

論文内容の要旨

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, β 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, β 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[®]; 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®)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. 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®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.

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 杉山 徹 (産婦人科学講座)

副査 教授 赤坂 俊英 (皮膚科学講座)

副査 准教授 伊藤 薫樹 (血液・腫瘍内科分野)

悪性黒色腫は高率に血行性、リンパ行性転移をきたし、全皮膚がん死亡の8割を超える予後不良の疾患である。進行期の悪性黒色腫に対しては、化学療法、免疫療法、放射線療法などの治療法が試みられているものの、その予後は極めて不良である。悪性黒色腫では高頻度に生じる活性化型 BRAF 変異 (V600E) が癌化の責任変異 (ドライバー変異) とされ、その阻害薬 (vemurafenib) は、新規分子標的治療薬として期待されている。しかし、日本人で多い末端黒子型黒色腫では BRAF-V600E の変異が低いことに加えて、早期に薬剤耐性が出現し易く、別経路による新規分子標的治療薬の開発が望まれている。

本研究の目的は、悪性黒色腫における微小管脱重合阻害剤である paclitaxel の耐性分子機構に着目し、その克服法の解明に基づく新規治療法の開発である。悪性黒色腫細胞の paclitaxel への耐性には、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り、その分子機構には 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を示した。また、その阻害薬である ABT-737, ABT-263/Navitoclax® は paclitaxel との併用で悪性黒色腫の新規分子標的治療法となる可能性を示した。

悪性黒色腫において paclitaxel と ABT-737, Navitoclax® を併用した報告は未だなく、本論文は、悪性黒色腫における新規治療法の開発につながる有益な研究であり、学位に値するものである。

試験・試問の結果の要旨

悪性黒色腫の標準治療および paclitaxel 耐性機序の分子機構とその解析手法について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。

参考文献

- 1) In-transit metastasis を認めた eccrine porocarcinoma の1例
(渡辺彩乃, 他 10 名と共著)
臨床皮膚科 64 巻, 8 号 (2010 年 7 月掲載)
- 2) 水疱様外観を呈した石灰化上皮腫の2例
(渡辺彩乃, 他 8 名と共著)
臨床皮膚科 67 巻, 1 号 (2013 年 1 月掲載)
- 3) モルフェアを合併した全身性強皮症の1例
(渡辺彩乃, 他 3 名と共著)
臨床皮膚科 67 巻, 2 号 (2013 年 2 月掲載)
- 4) A somatic mutation of the *KEAP1* gene in malignant melanoma is involved in aberrant NRF2 activation and an increase in intrinsic drug resistance
(悪性黒色腫における KEAP1 遺伝子の体細胞変異は異常な NRF2 活性化に関与し薬剤耐性を増加させる) (三浦慎平, 他 11 名と共著)
Journal of Investigative Dermatology, 134 巻, 2 号 (2014) : p553-556.
(2014 年 2 月掲載)