

論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨

学位申請者氏名：高橋 雄太

学位の種類：博士（薬学）

学位記番号：博（薬）乙第四号

学位授与年月日：平成31年3月5日

審査委員

主査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 平野 和也

副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 常岡 誠

副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 松岡 功

論文題目

ニコチン・タール除去タバコ煙水抽出液のがん転移抑制作用の解析と活性本体の特定
Analysis of the anti-metastatic action of nicotine and tar removed-cigarette smoke extract
and the specification of its active ingredients

【論文の内容の要旨】

「転移を制するものは癌を制す」と言われるほど、癌治療において転移をコントロールすることは重要な課題であり、転移の阻止によって、癌患者の予後が改善することが期待される。喫煙は呼吸器障害、血管障害、癌などの主要なリスクファクターであり、癌の発症や進展に対して、ニコチンやタールが重要な役割を果たすと考えられている。喫煙が有害なことは言うまでもないが、タバコの葉や煙の中にはいくつかの疾患に対して有用な成分が含まれていることが明らかにされている。これまでに、タバコ煙濃縮物の中に癌転移を抑制する成分が見出されているが、タバコ煙のガス相成分では有用な成分の有無について検討されていない。

本研究では、タバコ煙のガス相成分に癌転移抑制物質が含まれている可能性に注目した。ニコチン・タールの影響を除くため、粒子相を除去したタバコ煙をリン酸緩衝生理食塩水に通気して調製したニコチン・タール除去タバコ煙水抽出液（CSE）が癌転移に及ぼす影響を検討し、その作用機序の解析ならびに活性成分の探索を行った。

第1章では、可移植性かつ高転移性のマウスメラノーマ細胞株である B16-BL6 細胞に対して、細胞増殖に影響を及ぼさない濃度で CSE を前処置した後、同種の C57BL マウスに尾静脈を介して接種した。その結果、B16-BL6 細胞に対する CSE 前処置が肺転移結節数を減少させることが明らかになった。次に、CSE 前処置による血行性肺転移の抑制機序を検討し、CSE 前処置が B16-BL6 細胞の浸潤能および遊走能を低下させることを明らかにした。したがって、CSE 中には、B16-BL6 細胞の浸潤および遊走活性を抑制して血行性癌転移を軽減する成分が含まれていることが示唆された。

第2章では、CSE 中の浸潤および遊走抑制作用を有する活性成分候補を探索した。研究を進めるうえで、CSE の効果は体内の生理活性物質を化学修飾することによると想定した。

まず、反応性の高い水酸基をもつアミノ酸であるチロシン (Tyr) との反応性を指標として、反応生成物の同定に取り組んだ。その結果、分子量 (Mr) 181 の Tyr に Mr 42 の物質が付加した Mr 223 の Tyr 誘導体を 2 種類、Mr 70 の物質が付加した Mr 251 の Tyr 誘導体を 1 種類検出した。それぞれ、N-acetyl-Tyr、O-acetyl-Tyr および N-(3-oxobutyl)-Tyr であると同定した。これらは、Tyr が無水酢酸もしくは methyl vinyl ketone (MVK) と反応することによって生成されることを明らかにした。無水酢酸、MVK ならびにタバコ煙の成分で細胞遊走の抑制作用を有することが報告されている α 、 β -不飽和アルデヒドである acrolein (ACR)、crotonaldehyde (CA) が CSE に含まれるか、定量を試みた。さらに、CSE の浸潤抑制作用を担う活性成分を明らかにするために、MVK、ACR、CA が B16-BL6 細胞の浸潤に及ぼす影響を検討した結果、ACR と CA は浸潤を抑制し、MVK は浸潤を抑制する傾向が認められ、その有効濃度から MVK、CA および ACR は CSE 中で複合的に B16-BL6 細胞の浸潤を抑制しうる濃度で含まれていることが明らかになった。

第 3 章では、CSE の転移抑制機序を解明する一端として、CSE が癌細胞の浸潤のみを抑制するのか、もしくは抗癌作用も有するのかを検討した。その結果、CSE および MVK、CA による濃度依存的な B16-BL6 細胞の生存率低下が認められ、CSE および MVK の作用は酸化剤で細胞内グルタチオン (GSH) の前駆体でもある N-acetyl cysteine (NAC) によって拮抗された。次に CSE のアルデヒドやケトンが細胞内で直接生成させる物質を明らかにするために、CSE 中の成分による細胞内の成分の修飾を検討した。その結果、CSE および活性成分 (それぞれ Mr 70) は、細胞死を引き起こさない濃度で GSH (Mr 308) と不可逆的に反応して Mr 378 の GSH 付加物を形成し、細胞内 GSH レベルを著しく低下させた。質量スペクトルデータは、CSE 処置した細胞において形成された主要生成物が、マイケル付加を介した GSH-MVK 付加物であり、GSH-CA 付加物ではないことを示した。これらの結果は、CSE に含まれる MVK が細胞中の GSH と反応して GSH-MVK 付加物を形成することを示している。さらに、最近 CA および ACR も B16-BL6 細胞内で GSH と反応することが示されたことから、CSE による B16-BL6 細胞の癌転移、浸潤、遊走の抑制には MVK や CA、ACR による細胞内 GSH の低下が関与する可能性が示唆された。

以上をまとめると、(1) B16-BL6 細胞において、CSE 前処置は浸潤および遊走の抑制を介し、血行性肺転移を抑制すること、(2) *In vitro* において、Tyr が CSE 中の成分と 37°C 条件下で容易に反応すること、(3) CSE の浸潤抑制作用を、少なくとも一部、MVK、ACR および CA が担う可能性があること、(4) CSE、CA および MVK は B16-BL6 細胞の生存率を低下させ、CSE および MVK の作用は NAC によって拮抗されること、(5) *In vitro* において、CA および MVK は GSH と結合すること、(6) B16-BL6 細胞において、MVK は細胞内 GSH と結合すること、(7) CSE は生存率に影響を与えない濃度において GSH の低下を引き起こすこと、が明らかになった。これらの結果から、CSE 前処置による B16-BL6 細胞の浸潤および遊走の抑制を介する血行性転移抑制作用の、少なくとも一部は CSE 中に含まれている ACR、CA および MVK が担っており、細胞内 GSH の低下が関与する可能性が示唆された。本研究成果は、タバコ煙中のガス相成分に癌転移抑制作用を有する成分が含まれているこ

とを初めて明らかにしたもので、今後の進展が期待できると考えられる。

【論文審査の結果の要旨】

本論文は、第1章「マウスメラノーマ細胞の浸潤抑制を介したニコチン・タール除去タバコ煙水抽出液の血行性肺転移抑制作用」、第2章「L-チロシン (Tyr) との反応に基づくタバコ煙中の活性成分の同定ならびに B16-BL6 の細胞に対する CSE 中アルデヒドおよびケトンの浸潤抑制作用の検討」、第3章「タバコ煙水抽出液中に存在するメチルビニルケトンによるマウスメラノーマ細胞内のグルタチオン修飾作用の検討」の三章から成っている。

予備審査にあたって、最初に申請者による約 45 分間のプレゼンテーションが行われた。続いて、提出論文（および発表資料）について、全体の構成・各章の内容への質疑や、問題点の指摘、修正の指示が行われた。その主たる審査内容は以下の通りである。

第1章では、「データの解釈を詳細にするように」と指示があった。第2章では、「本章の意義は Tyr を用いた候補分子のスクリーニングである」と説明したほうがよい、と助言があった。第3章では、「グルタチオンの修飾後の転移能抑制の機序」や「候補分子の独自性や価値」について考察してほしいとの意見があった。また一部の簡潔な実験データについては、所属グループの研究結果を引用するなどして、考察するように指示があった。以上を踏まえて、論文全体の構成や 1 章～3 章の整合性についての再点検、適切な論文題目への修正をするように指示があった。また全体を通じて、文章表現のミス、用語の統一性、重複箇所などについて、再度注意して見直してほしいとなった。

以上、幾つかの改善すべき点も見られたが、本論文は、がん転移抑制性分子候補の同定を GC/MS 等の高精度分析法に基づいて行われたものであり、本研究科博士課程に相応しい内容であるといえる。また、その内容の多くは既に査読のある原著論文として受理・公表されている。これらのことから、適切な改善がなされれば、博士の学位申請論文として受理できると結論された。

この予備審査における指摘事項に関する論文の加筆修正後に行われた最終試験では、論文の主要な部位についての公開プレゼンテーションが行われ、その後に質疑応答が実施された。

第1章では、転移抑制の有効成分は、単独で効くものなのか、複数種が相乗的に効くものなのか等の質疑があった。データからは、見いだされた分子はそれぞれ単独で有効である、との回答がなされた。

第2章では、なぜスクリーニングのプロープとして、アミノ酸の中でチロシンのみを選択したのか、他のアミノ酸やペプチドも行うべきではないかとの質疑があった。当初は、チロシンに注目して開始したが、他のアミノ酸やペプチドを用いてスクリーニングを行うことにより、さらに新規化合物を発見できる可能性があるとの回答がなされた。アセチル化分子を生じさせる化合物としては、他にもケテンなどがある、また細胞の中に入ってからアセチル化能を持つ薬剤の開発などの発展性があるのでは、との質疑や提案があった。

第3章では、GSHの量を減らすと、癌転移が抑制される機序としては、MVK等で修飾されたGSHによる効果なのか、MVKによりGSHが消費（不活化）されてしまうことにより、さらに他の細胞内分子が影響を受けることによる効果なのかについての質疑があった。また、創薬を考えた場合の本候補分子へのがん細胞への選択性の付与についての考え方が求められた。転移抑制効果の機序について、TGF- β やエクソソームとの関連性があるか等についての質疑があった。作用機序の詳細やがん細胞への選択性の付与は、検討途上にあるとの回答を提示した。

本論文は、がん転移抑制性分子候補の同定をGC/MS等の高精度分析法に基づいて行われたものであり、独創性のあるスクリーニング法により、MVK等の分子を見出した。今後、これら分子の作用機序の解明や新規抗がん剤開発への可能性が期待されるものである。本研究科博士課程に相応しい内容であるといえる。また、その成果は既に3報の欧文の学術論文として発表されている。本論文は臨床現場のニーズや新規の抗がん剤の開発を意識し、科学的思考に基づいて行われたものであり、本研究科博士課程の学位論文として相応しい内容であるといえる。最終試験において、学位申請者は自身の知見をもとに、すべての質疑に対して、質問者が納得する丁寧かつ的確な内容の回答が得られた。

以上により、論文審査および最終試験の結果に基づき、審査委員会において慎重に審査した結果、本論文が博士（薬学）の学位に十分値するものであると判断した。

【学力の確認の結果の要旨】

本論文審査を通して、本学位申請者の学力確認を行ったところ、博士として十分な学識を有していることが確認できた。

以上により、本学位申請者は博士課程修了者と同等以上の学力を有すると判断した。