殖抑制効果における、GGCT と PHB2 の結合阻害効果および *p21* 発現誘導の寄与について解析を行った。

第1章 pro-GA とドセタキセルの併用による増殖抑制作用の増強

本章ではまず、正常前立腺組織と比較して前立腺がん組織で、また、ヒト正常前立腺 PrEC 細胞と比較してヒト前立腺がん PC3、DU-145、LNCaP 細胞で、それぞれ GGCT が高発現することを、免疫組織化学染色法および Western blot 解析で明らかにした。PC3 細胞において GGCT の発現を抑制したところ、増殖抑制効果を認めたものの、DNA 断片化や、PARP、caspase-3、caspase-8 の切断は観察されなかったことから、アポトーシス細胞死は惹起しないことが明らかとなった。次に、GGCT 阻害剤 pro-GA 添加による PC3 細胞の増殖抑制効果を WST-8 アッセイおよび細胞数計測によって解析したところ、濃度依存的に増殖の抑制がみられた。また、pro-GA 処理により細胞老化が誘導されることを、

β -galactosidase 染色法および β -galactosidase 活性測定によって明らかにした。さらに、GGCT ノックダウンまたは pro-GA 処理と、抗がん剤ドセタキセルとの併用効果について検証した。PC3 細胞において GGCT ノックダウンとドセタキセルを併用すると、いずれか単独よりも有意に細胞増殖が抑制された。細胞周期解析ではドセタキセルによる SubG1 期の割合の増加が見られたが、GGCT ノックダウンの併用は SubG1 期の割合には変化を生じなかった。PC3 細胞と LNCaP 細胞において pro-GA とドセタキセルの増殖抑制における併用効果を combination index(CI)法によって評価した。CI は、 $CI < 0.9$ 相乗効果、 $0.9 \leq CI \leq 1.1$ 相加効果、 $1.1 < CI$ 拮抗効果とみなした。その結果、PC3 細胞では pro-GA 50 μ M とドセタキセル 0.5 ng/mL を併用すると相加効果($CI=0.916$)を、LNCaP 細胞では pro-GA 40 μ M とドセタキセル 0.2 ng/mL を併用すると相乗効果($CI=0.774$)を発揮することを明らかにした。以上の結果から、GGCT の阻害は前立腺がん細胞に対するドセタキセルの効果を増強するために有用である可能性が示唆された。

第2章 fluorizoline による細胞増殖抑制とそのメカニズム

GGCT は PHB2 と結合して p21 の発現を抑制し細胞増殖を促進することから、PHB 阻害剤である fluorizoline の増殖抑制効果における、GGCT と PHB2 の相互作用および p21 の発現誘導の寄与につき検証した。ヒト乳がん MCF7 細胞、ヒト膠芽腫 A172 細胞およびヒト前立腺がん PC3 細胞に対して fluorizoline を作用させたところ、濃度依存的な増殖の抑制が観察された。また、fluorizoline による p21 発現誘導を検証したところ、MCF7、A172 および PC3 細胞において p21 の発現上昇を認めた。この結果と合致して、MCF7 と A172 細胞に対して fluorizoline を作用させると、G0/G1 期の増加と S 期の減少を認め、fluorizoline は細胞周期停止を誘導することが明らかとなった。また、fluorizoline による増殖抑制効果は p21 ノックダウンによって阻害された。すなわち、p21 の発現上昇は、fluorizoline による増殖抑制効果に寄与することが明らかとなった。次に、PHB2 を強制発現させた MCF7 細胞を用いて細胞増殖の評価を行った。その結果、fluorizoline の増殖抑制効果に対する、PHB2 強制発現による回復効果が観察された。また、fluorizoline による p21 の発現誘導も、PHB2 強制発現によって抑制されること、また PHB2 強制発現により fluorizoline 処理により減少した S 期の細胞の割合が回復することを明らかにした。これらの結果は、fluorizoline による増殖抑制効果に、PHB2 機能の阻害を介した p21 発現の誘導が関与していることを示唆している。さらに、fluorizoline が PHB2 と GGCT の結合および PHB2 局在に与える影響を、免疫沈降法とタンパク質分画法および蛍光染色法により検証した。その結果、fluorizoline により、PHB2 と GGCT タンパク質の結合の抑制が認められ、核内に局在する PHB2 タンパク質が減少することを明らかにした。以上の結果から、fluorizoline による GGCT と PHB2 の相互作用の阻害は、p21 発現誘導を介してがん細胞の増殖を抑制するために、有用である可能性が示唆された。

総括（結論）

本研究により、pro-GA および fluorizoline を用いた GGCT 機能の阻害は、がん細胞の増殖を抑制するために有用であることを明らかにした。GGCT 阻害剤 pro-GA は、前立腺がん細胞に対して、細胞老化を介した増殖抑制作用を惹起し、アポトーシスを誘導する既存の抗がん剤ドセタキセルと、細胞老化を誘導する pro-GA の併用により、増殖抑制効果を増強することを発見した。さらに、GGCT と相互作用する PHB2 タンパク質の阻害剤 fluorizoline は、p21 タンパク質発現の誘導を介してがん細胞の増殖を抑制することを明らかにした。すなわち、GGCT と PHB2 タンパク質との間の相互作用を fluorizoline によって阻害することにより、核内 PHB2 量の減少を引き起こし、p21 発現の誘導を介し、がん細胞に対して細胞周期の停止を誘導することを明らかにした。以上の知見は、GGCT および

GGCT-PHB2 相互作用を治療標的とすることにより、がん細胞の制御されない無秩序な増殖を阻害するための、新しい治療戦略の開発に寄与するものと考えられる。

審査の結果の要旨

《緒言》

GGCT は様々ながん組織において高発現がみられ、種々のヒトがん細胞培養株における GGCT 発現抑制は、*in vitro* および *in vivo* において増殖を阻害することから、有望ながんの治療標的の候補であると考えられている。これまでの研究により、GGCT の機能を阻害する化合物として、その酵素活性を阻害する化合物 pro-GA が創出されていたが、前立腺がんに対する有用性および増殖抑制効果の作用機序については不明な点が残されていた。また、GGCT と相互作用するタンパク質として見出された PHB2 に対する阻害剤が、GGCT と PHB2 タンパク質との間の相互作用に対して与える影響については全く不明であった。本研究では、前立腺がんに対する標準治療薬ドセタキセルの効果を、pro-GA の併用処理が増強する可能性について検証した。さらに、PHB 阻害剤であるトリフルオロチアゾリン類似化合物 fluorizoline による GGCT と PHB2 タンパク質の相互作用の阻害効果を検証し、その増殖抑制メカニズムに対してサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21^{WAF1/CIP1} (p21) タンパク質の発現誘導が与える寄与について解析を行った。

《審査結果の要旨》

(1) pro-GA とドセタキセルの併用による増殖抑制作用の増強

本研究により、正常前立腺組織と比較して前立腺がん組織で GGCT タンパク質が高発現し、また、ヒト正常前立腺上皮培養細胞と比較してヒト前立腺がん培養細胞株 PC3、DU-145、LNCap 細胞においても GGCT が高発現すること明らかにした。また、GGCT 阻害剤 pro-GA が発揮する前立腺がん細胞に対する増殖抑制効果において、細胞老化が誘導されることを明らかにした。さらに、PC3 細胞と LNCap 細胞において pro-GA とドセタキセルの増殖抑制における併用効果を評価した結果、これらの併用によって相加効果あるいは相乗効果を発揮して前立腺がんの増殖を抑制する効果の増強がみられることを明らかにした。

(2) fluorizoline による細胞増殖抑制とそのメカニズム

本研究により、ヒト乳がん MCF7 細胞、ヒト膠芽腫 A172 細胞およびヒト前立腺がん PC3 細胞に対して、fluorizoline を処理することにより PHB2 の機能を阻害すると、濃度依存的に細胞増殖抑制因子 p21 タンパク質の発現が上昇し、p21 発現誘導依存的な細胞周期の G0/G1 期における停止を伴った増殖の抑制が引き起こされることを明らかにした。さらに、fluorizoline の作用により、PHB2 と GGCT タンパク質の相互作用が阻害され、p21 の転写を抑制する機能を発揮する核内に局在する PHB2 タンパク質の量が減少することを明らかにした。

《結論》

本研究により、GGCT の酵素阻害は前立腺がん細胞に細胞老化を誘導しその増殖を抑制すること、さらに GGCT の酵素阻害は進行前立腺がんに対する標準治療薬であるドセタキセルの効果を増強す

るために有用である可能性が示された。さらに、fluorizoline を用いた GGCT と PHB2 タンパク質の相互作用の阻害は、p21 発現誘導と細胞周期の停止を介してがん細胞の増殖を抑制するために有用である可能性が示された。従って、本研究の成果は、GGCT 阻害剤である pro-GA および PHB 阻害剤である fluorizoline による、GGCT 機能の阻害に関連したがん細胞の増殖抑制機序の一端を明らかにし、GGCT および GGCT-PHB2 相互作用を標的とすることにより、がん細胞の異常な増殖を阻害するために有用な新しい治療戦略の開発に寄与するものと考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。