

論文内容の要旨

Oridonin induces apoptosis of myeloma cells via c-Myc degradation by nuclear translocation of Fbxw7 α

(オリドニンとは、Fbxw7 α の核移行による c-Myc 分解により骨髄腫細胞のアポトーシスを誘導する)

(高野幹, 伊藤薫樹, 旭真来, 古和田周吾, 石田陽治)

(Journal of Cancer Sciences 4 巻 1 号 平成 29 年 12 月電子掲載)

I. 研究目的

多発性骨髄腫 (Multiple myeloma: MM) 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。c-Myc は、細胞の成長、増殖、生存、代謝の調節において必須の役割を果たす転写因子である。c-Myc は、多発性骨髄腫の 2/3 に過剰発現しており、MM の前病変の単クローン性ガンマグロブリン血症では発現を認めない。c-Myc 遺伝子のノックダウンにより、骨髄腫細胞に細胞死が誘導されることから治療標的分子として期待されている。ジテルペノイドであるオリドニンは、白血病細胞株において c-Myc のユビキチンリガーゼである F-box WD40 domain protein 7 α (Fbxw7 α) の発現を増強し、c-Myc を分解することが報告された (Huang ら Mol Cancer Ther. 2013;11(5):1155-65.)。このことから、プロテアソーム依存性に c-Myc の発現を抑制する新たな治療コンセプト開発の可能性が示唆される。しかしながら、骨髄腫におけるオリドニンの殺細胞効果やその作用機構に関する詳細な検討はない。

本研究では、MM 細胞においてオリドニン処理時の c-Myc の発現への影響および増殖抑制効果ならびに作用機序について検討した。

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。オリドニンは Selleck Chemicals (Houston, TX) 製を、プロテアソーム阻害剤である MG132 は EMD Biosciences (La Jolla, CA) 製を使用した。

各濃度のオリドニンで 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、オリドニンで 24 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。

作用機序を検討するため、RPMI8226 および KMS-28PE を用いてオリドニン処理による抗アポトーシス分子と転写因子の発現に対する影響をウェスタンブロット法で検討した。

また、オリドニン (10 μ M) 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 2 時間処理後、c-Myc およびインターフェロン制御因子-4 (IRF-4) 発現に対する影響を

ウエスタンブロット法で検討した。

Fbxw7 α の細胞内、核内の動態を調べるため、ウエスタンブロット法および免疫蛍光染色法により検討した。

データは平均±標準偏差 (SD) として表した。統計解析はスチューデントの t 検定を用いた。P 値<0.05 を統計学的に有意差ありとした。

III. 研究結果

1. オリドニンが MM 細胞株の増殖および生存を抑制した ($IC_{50}=8.24 \pm 0.18 \mu M$)。
2. オリドニンは、c-Myc 発現を抑制し、RPMI8226 および KMS-28PE 細胞においてカスパーゼ-3 および PARP を活性化した。
3. オリドニンは MM 細胞において IRF-4 および Fbxw7 α の蛋白発現を抑制しなかった。
4. オリドニンは、RPMI8226 および KMS-28PE 細胞において c-Myc mRNA の発現抑制および c-Myc のプロテアソーム分解を誘導した。
5. Fbxw7 α の細胞内局在について検討したところ、オリドニンは、RPMI8226 細胞において Fbxw7 α の核移行を誘導した。

IV. 結 語

この研究では、オリドニンが MM 細胞の増殖を用量依存的に抑制し、カスパーゼ依存性にアポトーシスを誘導することを実証した。また、オリドニンは、RPMI8226, KMS-28PE 細胞において、プロテアソーム依存性および転写抑制により c-Myc の発現を低下させることが示唆された。加えて、オリドニンは、Fbxw7 α の核蓄積を誘導した。以上から、オリドニンは、MM 細胞において Fbxw7 α の核移行の誘導による c-Myc のプロテアソーム分解を介して細胞死を誘導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 (頭頸部外科学科)

副査 准教授 遠藤 幹也 (小児科学講座)

副査 講師 宮坂 昭生 (内科学講座：消化器内科肝臓分野)

多発性骨髄腫 (Multiple myeloma:MM) は難治性の形質細胞腫瘍であり、新たな治療薬の開発が期待されている。c-Myc はMM 細胞で過剰発現しており、これまでの研究から治療標的分子として重要な存在であることがわかっている。本研究ではMTT アッセイ、フローサイトメトリー法、ウェスタンブロット法、リアルタイムPCR 法、免疫蛍光染色症などを用い、MM 細胞株を材料に生薬トオリンソウから抽出された有効成分であるオリドニンの MM 細胞に対する増殖抑制効果が濃度依存性で、カスパーゼ依存性にアポトーシスを誘導することによること、プロテアソーム依存性および転写抑制により c-Myc の発現を低下させることを明らかにした。また、オリドニンのc-Mycのプロテアソーム分解がFbxw7aの核移行の誘導によるものであることを明らかにした。

本論文はオリドニンのMM 細胞増殖抑制効果を *in vitro* で詳細に検討し、今後の患者の治療に有用な治験を示した研究であり、学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

最終試験では実験結果をスライドで明確に示し、実験手法や結果の解釈に関する質問に明確に答え、学位に値する学識を有していると考えた。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作などの研究不正は無いことを確認した。

参考論文

- 1) 多発性骨髄腫に対する標準治療 (伊藤薫樹, 他1名と共著)
日本内科学会雑誌 105 巻, 7 号 (2016) : p1238-1245.
- 2) 初発移植非適応多発性骨髄腫の治療, 新規薬剤とその使いどころ (高野幹, 他1名と共著)
臨床腫瘍プラクティス 12 巻 (2016) : p227-231.