

論文内容の要旨

YM155 suppresses proliferation and survival of multiple myeloma cells via proteasomal degradation of c-Myc
(YM155 はプロテアソーム依存性に c-Myc 発現を抑制し、多発性骨髄腫細胞の増殖抑制効果をもたらす)
(旭真来, 伊藤薫樹, 高野幹, 石田陽治)
(Journal of Medical Oncology and Therapeutics 1 巻, 2 号, 平成 28 年 10 月掲載)

I. 研究目的

多発性骨髄腫は難治性の形質細胞性腫瘍である。プロテアソーム阻害薬や免疫調節薬により治療成績は向上したが、未だ治癒の得られない疾患であり、新たな治療薬の開発が期待されている。

Survivin は inhibitor of apoptosis protein (IAP) family に属し、細胞分裂やアポトーシスの抑制に重要な役割を果たしている。多発性骨髄腫において Survivin 発現量と疾患の進行度に強い相関が示されている。また、Survivin のノックダウンによりアポトーシスが誘導されることも報告されている。Survivin 阻害薬である YM155 は、肺がんなどの固形腫瘍領域で臨床試験が進行中である。しかし、多発性骨髄腫に対する効果は不明である。

本研究では、YM155 の骨髄腫細胞の増殖抑制効果とその作用機序を明らかにすることを目的とする。

II. 研究対象ならび方法

対象として 5 つのヒト骨髄腫細胞株 (RPMI8226, U266, KMS-20, KMS-28PE, KMS-34) を用いた。各細胞株は、10%胎児ウシ血清加 RPMI1640 メディウムで培養した。YM155 は、Selleckchem 社製(米国 Houston)を用いた。

各濃度の YM155 で 24 時間処理後、MTT アッセイにより、細胞増殖抑制割合を測定した。細胞死割合は、YM155 で 24, 48 時間処理後、アネキシン V およびプロピジウムイオダイド染色によりフローサイトメトリ法で測定した。骨髄腫細胞増殖における c-Myc の依存性を検討するため、c-Myc 阻害薬 JQ1 を用いて MTT アッセイを行った。

作用機序を検討するため、RPMI8226 および KMS-28PE を用いて YM155 処理による抗アポトーシス分子 (Survivin, Mcl-1, XIAP, Bcl-2) と転写調節因子 [c-Myc, interferon regulatory factor (IRF)-4] の発現に対する影響をウエスタンブロット法で検討した。

また、YM155 (50 nM) およびプロテアソーム阻害剤 MG-132 (10 μ M) の存在・非存在下で 6 時間処理後、c-Myc および IRF4 発現に対する影響をウエスタンブロット法で検討した。c-Myc 発現抑制の機序を検討するため、YM155 による F-box and WD-40 domain protein 7 α (FBXW7 α) の発現への影響をウエスタンブロット法で検討した。

さらに、10 nM の YM155 の存在・非存在下で 6 時間培養後、リアルタイム RT-PCR 法により c-Myc mRNA を測定した。内部コントロールとして GAPDH を用いた。

III. 研究結果

MTT アッセイでは、濃度依存性に各細胞株の増殖が抑制されたが、 IC_{50} は細胞株間で異なっていた (10nM~100nM)。アポトーシスアッセイでは濃度・時間依存性に細胞死が誘導された。その作用機序を検討するためにアポトーシス関連分子をウエスタンブロット法で検討したところ、YM155 は Survivin のみならず Mc1-1, XIAP 発現を抑制しカスパーゼ 3, PARP を活性化した。さらに、骨髄腫の分子病態に重要な c-Myc および IRF-4 の発現が抑制された。骨髄腫細胞では c-Myc と IRF-4 が互いに positive feedback loop を形成することが知られている。これらの分子の発現抑制までの時間は c-Myc が 6 時間、IRF4 が 18 時間であったことから、c-Myc 発現の抑制を介し IRF4 の発現低下を誘導すると考えられた。YM155 により、c-Myc mRNA 発現量への有意な影響は認められなかった。c-Myc 阻害薬 JQ1 により、濃度依存性に骨髄腫細胞の増殖を抑制した。

YM155 による c-Myc 蛋白の発現抑制は MG132 処理により阻害されたこと、YM155 により c-Myc のユビキチンリガーゼ FBXW7 α の発現増強が誘導されたことから YM155 は少なくともプロテアソームを介して c-Myc 分解を誘導することが示唆された。

IV. 結 語

YM155 は、骨髄腫細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導した。YM155 は Survivin のみならず他の抗アポトーシス分子である Mc1-1 や XIAP の阻害を介し、カスパーゼ依存性にアポトーシスを誘導する。さらに YM155 はユビキチンリガーゼ FBXW7 α の発現増強を誘導し、プロテアソームを介して c-Myc 分解を促進することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 志賀 清人 (耳鼻咽喉科学講座)

副査 教授 滝川 康裕 (内科学講座:消化器内科肝臓分野)

副査 講師 古和田 周吾 (内科学講座:血液腫瘍内科分野)

多発性骨髄腫は難治性の形質細胞性腫瘍であり、種々の治療薬によりその治療成績は向上してきたが、未だ治癒に至らない例も多く、新たな治療薬の開発が望まれている。本研究論文では、多発性骨髄腫細胞の増殖が *suvivin* 発現に依存していることから、*suvivin* 阻害剤 YM155 に着目した。これを用いて *in vitro* で培養骨髄腫細胞の増殖抑制効果を検討し、*suvivin*, *Mcl-1*, *XIAP* 発現が抑制され、*caspase 3*, *PARP* が活性化することを Western blot 法で確かめている。また、*IRF4* や *c-Myc* の発現が抑制されることを確かめ、YM155 がプロテアソーム依存性に *c-Myc* を抑制し骨髄腫細胞の抑制をもたらす可能性を指摘している。

非常に多くの実験を系統建てて行っており、骨髄腫細胞の増殖抑制についての新たな知見を示した研究といえる。学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

培養細胞の違いによる増殖抑制効果の相違や、研究の動機、臨床応用された場合についての問題点などについての試問に的確に回答でき、また、今後の研究の展開などについても明確に説明できた。学位に値する学識を有していると考えられる。

参考論文

- 1) YM155 suppresses cell proliferation and induces cell death in human adult T-cell leukemia/lymphoma cells. (YM155 は成人 T細胞白血病/リンパ腫細胞の増殖抑制効果と殺細胞効果をもたらす) (佐々木了政 他 3名と共著)
Leukemia Research, 39 巻, 12 号 (2015) : 1473-1479.
- 2) Resveratrol suppresses cell proliferation via inhibition of *STAT3* phosphorylation and *Mcl-1* and *cIAP-2* expression in HTLV-1-infected T cells. (Resveratrol は HTLV-1 が感染した T細胞において *STAT3* のリン酸化を阻害し、*Mcl-1* と *cIAP-2* の抑制を介して細胞増殖を抑制する) (鈴木雄造 他 4名と共著)
Leukemia Research, 37 巻, 12 号 (2013) : 1674-1679.