

Chemical Biological Studies on the Regulatory Mechanism of Tumor Cell Migration

March 2013

Shigeyuki Magi

主 論 文 要 旨

報告番号	㊦ 乙 第	号	氏 名	間木 重行
主 論 文 題 目： Chemical Biological Studies on the Regulatory Mechanism of Tumor Cell Migration (ケミカルバイオロジー研究によるがん細胞遊走制御機構の解析)				
(内容の要旨) ある表現型を特異的に生み出す低分子化合物や、ある特定の分子を阻害する化合物を利用することで生物学的な新たな知見が得られるケミカルバイオロジー研究は、様々な生命現象を理解するにあたり非常に有用な手法である。一方、細胞遊走とは細胞が能動的に移動する現象であり、がん治療の大きな障害となっているがん転移に必須の生命現象である。本学位論文研究では、ケミカルバイオロジーの手法にもとづいてがん細胞の遊走制御機構を解析することで、その制御機構の一端を明らかにした。 1. <u>新規アクラシノマイシン(ACM)誘導体が誘導する H-Ras のファルネシル化阻害を介した細胞遊走の阻害効果</u> 抗がん剤として知られる ACM の新規誘導体 N-benzyl-ACM および N-allyl-ACM は、 <i>in vitro</i> のスクリーニング系においてファルネシルトランスフェラーゼ(FTase)の阻害活性を持つことが見出された。これら 2 化合物は、FTase の類似酵素であるゲラニルゲラニルトランスフェラーゼや、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素に殆ど影響を与えなかった。また、両化合物はヒト扁平上皮がん A431 細胞において H-Ras の細胞膜への移行、H-Ras 依存的な PI3K/Akt シグナルの活性化、EGF 依存的細胞遊走の全てを阻害することを見出した。 2. <u>ケミカルシステムバイオロジーによるがん細胞遊走制御機構の普遍性および多様性の解析</u> 細胞遊走制御機構の普遍性および多様性を担う分子群を明らかにするため、34 種類の低分子化合物の影響を、10 種類の遊走細胞において創傷治癒アッセイにより定量的に評価した。続いて、各細胞における化合物の遊走阻害プロファイルに対して階層的クラスタリングを行った。その結果、化合物は階層的クラスタリングによってそれらの標的分子にもとづいて的確に分類された。さらに、本研究で用いたがん細胞は 3 つのクラスターに分類され、化合物は 4 つのクラスターにグループ分けされた。JNK 阻害剤はすべてのタイプの細胞遊走を抑制したが、ROCK、GSK-3、p38MAPK の阻害剤は、一部の細胞株の遊走のみを抑制した。このように、本解析システムによって、細胞遊走に対する共通なシグナル応答と細胞型特異的なシグナル応答を容易に区別することに成功した。続いて、前述のケミカルゲノミクス研究で明らかになった細胞遊走制御機構の普遍性および多様性を担う分子群のパスウェイ関係を明らかにするため、EGF 刺激依存的に遊走する 3 種類のがん細胞株において、EGF が誘導する 9 種類の情報伝達分子のリン酸化および発現上昇に対して、15 種類の細胞遊走阻害剤が与える影響を網羅的かつ定量的に評価した。続いて得られたデータをもとに、各がん細胞株における EGF 依存的細胞遊走を制御するシグナル伝達図を描画した。その結果、MAPK 経路や JNK/cJun 経路などは 3 細胞において普遍的であるが、他の多くのパスウェイが各細胞に特徴的に存在することが示唆された。特に、CysLT1 経路が TT 細胞では MAPK 経路を制御するが、EC109 細胞では PI3K/Akt 経路のみを制御するという結果は、これまでの研究からは予期出来ない興味深い結果であった。即ち、CysLT1 経路は EGF が引き起こすがん細胞遊走制御機構において細胞依存的なシグナル伝達を制御する分子であることが見出された。				

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Science and Technology	Student Identification Number 80947574	SURNAME, First name MAGI, Shigeyuki
Title Chemical Biological Studies on the Regulatory Mechanism of Tumor Cell Migration		
Abstract Chemical biology is a remarkable approach in which small molecular compounds are used as probes to elucidate protein functions within signaling pathways. On the other hand, tumor cell migration is a required step for cancer metastasis which remains the greatest obstacle for anti-cancer therapy. In this thesis, the author researched the regulatory mechanism of tumor cell migration based on chemical biological approach. 1. <u>Novel Aclacinomycin A (ACM) derivatives suppressed tumor cell migration through the inhibition of the farnesylation of H-Ras.</u> N-benzyl-ACM and N-allyl-ACM, which are new derivatives of ACM, were identified as farnesyl transferase (FTase) inhibitors. These two compounds inhibited FTase activity specifically rather than geranylgeranyl transferase or geranylgeranyl pyrophosphate synthase. In addition, both compounds also blocked the membrane localization of H-Ras, activation of the H-Ras-dependent PI3K/Akt pathway, as well as epidermal growth factor (EGF)-induced migration of epidermal carcinoma A431 cells. 2. <u>A combination study of chemical and systems biology identifying novel features of signaling pathway in cancer cell migration.</u> To analyze the diversity and consistency of regulatory signaling in cancer cell migration, the author assessed quantitatively the effects of 34 small molecular compounds on ten types of migrating cells by wound healing assay. Hierarchical clustering was performed on the subsequent migration inhibition profile of the compounds and cancer cell types. The author found that the cancer cells tested in this study were classified into three clusters, and the compounds were grouped into four clusters. An inhibitor of JNK suppressed all types of cell migration; however, inhibitors of ROCK, GSK-3 and p38MAPK only inhibited the migration of a subset of cell lines. Next, to explore the diversity and consistency of EGF-induced cell migration pathway, the author quantified the effect of the 15 inhibitors on the levels of expression or phosphorylation of nine proteins induced by EGF stimulation in three cancer cell lines. Based on obtained data and chemical biological assumptions, the author deduced cell migration pathway in each cancer cell, and compared them. As a result, the author found that MEK/ERK-, and JNK/c-Jun-pathway are activated in migrating all three cells. Moreover, CysLT1 was found to regulate only MEK/ERK pathway in T.T cells, whereas it regulates only PI3K/Akt pathway in EC109 cells. These results indicate that the CysLT1 signaling is related to the diversity of regulatory mechanisms in cancer cells.		