

氏名	相田 智志		
学位の種類	博 士 (生物科学)		
学位記番号	博 甲 第 9050 号		
学位授与年月日	平成 31年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Identification of a Novel Compound with MITF Suppression Activity and Apoptosis Induction Activity in Combination with BRAF Inhibitors</b> (MITF阻害活性とBRAF阻害剤との併用によるアポトーシス誘導活性を持つ新規化合物の同定)		
主査	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 (理学)	石田 健一郎
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	千葉 親文
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	臼井 健郎

## 論 文 の 要 旨

メラノーマは皮膚癌の一種であり、致死性の高い癌である。約半数のメラノーマにおいては、MAPK 経路にあるリン酸化酵素である BRAF に活性化変異を有することが知られており、変異 BRAF に対する特異的な阻害剤の開発が進められてきた。2010 年頃からの次世代シーケンサーの登場により、メラノーマのゲノム解析も精力的に進められてきたが、BRAF 以外の有力な分子標的は発見されていない。そのため、新たな作用機序をもつ治療薬が求められている。本博士論文では著者は、MITF 抑制作用をもつ新規化合物の同定とメカニズム解析に関する研究を、さらに、実用化研究として動物モデルでの薬効評価と標準治療法である BRAF 阻害剤との併用時の作用機序についての解析研究を報告した。

第一章で本論文の著者は、スクリーニングによる化合物の同定と、作用メカニズム解析に関する研究を報告している。化合物のスクリーニングを実施する際には、標的分子が同定済みの場合は、標的分子の活性の阻害を検出できるスクリーニング系を通常用いるが、新規作用機序を持つ化合物を同定する場合には、細胞株を用いたフェノタイプの変化を指標としたスクリーニングを実施することが多い。後者の場合には化合物の同定はできる一方で、その後の作用機序解析は困難を伴い、作用機序の解明まで至る報告は少ない。しかし、新たな作用機序を持つ化合物を同定するために、10 種類の皮膚癌細胞株パネルを用意し、化合物ライブラリーのスクリーニングを実施することで、新規の化学構造を持つ CH5552074 を同定している。作用機序解析のために、10 種類のメラノーマ細胞株の網羅的遺伝子発現パターンと CH5552074 への感受性を相関解析することにより、CH5552074 への感受性が高い細胞株で高発現、もしくは低発現している 107 遺伝子を同定している。次に、それらの遺伝子の発現変化を誘導する上流因子の同定をするために、遺伝子発現変化をもたらす因子とその因子が発現変化をもたらす遺伝子のデータを持つ、Ingenuity Pathway Analysis の Upstream analysis を用いたところ、MITF という転写因子が発現制御している遺伝子のセットと、同定した 107 遺伝子の重なりが大きいことが示している。MITF は、正常臓器ごとの遺伝子発現のデータベース解析では皮膚に特異的に発現していることを示し、また、皮膚を構成する細胞種類の一つであるメラノサイトの分化や癌化に関わるということを報告している。メラノーマ細胞を MITF に対する siRNA で処理したところ増殖抑制効果が示されたことから、CH5552074 によるメラノーマ細胞株の増殖抑制効果は、MITF の抑制による可能性が示唆され

た。実際にメラノーマ細胞株を CH5552074 で処理すると、MITF がタンパクレベルで減少することを確認している。さらに、タイムコース実験を実施すると、MITF タンパク質の減少と増殖抑制効果の発現がほぼ同時期に起こることが示され、CH5552074 は MITF 抑制により増殖抑制活性を示していることが示唆された。MITF の抑制活性をもつ化合物についての報告はすでになされており、報告されている化合物の MITF の抑制メカニズムは MITF mRNA の発現抑制であるが、CH5552074 処理による MITF mRNA の変化は観察されないことから新規作用機序を持つ化合物であることを明らかにしている。

第二章で本論文の著者は、実用化研究として動物モデルでの薬効評価とメラノーマの標準治療法である BRAF 阻害剤との併用時の作用機序解析の研究を報告する。癌の分子標的薬の多くは、利便性を考慮して経口投与可能な薬剤になっているため、第一章で同定された MITF 抑制活性をもつ化合物である CH5552074 も経口投与可能な薬剤にするために、さらに化学修飾することで、経口投与可能で MITF 阻害活性を保持した CH6868398 を同定した。免疫不全マウスにヒトメラノーマ細胞株 SK-MEL-5 細胞を皮下移植したゼノグラフトモデルにおいて、CH6868398 は 10 日間の経口投与による腫瘍増殖抑制作用を示している。CH6868398 のメラノーマ細胞の増殖抑制効果が MITF 抑制によるものであることを示すために、MITF の発現のあるメラノーマ細胞と、MITF の発現がないメラノーマ細胞を用意し、CH6868398 の細胞増殖抑制効果を評価した。CH6868398 は、MITF の発現があるメラノーマ細胞に対しては MITF 減少作用と細胞増殖抑制作用を示した一方、MITF の発現がみられないメラノーマ細胞に対しては細胞増殖抑制作用を示さなかった。この結果は、CH6868398 が MITF の阻害によりメラノーマ細胞株に増殖抑制作用を示している可能性を強く示唆した。次に、臨床現場においては、BRAF 変異型メラノーマに対しては BRAF 阻害剤による治療が標準的であるため、BRAF 変異型メラノーマにおいて、BRAF 阻害剤と CH6868398 の併用処理の検討をした。はじめに、BRAF 阻害剤処理による MITF の発現量変化を評価したところ、SK-MEL-28 細胞では BRAF 阻害剤処理により MITF 発現が抑制される一方、SK-MEL-5 細胞では MITF 発現量に変化がないことが示された。この実験結果から、SK-MEL-5 細胞のような BRAF 阻害剤の処理により MITF が減らない癌細胞が存在し、そのような癌細胞においては CH6868398 による MITF 抑制によって、増殖抑制効果を増強できる可能性が示唆された。SK-MEL-5 細胞を用いた細胞増殖抑制試験において BRAF 阻害剤と CH6868398 の相乗効果を評価したところ、単剤処理と比較して併用処理では有意に増殖抑制効果を増強した。そのメカニズム解析としてアポトーシス誘導のマーカーである、cleaved Caspase3 と cleaved PARP の発現を評価した結果、併用処理によって大幅な発現上昇が示された。この結果が CH6868398 の非特異的な活性によるものではないということを示すために、MITF に対する siRNA と BRAF 阻害剤との併用処理による cleaved Caspase3 と cleaved PARP の発現を評価したところ、同様に大幅な発現上昇を確認した。この結果は、MITF と BRAF の共阻害がアポトーシスの誘導をしているということを示しており、BRAF 阻害剤と MITF 阻害剤の併用という新しい治療方法の可能性を示している。

## 審 査 の 要 旨

本論文において相田智志氏は、細胞株を用いたスクリーニングによって得られた新規化合物の作用機序解析に成功した。様々な種類の変異を持つ癌細胞に対して有効な薬剤をそろえるためには、新規作用機序を持つ化合物の同定が必要であり、本研究はその作用機序解析の新たな手法として大変意義のあるものである。また、同定された MITF 抑制というメカニズムは薬剤として実用化されておらず、新規の分子標的として治療標的になりうる可能性を示すことができた。よって、本研究成果がメラノーマ治療薬の研究開発と治療成績向上に寄与することが期待される一方、生物学的な観点においても非常に意義のあるものになることも期待された。以上より本論文における研究成果は、学術的にも応用的にも非常に価値の高いものであると判断された。

平成 31 年 1 月 28 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（生物科学）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。