

氏名 (生年月日) **わん 王** **うえい 巍** **ちえん 程** (1990年4月29日)

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 博薬科 第14号

学位授与の日付 2019年3月16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 *Cassia auriculata* 種子含有アントラセノン二量体の microphthalmia 関連転写因子を介したメラノーマ細胞に対する増殖抑制作用

論文審査委員 (主査) 教授 松田 久司

(副査) 教授 中山 祐治

(副査) 教授 芦原 英司

論文内容の要旨

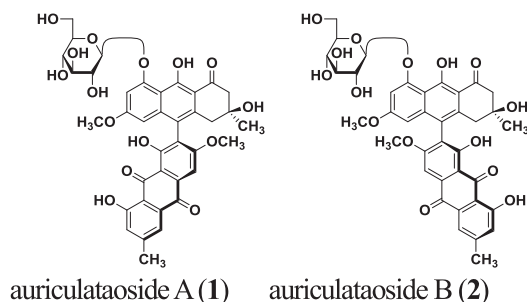
序章 (はじめに)

悪性黒色腫 (メラノーマ) はメラノサイトから悪性化によって生じた皮膚がんの一種であり、低酸素や高エネルギー放射線照射などの極端な環境条件下でも生存し、転移しやすい特徴がある。原発性メラノーマは早期治療の切除によって高い治癒率を示すが、内臓に転移した患者はわずか数ヶ月である。また、メラノーマは放射線療法および化学療法には感受性が低く、一般的な治療法では正常な細胞への障害を示す可能性があるため、治療困難な病気である。最近、根治切除不能なメラノーマに対する免疫療法が認可されたが、適用性や薬剤耐性も問題である。そこでより効果的に治療するため、免疫療法と分子標的治療薬を併用する免疫複合療法が期待されている。しかし、現在使用されている BRAF 阻害薬には耐性の獲得および二次性の皮膚癌 (扁平上皮癌など) を惹起するという皮膚毒性である2つの欠点がある。すなわち、新しい分子標的治療薬の開発が急務である。

Microphthalmia 関連転写因子 (MITF) はメラノサイトにおけるメラニンの生成、および tyrosinase, tyrosinase related protein (TRP)-1, および TRP-2 といったメラニン生成に必要な酵素の発現など様々な機能を担っている。一方、MITF はアポトーシス阻害によりメラノサイトを腫瘍化すること、メラノーマ細胞の転移・浸潤・増殖に関する DNA 複製および有糸分裂、さらには MITF の機能抑制によりメラノーマ細胞がアポトーシスを起こすことからメラノーマ細胞特異的ながん遺伝子であることが報告されている。そこで、MITF に着目し、細胞増殖抑制作用とメラニン生成抑制作用を指標にメラノーマ細胞に対する選択的な増殖抑制物質の探索を試みた。その結果、マメ科植物 *Cassia auriculata* の種子エキスに可能性を見出したことから、有効成分の単離、構造決定およびメラノーマ細胞に対する増殖抑制作用とその作用様式を検討した。

第1章 *C. auriculata* 種子含有アントラセノン二量体の単離と構造決定

C. auriculata 種子メタノール抽出エキスから、各種クロマトグラフィーおよび HPLC を用い、新規アントラセノン二量体 auriculataoside A (1) および auriculataoside B (2) を単離した。NMR スペクトルをはじめとした各種スペ



クトルデータの詳細な解析から **1** および **2** の絶対立体配置を含む化学構造を決定した。

第 2 章 アントラセノン二量体のメラノーマ細胞に対する作用の検討

第 1 節 メラノーマ細胞に対する単離化合物の細胞増殖およびメラニン生成への影響

単離した成分についてマウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞を用い、theophylline 刺激条件下で、細胞増殖への影響およびメラニン生成抑制作用を検討した。結果として、**1** および **2** に 1 μM で細胞増殖抑制作用 (抑制率: 73.0%および 71.0%) および 0.3 μM でメラニン生成抑制作用 (抑制率: 45.1%および 36.5%) を見出した。続いて、主要なメラニン合成酵素である tyrosinase に対する酵素阻害作用について検討した。その結果、いずれの化合物においても有意な抑制作用は認められず、tyrosinase に対する酵素阻害作用はメラニン生成抑制作用の主なメカニズムではないことが推察された。

一方、メラニン生成に重要なタンパク質である tyrosinase, TRP-1 および TRP-2 の細胞内での発現量に及ぼす **1** および **2** の影響について検討した。結果として、**1** および **2** を 0.03~0.3 μM で処理することによって、各タンパクの発現量の減少が観察された。

さらに、MITF の発現量に及ぼす影響について検討した。結果として、**1** および **2** を同程度の濃度域で処理することによって、MITF の発現量の減少が観察された。このことから、メラニン生成抑制作用の作用機序として MITF の発現抑制作用が示唆された。また、**1** および **2** の細胞生存率の低下には MITF の発現抑制の関与が推察された。

第 2 節 Auriculataoside A (**1**) のメラノーマ細胞に対する増殖抑制作用の検討

化合物 **1** および **2** に B16 melanoma 4A5 細胞に対する細胞増殖抑制作用が認められたことから、**1** の作用について詳細に検討した。B16 melanoma 4A5 細胞を用い、**1** を 0.3~1 μM で処理することによって、24 h, 48 h, 72 h 後における増殖への影響の評価を行ったところ、**1** は 24 h では増殖への影響を示さず、48 h から 1 μM で顕著な増殖抑制作用を示した。一方、ヒト皮膚線維芽細胞 HDF 細胞の増殖への影響について検討したところ、**1** は同程度の濃度域では増殖抑制作用を示さなかった。これらの結果から **1** の細胞増殖抑制作用には細胞選択性があることが示唆された。

続いて、細胞増殖抑制作用の作用機序を検討するため、**1** 処理後の細胞内タンパク質発現量の相対的な変化を確認し、1 μM で 48 h 後以降に 20~25 kDa のタンパク質が減少することが観察された。SDS-PAGE で減少が確認されたタンパク質をゲル内消化後に LC-MS/MS 解析した結果から、タンパク質は Rho GTPase ファミリーであると推定された。続いて、Rho GTPase ファミリーを構成する代表的なタンパク質 Cdc42, Rac1, RhoA の発現への影響を検討した。化合物 **1** を 0.7 μM 以上の濃度で処理することによって、各タンパク質の発現量がいずれも減少していた。

以上の結果および第 1 節で述べた MITF への影響と併せて考え、RhoA の下流にあり、MITF の上流にある β -catenin の核内への移動および発現量を検討し、またその下流にある c-Myc の発現量も検討した。結果として、**1** を 0.7 μM 以上の濃度で処理することによって、 β -catenin の細胞質および核内の発現量が減少し、下流にある c-Myc の発現量も減少することが確認された。また、Rho GTPase ファミリーおよび β -catenin/c-Myc の抑制は細胞周期の G0/G1 期の割合を増加させることが報告されている。そこで、細胞周期に及ぼす **1** の影響について検討したところ、G0/G1 期の細胞の割合の増加が確認された。

以上の結果より、**1** は Cdc42, Rac1, RhoA および β -catenin/c-Myc の発現量を減少させ、また MITF の発現量を減少させることによって、B16 melanoma 4A5 細胞に対して細胞選択的な増殖抑制作用を示したと考えられた。

総括 (結論)

本研究では B16 melanoma 4A5 細胞に対する選択的な増殖抑制物質として、アントラセノン二量体 **1** および **2** を単離した。また作用機序の一部として、Cdc42, Rac1, RhoA および β -catenin/c-Myc の発現を抑制し、またメラノーマ細胞特異的な細胞増殖に関わる転写因子 MITF の発現を抑制することが推察された。本研究において、メラノーマ細胞増殖に対する選択的な抑制物質として **1** および **2** を見出すことができた。本研究結果は、今後、新しい標的を持つ治療薬の開発に貢献することが期待される。

審査の結果の要旨

近年、悪性黒色腫 (メラノーマ) に対する治療薬の開発が課題とされている。特にその薬剤耐性、放射線に対する感受性の低さ、転移能の高さなどが問題とされており、メラノーマに対する選択的な治療薬の開発が求められている。

Microphthalmia 関連転写因子 (MITF) はメラノサイトにおいてメラニンの生成に関わる一方、アポトーシス阻害による腫瘍化などに関わっており、メラノーマ細胞の増殖などに関する DNA 複製および有糸分裂、さらには MITF の機能抑制によりメラノーマ細胞がアポトーシスを起こすことからメラノーマ細胞特異的ながん遺伝子であることが報告されている。そこで申請者は MITF に着目し、マウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞における増殖抑制作用およびメラニン生成抑制作用を指標にメラノーマ細胞に選択的な増殖抑制物質の探索を行った。本研究では、マメ科植物 *Cassia auriculata* の種子エキスの分画に、B16 melanoma 4A5 細胞における増殖抑制作用およびメラニン生成抑制作用が認められたことから、有効成分の単離・構造決定および細胞増殖抑制作用とその作用様式を検討した。

1) *C. auriculata* 種子含有アントラセノン二量体の単離と構造決定

既知成分2種とともに、新規アントラセノン二量体 auriculataoside A (**1**) および auriculataoside B (**2**) を単離した。NMR スペクトルをはじめとした各種スペクトルデータの詳細な解析から **1** および **2** の絶対立体配置を含む化学構造を決定した。

2) アントラセノン二量体のメラノーマ細胞に対する作用の検討

B16 melanoma 4A5 細胞において、**1** および **2** に細胞増殖抑制作用およびメラニン生成抑制作用が確認されことから、MITF の発現量への影響を検討した。その結果、**1** および **2** 処理によって、MITF タンパク量の減少が観察された。このことから **1** および **2** の細胞増殖抑制作用には MITF の発現抑制の関与が推察された。一方、正常ヒト皮膚線維芽細胞 HDF 細胞の増殖には影響を与えなかったことから、細胞増殖抑制作用において細胞選択性が観察された。

また **1** 処理後の細胞内タンパク質量の相対的な変化について SDS-PAGE を用いて検討し、減少が確認されたタンパク質をゲル内消化後に LC-MS/MS 解析した結果から、そのタンパク質は Rho GTPase ファミリーであると推定された。続いて、代表的な Rho GTPase ファミリーである Cdc42, Rac1, RhoA の発現量について検討したところ、**1** 処理によって、いずれのタンパク質も減少することが確認された。同時に、同ファミリーの下流で MITF の上流にある β -catenin の発現量や β -catenin の下流にある c-Myc の発現量の減少が確認された。細胞周期への影響として、**1** を処理することによって、G0/G1 期の増加が観察されたが、これは Rho GTPase ファミリーとその下流にある β -catenin/c-Myc および MITF の抑制が関与しているためと考えられた。

以上、申請者は、B16 melanoma 4A5 細胞に対する選択的な増殖抑制物質として、新規アントラセノン二量体2種を単離・構造決定した。また、これらの作用様式として、Cdc42、Rac1、RhoA、 β -catenin および c-Myc の発現やメラノーマ細胞特異的な細胞増殖に関わる転写因子 MITF の発現を抑制することを明らかにした。本研究結果は、今後の新規メラノーマ治療薬の開発に貢献することが期待される。

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（薬科学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。