

氏名（本籍）	中山 和英		
学位の種類	博 士（理学）		
学位記番号	博 甲 第 10030 号		
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査学術院	理工情報生命学術院		
学位論文題目	Study of the Effects of Inhibition of Epigenetic Regulators on the Proliferation of Hematological Malignant Tumor Cells (血液癌細胞の増殖におけるエピジェネティクス制御因子の阻害効果の研究)		
主査	筑波大学教授	博士（理学）	中野 賢太郎
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	桑山 秀一
副査	筑波大学教授	博士（医学）	千葉 智樹
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	原田 隆平

## 論 文 の 要 旨

本論文で著者は、細胞の癌化に伴う癌抑制因子のサイレンシングや癌遺伝子の発現上昇等の原因となるエピジェネティックな変化に着目し、血液癌細胞を標的とした低分子化合物の作用について研究した。第 1 章で著者は、リジン特異的脱メチル化酵素 1 (LSD1) を阻害する低分子化合物 T-3775440 と、他の薬剤を組み合わせた癌細胞への併用効果について調べた。LSD1 は、ヒストン H3 の 4 番目と 9 番目のリジン残基（それぞれ H3K4 および H3K9 という）に修飾されたメチル基を外す酵素であり、その活性を通じて遺伝子の転写制御に関わる。著者の先行研究によって、T-3775440 は、急性骨髄性白血病 (AML) 細胞株である急性赤血球性白血病細胞や急性巨核芽球性白血病細胞に作用し、それらを骨髄様系統細胞へと強制的に分化誘導することで、抗腫瘍活性を示すことが明らかになっている。この結果を受けて、本論文において著者は、T-3775440 と、同じく AML 細胞株に対して抗腫瘍活性を示す臨床開発中の癌治療薬候補化合物 Pevonedistat との併用による血液癌細胞への影響について調べた。その結果、著者は、赤血球性白血病細胞株 TF-1a への T-3775440 処理による骨髄様系統への分化誘導が、Pevonedistat との併用によって増強されることを発見した。さらに、Pevonedistat による S 期細胞に対する DNA 再複製ストレス誘導と、それに伴うアポトーシス誘導についても、T-3775440 との併用によって、その効果が増強されることを示した。これらの低分子化合物の併用による相乗効果は、マウスの担癌モデルにおいても認められた。しかも実験に供した一部の動物においては、腫瘍の退縮および長期の寛解が認められた。この併用効果は、既存の AML 治療薬である Cytarabine、Azacitidine、あるいは Daunorubicine と、Pevonedistat との併用効果よりも高かった。赤血球性白血病は AML の中では稀な疾患ではあるが、典型的な化学療法による治療では非常に再燃しやすい、悪性度の高い癌であると、著者は述べている。そのため、著者は、自らが発見した T-3775440 と Pevonedistat との併用による相乗効果は、AML 治療において一考の価値があると主張している。また著者は、本論文において、これらの低分子化合物の相乗効果の作用機序について、次のように考察を試みている。Pevonedistat は、NEDD8 活性化酵素 (NAE) を阻害することで、Cullin-RING E3 ユビキチンリガーゼ (CRL) のはたらきを抑制する。ユビキチン依存的なタンパク質分解に必須

な役割を担う CRL は、細胞周期の進行、DNA 修復、及び細胞分化など、細胞癌化のプロセスに関係が深い分子経路に関わるタンパク質である。過去の報告により、LSD1 は DNA の損傷反応への関与が示唆されているため、T-3775440 による LSD1 の阻害は、Pevonedistat の惹起する DNA 損傷に対して細胞を感化している可能性がある、と、著者は指摘している。さらに、これらの低分子化合物の併用は、血液癌細胞に対する分化誘導作用を高め、その結果、相乗効果が増強された可能性についても、著者は言及している。

本論文の第2章において著者は、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素4 (PRMT4)を標的とした低分子化合物の探索とその癌細胞への作用効果について研究を行った。PRMT4 はヒストンH3の特定の残基をメチル化する酵素であり、転写活性化に関与する。さらに、PRMT4はヒストンH3以外にも多くの基質をもち、RNA のスプライシングの制御などへの関与も指摘されている。著者は、低分子化合物ライブラリーから PRMT4 の活性阻害を指標にスクリーニングを行い、さらに候補分子の化学構造を最適化することで、PRMT4 に極めて選択性が高い TP-064 を創出することに成功した。さらに著者は、PRMT4 と TP-064 の共結晶構造を明らかにした。次に著者は、各種癌細胞に対する TP-064 の抗腫瘍活性を調べた。その結果、TP-064は、以前に PRMT4 が関与するとの報告のあった乳癌や大腸癌などの細胞に対しては増殖阻害効果を示さなかったが、多発性骨髄腫 (MM) の一部において増殖阻害活性を示すことを、著者は見出した。MMは、最近になって免疫抑制剤やプロテアソーム阻害剤などの新規の治療薬が承認されたことで長期生存率は劇的な改善傾向にあるものの、多くの患者が再発を経験し、薬を入れ替えながら長期の治療を余儀なくされている癌腫であると、著者は述べている。その状況を踏まえ、本研究成果は新たな治療戦略において意義があると、著者は結んでいる。

## 審 査 の 要 旨

本論文の著者である中山和英氏は、第1章では、T-3775440 と Pevonedistat の併用による血液癌細胞への強い相乗効果を発見し、そのメカニズムとしてこれらの両低分子化合物による DNA の再複製ストレスによる DNA 損傷の誘導と、さらに細胞の分化誘導が共に増強されていることを示した。この成果は、エピジェネティクスにはたらく LSD1 とユビキチン依存的なタンパク質分解に関わる CRL という、細胞内の異なる経路で機能する因子が、血液癌細胞の増殖や分化を制御する経路では交わって作用することを発見した点で、大変に興味深い。本論文の第2章で、著者は低分子化合物ライブラリーから PRMT4 活性を阻害する物質をスクリーニングし、それを改変することで TP-064 を創出することに成功した。さらに、この低分子化合物が MM の一部で抗腫瘍活性を示すこと、過去に癌化および増殖についての報告があった大腸癌や乳癌では抗腫瘍活性を持たないことを明らかにした。以上の中山和英氏による研究成果は、分子細胞生物学的に重要な成果であるだけでなく、医療などへの波及効果の点からも極めて有意義な成果であるといえよう。

令和3年1月27日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。