

## 岩手医科大学審査学位論文の要旨 (博士)

BCL2 and BCLxL are key determinants of resistance to antitubulin chemotherapeutics  
in melanoma cells

(悪性黒色腫における抗チューブリン薬耐性はBCL2とBCLxLによって規定される)  
(渡辺彩乃, 安平進士, 井上剛, 葛西秋宅, 柴崎晶彦, 高橋和宏, 赤坂俊英, 増田友之,  
前沢千早)

(Experimental Dermatology 22巻8号, 2013年8月掲載)

### I. 研究目的

悪性黒色腫は様々な抗がん剤に抵抗性を示し、皮膚がん死亡の大部分を占める。paclitaxel や vincristine などの微小管を標的とする薬剤は、卵巣がん、乳がんなどの多様な悪性腫瘍に対して広く使用されているが、悪性黒色腫に対する効果は極めて低いことが知られている。これらの抗チューブリン薬は細胞を有糸分裂で停止させ、細胞死を誘導するが、その詳細なメカニズムは明らかではない。また、これらの薬物に対して耐性を示すがん細胞が、細胞死を免れる機構も明らかではない。本研究室では、これまで卵巣がんや悪性黒色腫において、 $\beta$  III チューブリンが paclitaxel 自然耐性に関与する重要な分子であることを明らかにしてきたが、その後の研究により、 $\beta$  III チューブリンの発現と paclitaxel 耐性が必ずしも一致しない細胞株のあることが分かってきた。近年、大腸がん、卵巣がんにおいてアポトーシス抑制蛋白質である MCL1 が抗チューブリン薬により誘導されるアポトーシスの重要な制御因子であることが明らかにされた。

本研究では、アポトーシス抑制蛋白質に注目し、悪性黒色腫の paclitaxel 耐性機構を明らかにし、その耐性克服戦略について検討した。

### II. 研究対象ならび方法

悪性黒色腫培養細胞株 7 株 (HMV I, MM-RU, PM-WK, HMV II, CRL 1579, G-361, SK-MEL-28) を使用し、アポトーシス抑制蛋白質 (BCL2, MCL1, BCLxL, BCLw, A1) の発現量と paclitaxel 耐性の関連性について検討した。アポトーシス抑制蛋白質の発現は、Western blotting 法で解析し、細胞周期の解析には、FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) を用いた。FACS解析によりDNA含量がG1期の細胞よりも少ないものを死細胞と判定し、その量を耐性／感受性の指標とした。また同時にアポトーシスの指標であるcleaved caspase-9とcleaved PARPの量についてもWestern blotting法により解析した。BCL2 阻害薬 (ABT-737, ABT-263/Navitoclax<sup>®</sup>; Selleck Chemicals) および siRNA (Life Technologies) にて BCL2, BCLxL を抑制し、paclitaxel への感受性の変化を検討した。また、かずさDNA研究所より購入した BCL2 の cDNA を用いて 3×FLAG-BCL2 vector を作成、BCL2 の高発現細胞株を樹立し、

paclitaxelへの感受性の変化について検討した。

### III. 研究結果

1. paclitaxel 耐性あるいは感受性の細胞株いずれでも, paclitaxel 投与後 24 時間で分裂停止が見られたが, MCL1 の分解に差は見られなかった。
2. アポトーシス抑制に働く BCL2 family 蛋白質 (BCL2, BCLxL, MCL1, BCLw, A1) のうち, 悪性黒色腫の持つ paclitaxel 耐性と関連したのは, BCL2 の過剰発現であった。
3. 悪性リンパ腫の分子標的治療薬である BCL2 阻害薬 (ABT-737, ABT-263/Navitoclax<sup>®</sup>) と paclitaxel の併用は, 耐性悪性黒色腫細胞株にアポトーシスを誘導した。
4. BCL2 と BCLxL を同時に発現抑制することで (siRNA), paclitaxel 処理は耐性悪性黒色腫細胞株にアポトーシスを誘導した。
5. 感受性株に BCL2 を過剰発現させることによって, 有意に paclitaxel 処理によるアポトーシスが抑制された。

### IV. 考 按

paclitaxel による細胞死誘導の程度は実験に使用した細胞株により大きく異なっていたが, 感受性の違いに関わらず, 処理後一過的に M 期停止が誘導されたことから, 悪性黒色腫における抗チューブリン薬耐性は微小管の構成要素に起因するのみではなく紡錘体チェックポイントの活性化/M 期停止が誘導された後のアポトーシス回避機構が重要であると考えられた。Melanocyte の発生・分化や維持には Mitf (Microphthalmia-associated transcription factor) という転写因子が中心的な役割を担っているが, BCL2 の発現は Mitf によって正に制御されており, これが一般に化学療法耐性である悪性黒色腫の性質に影響していると考えられている。実際に今回の結果からも BCL2 の発現と paclitaxel の感受性には相関が得られた。しかし, paclitaxel への感受性を高めるには BCL2 のみではなく BCLxL を同時に抑制することが重要であることが分かる。図 2 において BCLxL の発現と paclitaxel への感受性において, 明らかな相関が得られなかったのは, BCLxL を量以外の方法で活性制御するような機構の存在による可能性があり, 今後の研究が望まれる。

### IV. 結 語

悪性黒色腫の抗チューブリン薬耐性には MCL1 の分解機構ではなく, むしろ BCL2, BCLxL の抗アポトーシス活性が重要な役割を担っていることが示唆された。また, その阻害薬である ABT-737, ABT-263/Navitoclax<sup>®</sup> を抗チューブリン薬と併用することで, 悪性黒色腫の新規分子標的治療法となる可能性が示された。