

論文の内容の要旨

論文題目 進行胃癌に対するプロテアソーム阻害薬の効果に関する検討

氏名 中田 和智子

切除不能進行胃癌は化学療法による予後の改善が報告されているが、5年生存率は依然として10%に満たない難治癌の一つである。近年、従来から化学療法に用いられてきた薬剤に加え、新規治療薬として分子標的薬が注目されている。胃癌に対する分子標的薬としては近年、抗HER2受容体抗体による分子標的薬がその有用性を認められ臨床応用が開始されたが、その他の分子標的薬に関しては臨床的な有用性を認めるには至っていない。化学療法を継続する際に腫瘍の薬剤耐性獲得が少なからず障害となるため、その点からも使用可能な薬剤の種類はより多様であることが望まれる。

そこで、本研究では、切除不能進行胃癌に対する新規治療薬の候補の一つとして、プロテアソーム阻害薬の一つである bortezomib に注目し、切除不能進行胃癌に対する新規治療薬としての可能性について、胃癌細胞株を用いて *in vitro*, *in vivo* で検討した。

まず、*in vitro* で、胃癌細胞株に対する bortezomib の増殖抑制効果に関する検討を行った。10nM の濃度の bortezomib に感受性を有する細胞株は2種類であったが100nM の濃度では検討に用いた7種類全ての細胞株に対し細胞増殖抑制効果を認めた。胃癌細胞株における bortezomib による抗腫瘍効果は、細胞増殖抑制効果の他、NF- κ B の核移行が抑制されることで細胞死が誘導される可能性が考えられるため、bortezomib で刺激した胃癌細胞株のタンパクを用いてウエスタンブロットを行った。cleaved caspase3 が検出され、アポトーシスが誘導されていることが示唆された。

NF- κ B の抑制は、bortezomib 投与時のアポトーシスの誘導において主な機序として知られている。そこで、今回の検討に用いた胃癌細胞株7種類で、リン酸化 I κ B α の発現をウエスタンブロットで検出し、定常状態における NF- κ B の活性化レベルを検討した。胃癌細胞株のうち、低濃度(10nM)の bortezomib に対しても感受性を示した細胞株と、リン酸化 I κ B α の発現が低下している細胞株が一致していた。定常状態における NF- κ B の活性化レベルは、胃癌細胞株における

bortezomib への感受性に関与している可能性がある」と推測し、リン酸化 I κ B α の発現が低下している細胞株の一つ、胃癌細胞株 AGS において、I κ B α の主要なキナーゼの一つである IKK β を強制発現させた上で bortezomib を投与し、細胞数の変化を観察した。胃癌細胞株 AGS における bortezomib 投与による細胞増殖抑制効果は、IKK β を強制発現した細胞株において減弱し、NF- κ B の活性化レベルは、より低濃度の bortezomib に対する感受性と逆の相関を示す可能性が示唆された。

癌細胞において、NF- κ B の抑制を介してアポトーシスが惹起される際、活性酸素(reactive oxygen species 以下 ROS)の発生が関与していることが知られている。bortezomib 投与によりアポトーシスが生じる際にこれらの機序が関与しているかどうか検討するために、bortezomib 投与後の胃癌細胞株において、ROS の発生を、フローサイトメーター及び蛍光染色を用いて検出した。胃癌細胞株 MKN45, NCI-N87 において bortezomib 投与後に ROS の増加が確認された。

ROS の発生が関与する細胞死には JNK の活性化が介在していることが知られている。同様の機序が関与しているか観察するため、胃癌細胞株 AGS を用いて、bortezomib 投与後の JNK の活性化の有無をウェスタンブロットで検討した。control と比較して bortezomib 投与後に JNK が活性化している様子が観察された。更に、同細胞株において、JNK1 の siRNA をトランスフェクションすることにより JNK の機能をノックダウンすると、control と比較し、bortezomib 投与後にみられる cleaved caspase3 が減少しており、細胞死が抑制されることが示唆された。

細胞増殖に関して mitogen activated protein キナーゼ(以下 MAP キナーゼ)、中でも Erk1/2 の活性化が重要な役割を果たしていることが知られている。また、この経路の MAP キナーゼの脱リン酸化酵素(以下 MKP)は恒常的にプロテアソームで分解されており、プロテアソームの阻害により増加することが知られている。従って、bortezomib の投与により MKP が増加し、MAP キナーゼの脱リン酸化が亢進し、MAP キナーゼのシグナルが抑制されることが予測される。胃癌細胞株 NCI-N87 を用いて、bortezomib 投与下における Erk の発現の有無について観察したところ、control と比較して bortezomib 投与後に Erk1/2 のリン酸化は 12 時間以降で著明に抑制された。Total Erk1/2 は増減せず、上流のキナーゼである MEK やリン酸化 MEK の量にも有意な変化が見られていないため、bortezomib がこれらに関与することなく、MKP を介してリン酸化 Erk1/2 の低下に寄与しているものと考えられ、リン酸化 Erk1/2 の持続的な脱リン酸化が関与しているものと推測された。

bortezomib の生体内での抗腫瘍効果を検討するため、BALB/cAJcl-nu/nu マウス(ヌードマウス)にヒト胃癌細胞株 MKN45, NCI-N87 を皮下移植し作成した異種移植モデルにおいて bortezomib は増殖抑制効果を示した。異種移植モデルにおいて、bortezomib 投与後 24 時間後に皮下腫瘍結節を採取し TUNEL 染色を行ったところ *in vitro* の結果と同様に bortezomib を投与した結節において TUNEL 陽性細胞を認め、bortezomib 投与により約 3 から 6 倍のアポトーシスの増加を認め、bortezomib はヒト胃癌細胞株による異種移植モデルにおいて、抗腫瘍効果を有すると考えられた。

bortezomib の胃癌に対する抗腫瘍効果に関しては、これまでに *in vitro* での検討が報告さ

れており、作用機序として、NF-κB の抑制の他、Erk、Akt シグナルなどの増殖シグナルの抑制、サイクリン依存性キナーゼ抑制因子である p21 や p27 の増加による細胞周期停止、アポトーシス抑制活性を有する Bcl-2 の減少と、逆にアポトーシスが誘導される際に増加する Bax の増加等が報告されている。

本研究の *in vitro* の検討では、既報で用いられていない 6 種類の胃癌細胞株を含む計 7 種類の胃癌細胞株に対し、bortezomib の抗腫瘍効果が認められた。作用機序としては ROS の産生や JNK の活性化に続くアポトーシスの誘導ならびに Erk の抑制に伴う増殖抑制が示唆された。ROS の産生や JNK の活性化に続いてアポトーシスが誘導されることについては、血液腫瘍細胞を用いた検討において既に報告されているが、胃癌細胞においては報告されておらず、本研究で示すことができた。従来から bortezomib の作用機序として知られている NF-κB の抑制効果に関し、NF-κB 阻害剤を用いて NF-κB シグナルを抑制する検討は行っていないが、既に挙げた 2 つの機序と併せて、いずれのシグナルを活性化もしくは抑制することが抗腫瘍効果においてより重要かを考察することは、bortezomib に対する感受性が高い臨床群の選別に関連するという意味で臨牀的にも重要であると思われる。

その一方で、bortezomib の濃度を臨牀的に使用される際の血漿中濃度に近い濃度である 10nM とした際にみられた胃癌細胞株間の細胞生存率の差異は、今回抗腫瘍効果に関与すると考えられた NF-κB、ROS/JNK、Erk シグナルのみで説明することは困難であると思われた。更に胃癌細胞株の分化度の差異も感受性の差異とは相違していた。今回未検討の領域において何らかの要因が存在する可能性は否定できない。多発性骨髄腫の検討では、抗腫瘍効果の機序として増殖シグナルの抑制や抗アポトーシス等の他に、骨髄腫細胞と骨髄間質細胞間の接着、骨髄間質細胞からのサイトカイン分泌による骨髄腫細胞の増殖抑制等の作用も重要であるとする報告があり、胃癌細胞において同様の機序が存在するか否かに関する検討は有用である可能性があると考えられる。その他、DNA マイクロアレイなどの網羅的な手法を取り入れた検討が有効である可能性が考えられる。

bortezomib 以外のプロテアソーム阻害薬には複数の薬剤が知られているが、一例として MG132 においては、アポトーシス、細胞周期停止等、bortezomib と類似の作用機序の他、Erk、Akt シグナルは活性化するとする逆の結果が報告されている。その点で bortezomib は従来のプロテアソーム阻害薬も有するアポトーシス、細胞周期停止等の効果に加え、Erk や Akt シグナルの活性化を抑制する効果も有し、かつ人体に投与可能な薬剤であり、より優れた薬剤であると言える。

また、Erk の抑制に伴う増殖抑制については血液腫瘍細胞を用いた検討、胃癌細胞を用いた報告と同様の結果であり、その作用機序として MKP の増加が考えられる。MKP のうち MKP1 は JNK の活性化を抑制し、アポトーシス誘導に拮抗するとする報告もみられるが今回の検討では bortezomib 投与により Erk のリン酸化は抑制されている一方、JNK のリン酸化は亢進していた。胃癌細胞における MKP の誘導の有無および機能についての検証は今後の課題と考えられる。

今回の *in vivo* の検討では bortezomib は単剤でも胃癌細胞株を異種移植した皮下腫瘍に

奏功する結果を示したが、既報では *in vitro* で 5-fluorouracil, paclitaxel, doxorubicin, SN-38 や docetaxel との併用で単剤を上回る有効性が報告されていること、臨床的には分子標的薬は標準的な化学療法との併用で用いられることが多いことを考慮すると、今後、*in vivo* でも 5-FU や cisplatin, capecitabine, paclitaxel, docetaxel 等の薬剤との併用による効果を検討することは有意義であると思われる。更に、今回は皮下に作成した異種移植モデルを用いた評価のみを行ったが、臨床的に化学療法の適応となる進行胃癌に多くみられる、転移性病変を有するような動物モデルを用いた検討も今後の課題と考えられる。

その根拠として、近年海外から報告された進行胃癌に対する bortezomib 単剤の効果に関する 2 例の phase II 臨床試験が、いずれも否定的な結果であったことが挙げられる。臨床試験の結果に関しては慎重な評価を行うことも重要であるが、既報及び今回の検討の結果と解離していることに関しては、検討で用いられている bortezomib の濃度が、臨床的に使用される濃度と比較し高濃度の傾向にあることも一因と考えられ、今後の *in vitro*、*in vivo* の検討を臨床的な条件により近づけて行う必要があると思われる。その際には、*in vitro* で腫瘍細胞に有用である濃度の bortezomib が正常胃粘膜細胞に対し及ぼす影響に関する検討も、臨床応用を考える上で重要である。今後は臨床的に bortezomib 単剤が非有効である要因についての検討を進める必要があると考えられる。

以上より、bortezomib は *in vitro*、*in vivo* で検討に用いた全ての胃癌細胞株に対し抗腫瘍効果を認め、ROS の産生や JNK の活性化に続くアポトーシスの誘導、Erk の抑制に伴う増殖抑制に起因すると考えられた。また、今回の検討では胃癌細胞株の bortezomib に対する感受性の決定には多因子が関与している可能性が示唆された。