



Bortezomib potentially inhibits cellular growth of vascular endothelial cells through suppression of G2/M transition.

田村, 大介

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5646

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005646>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Bortezomib potentially inhibits cellular growth of vascular endothelial cells through suppression of G2/M transition.

ボルテゾミブは G2/M 移行期での細胞周期抑制を通して
血管内皮細胞の増殖を強く抑制する

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
呼吸器内科学
(指導教員：西村善博准教授)

田村 大介

はじめに

プロテアソームはリソソームを介さない ATP 依存的蛋白分解経路において重要な役割を担う酵素複合体であり、ユビキチン・プロテアソーム系の経路は傷害や酸化を受けた蛋白や誤って折りたたまれた蛋白の細胞内分解や、さらには細胞周期の進行などに重要な役割を担っている。またこの系は細胞の増殖や多様化、生存、アポトーシスや血管新生などにも関わっているため、がん治療における有望なターゲットになり得ると考えられてきた。

ボルテゾミブ (商品名ベルケイド) は 26S プロテアソームに選択的に作用する阻害剤でいくつかのヒトの腫瘍細胞に対して強い抗腫瘍効果を示し、現在では再発後の多発性骨髄腫に臨床応用されている。この薬剤の主な作用機序としては抗アポトーシス蛋白の転写因子として働く NF- κ B に対する阻害作用が考えられている。また細胞周期に関わる蛋白の修飾によって細胞周期にも変化を及ぼし、このことが抗腫瘍効果に関わることも分かっている。さらにボルテゾミブは血管内上皮成長因子 (VEGF) の分泌を減少させることで抗血管新生作用を持ち、この作用も抗腫瘍効果に寄与しているといわれている。このボルテゾミブの抗血管新生作用は VEGF 自体の分泌抑制を介した血管内皮細胞への間接的な作用であると考えられてきたが、血管内皮細胞への直接的な作用を示す報告が散見されるようになってきた。しかし、この直接的作用に関わる機序に関しては不明である。

我々はボルテゾミブの血管内皮細胞に対する直接的な作用機序について新たな知見を得るため、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いてボルテゾミブがこの細胞に及ぼす影響を細胞増殖、VEGF 受容体 (VEGFR-2) シグナル、アポトーシス、血管透過性、細胞周期などの観点から検討した。

結果

ボルテゾミブは VEGF のシグナルとは無関係に HUVEC の増殖を抑制する

in vitro でのボルテゾミブの HUVEC 細胞増殖抑制効果を評価するために、我々は VEGF リガンドが存在する条件としない条件とで MTT アッセイを行った。その結果ボルテゾミブは VEGF の有無に関わらず細胞の増殖を強く抑制した (IC50 : 2 nM)。またこのボルテゾミブの効果が VEGFR-2 のシグナルに関連した効果であるかを検討するために、比較対照として VEGFR-2 のチロシンキナーゼ阻害剤である Ki8751 を用いて、VEFR-2 受容体や MAPK のリン酸化の状態を比較したところ Ki8751 では両者のリン酸化の抑制が見られたが、ボルテゾミブはこれらのリン酸化を抑制しないことが示され、ボルテゾミブは VEGFR-2 のシグナル経路とは無関係な機序にて血管内皮細胞の

増殖を抑制していると考えられた。

ボルテゾミブは *in vitro* で血管透過性を亢進する

我々はボルテゾミブの血管透過性に対する影響を検討するため *in vitro* permeability assay と呼ばれる市販のアッセイ法を用い、比較対照薬としてこの実験系でも Ki8751 を用いた。Ki8751 は血管透過性の亢進に関わる VEGFR-2 のシグナルを抑制するので、この実験系においては血管透過性を亢進させないことが予想されたが結果もその通りであった。これに対してボルテゾミブは血管透過性を用量依存性に亢進することが示され、このことが強い抗腫瘍効果の一因を担っていると考えられた。

ボルテゾミブは HUVEC のアポトーシスを誘導する

ボルテゾミブの HUVEC に対するアポトーシス誘導をウェスタンブロットの手法を用いて確認したところ cleaved caspase3 および cleaved PARP の用量、時間依存性増加を認め、ボルテゾミブは HUVEC のアポトーシスを誘導していることが明らかになった。

ボルテゾミブは G2/M 期の細胞増加を促す

すでにボルテゾミブの細胞周期への影響は既報であるが、その詳細についてさらに検討するため HUVEC を用いてフローサイトメトリーにて細胞周期解析を行った。その結果ボルテゾミブの暴露により HUVEC の G2/M 期の細胞数に著明な増加が見られた。さらに HUVEC の細胞形態をギムザ染色下で観察したところ、ボルテゾミブの暴露によって HUVEC 細胞のほとんどは M 期に特徴的な形態をとっていないことが示された。また M 期特異的なマーカーとされるリン酸化ヒストン H3 抗体を用いた免疫染色にてボルテゾミブ暴露下にはこの抗体に陽性の細胞は見られなかった。これらの結果を合わせて考察するにボルテゾミブは G2/M の移行期において細胞周期の進行を抑制していることが示唆された。

ボルテゾミブは cdc2/cyclinB キナーゼ活性を抑制する

細胞周期 G2/M 移行期では cdc2/cyclinB 複合体のキナーゼ活性が主にその進行の律速段階となっている。この複合体は①cyclinB が S 期後期から G2 期にかけて増加する②その cyclinB がリン酸化されていない cdc2 に結合して不活性な cdc2/cyclinB 複合体となる③cdc2 が G2 期に T14、Y15、T161 においてリン酸化される④この複合体の cdc2 の T14 と Y15 でのリン酸化が脱リン酸化酵素である cdc25 により脱リン酸化されるこ

とにより cdc2/cyclinB 複合体が活性化状態となり細胞を M 期に導く、以上の過程により細胞の G2/M 移行期を支配している。

ボルテゾミブは用量、時間依存的に cyclinB の発現を増加させており、さらに免疫沈降法による解析ではボルテゾミブが cdc2/cyclinB 複合体の発現も増加させていることがわかった。さらにボルテゾミブは cdc2 の T14、Y15、T161 のリン酸化を促していることが分かり、ボルテゾミブは不活性な cdc2/cyclinB 複合体を増加させていることが示された。これらの結果はボルテゾミブが HUVEC の細胞周期を G2/M 移行期で止めることを示唆している。

さらに我々は cdc2/cyclinB 複合体のキナーゼ活性に抑制的に働く酵素である wee1、cdc25C のリン酸化状態などについても検討した。その結果 wee1 の発現やそのリン酸化はボルテゾミブにより増加していたが cdc25C についてはいずれも変化が見られなかった。

また、我々は wee1 の発現増加の機序や前述の cyclinB の発現増加の機序についても検討した。両者はいずれも元来ユビキチン・プロテアソーム系の経路により分解されるものであるが、その経路による蛋白分解がボルテゾミブにより阻害され、ユビキチン化した状態の wee1 や cyclinB が蓄積していることが一つの要因になっていることが免疫沈降法による蛋白発現解析によって示されたとともに、それらの結果として HUVEC の細胞周期が G2/M 移行期にて停止しているとも考えられた。最終的に cdc2/cyclinB 複合体の活性を市販の kinase assay キットにて定量したところ、ボルテゾミブはこの複合体の活性を強く抑制していることが示された。

考察

がん細胞においてボルテゾミブは G2/M 期に関連する細胞周期調節因子である cyclinA、B の蓄積を誘導して細胞周期を G2/M 期に停止させるといわれているが、G2/M の移行期で停止させるのか、M 期途中で停止させるのかについては明らかではなかった。我々はボルテゾミブが HUVEC の G2 期細胞を増加させていることを明らかにし、さらに G2/M 移行期での細胞周期進行を調節する種々の因子について検討したところ、ボルテゾミブにより cyclinB、ユビキチン化された cyclinB、cdc2/cyclinB 複合体が増加していることが分かった。同時にボルテゾミブにより cdc2 の T14、Y15、T161 のリン酸化が有意に促進されており、cdc2/cyclinB 複合体のキナーゼ活性自体も抑制されていることが示唆され、実際にキナーゼアッセイにてこの複合体の活性は強く抑制されていた。これらのことからボルテゾミブは HUVEC を M 期途中で停止させるのではなく、G2/M 移行期において細胞周期を停止させていることが示され、我々の実験結果は

ボルテゾミブの HUVEC の細胞周期に対するユニークな影響を示した。さらにはボルテゾミブによる wee1 の分解阻害による蓄積もこの G2/M 移行期での cdc2/cyclinB 複合体のキナーゼ活性阻害の一因になっている可能性も示唆された。

VEGFR のチロシンキナーゼ阻害剤に代表される血管新生阻害薬 (vascular targeting agents : VTA) は新生血管の発達を標的にする薬剤であるが、臨床的には比較的長期間にわたって投与が必要になることが多い。それに対して血管破壊薬 (vasclura disrupting agents : VDA) と呼ばれる薬剤は既存の腫瘍血管を標的にする薬剤であり、比較的速やかに標的血管の破壊をきたし、また血流を長期間にわたって阻害する作用があるため長期にわたって腫瘍の壊死を促す薬剤である。それゆえ効果発現が速やかであることが多い。VDA は一般的に強い細胞増殖抑制効果を持ち、G2/M 移行期での細胞周期停止を促し、さらには血管透過性を亢進させるといわれている。我々の実験によってボルテゾミブは VDA と同様の性質を持っていることが示され、ボルテゾミブは VDA のカテゴリーに入りうる性質を持った薬剤であり、さらにこの性質はボルテゾミブの抗腫瘍効果の主たる性質の一つであると考えられ、臨床におけるボルテゾミブの新たな可能性を示唆するものであると考えた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2278号	氏 名	田村 大介
論文題目 Title of Dissertation	<p>Bortezomib potentially inhibits cellular growth of vascular endothelial cells through suppression of G2/M transition.</p> <p>ボルテソミブは G2/M 移行期での細胞周期抑制を通して血管内皮細胞の増殖を強く抑制する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 柳田 穂夫 Chief Examiner</p> <p>副 査 南 博信 Vice-examiner</p> <p>副 査 吉村 雅裕 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

プロテアソームはリソソームを介さない ATP 依存的蛋白分解経路において重要な役割を担う酵素複合体であり、蛋白の細胞内分解や、細胞周期の進行などに重要な役割を担っている。またこの系は細胞の増殖や多様化、生存、アポトーシスや血管新生などにも関わっているため、がん治療における有望なターゲットになり得ると考えられてきた。ボルテソミブは 26S プロテアソームに選択的に作用する阻害剤で、再発後の多発性骨髄腫に臨床応用されている。ボルテソミブは血管内上皮成長因子 (VEGF) の分泌を減少させることで抗血管新生作用を持ち、この作用は抗腫瘍効果の一因になっているといわれている。このボルテソミブの抗血管新生作用は VEGF 自体の分泌抑制を介した血管内皮細胞への間接的な作用であると考えられてきたが、血管内皮細胞への直接的な作用を示す報告が散見されるようになってきた。しかし、この直接的作用に関わる機序に関しては不明である。本研究はボルテソミブの血管内皮細胞に対する直接的な作用機序を明らかにするため、ボルテソミブがヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に及ぼす影響を細胞増殖、VEGF 受容体 (VEGFR-2) シグナル、アポトーシス、血管透過性、細胞周期などの観点から検討した。

(1) ボルテソミブの HUVEC 増殖抑制効果を評価したところボルテソミブは VEGF の有無に関わらず細胞の増殖を強く抑制し (IC50: 2 nM)、VEGFR-2 のチロシンキナーゼ阻害剤を比較対照として用いた実験によりボルテソミブは VEGFR-2 のシグナル経路とは無関係な機序にて血管内皮細胞の増殖を抑制していると考えられた。

(2) *in vitro* permeability assay 法を用いてボルテソミブの血管透過性に対する影響を検討したところボルテソミブは血管透過性を亢進することが示され、このことが強い抗腫瘍効果の一因を担っていると考えられた。

(3) ウェスタンブロット法にて、ボルテソミブは HUVEC のアポトーシスを誘導することが明らかになった。

(4) ボルテソミブの細胞周期への影響について検討するためフローサイトメトリーやギムザ染色による細胞形態の変化の観察、ならびに細胞周期の M 期に特異的な抗体を用いた免疫染色などの結果と合わせて検討したところボルテソミブは G2/M の移行期において細胞周期の進行を抑制していることが示唆された。

(5) 細胞周期 G2/M 移行期では cdc2/cyclinB 複合体のキナーゼ活性が主にその進行の律速段階となっている。この複合体は①cyclinB が S 期後期から G2 期にかけて増加する②その cyclinB がリン酸化されていない cdc2 に結合して不活性な cdc2/cyclinB 複合体となる③cdc2 が G2 期に T14、Y15、T161 においてリン酸化される④この複合体の cdc2 の T14 と Y15 でのリン酸化が脱リン酸化酵素である cdc25 により脱リン酸化されることにより cdc2/cyclinB 複合体が活性化状態となり細胞を M 期に導く、以上の

過程により細胞の G2/M 移行期を支配している。

ボルテゾミブはこれらのうち cyclinB や cdc2/cyclinB 複合体の発現を増加させていた。さらにボルテゾミブは cdc2 の T14、Y15、T161 のリン酸化を促しており、ボルテゾミブは不活性な cdc2/cyclinB 複合体を増加させていることが示された。また cdc2/cyclinB 複合体のキナーゼ活性に抑制的に働く酵素である wee1 や cdc25C のリン酸化状態などについても検討した結果、wee1 の発現やそのリン酸化がボルテゾミブにより増加しており cdc2/cyclinB 複合体のキナーゼ活性に抑制的に作用していることが示唆された。cdc2/cyclinB 複合体の活性を定量したところ、ボルテゾミブはこの複合体の活性を強く抑制していることが示された。

今回我々はボルテゾミブが HUVEC の G2 期細胞を増加させていることを明らかにし、ボルテゾミブの HUVEC 細胞周期に対するユニークな影響を示した。また VEGFR のチロシンキナーゼ阻害剤に代表される血管新生阻害薬 (vascular targeting agents: VTA) は新生血管の発達を標的にする薬剤であるのに対して血管破壊薬 (vascular disrupting agents: VDA) と呼ばれる薬剤は既存の腫瘍血管を標的にする薬剤であり、比較的速やかに標的血管の破壊をきたし、また血流を長期間にわたって阻害する作用があるといわれている。VDA は一般的に強い細胞増殖抑制効果を持ち、G2/M 移行期での細胞周期停止を促し、さらには血管透過性を亢進させるといわれているが、我々の実験によってボルテゾミブは VDA と同様の性質を持っていることが示され、ボルテゾミブの抗腫瘍薬としての新たな可能性を示唆するものであるとも考えられる。

本研究は、ボルテゾミブの血管内皮細胞に対する影響について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったボルテゾミブによる血管内皮細胞の G2/M 移行期における細胞周期停止やその機序、さらにはボルテゾミブの血管破壊薬としての可能性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。