

氏名	平岡 信弥
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 455 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	新規抗腫瘍薬ベンダムスチンの作用機序の解明
論文審査委員	(委員長) 教授 森本 哲 (委員) 准教授 永井 正 講師 上田 真寿

論文内容の要旨

1 研究目的

ベンダムスチン (BDM) はナイトロジェンマスタードグループに属するアルキル化剤である。従来のアルキル化剤よりも速く、強い DNA 傷害を誘導することが知られている。また、BDM は、核酸類似構造である benzimidazole ring を有することから、DNA アルキル化作用に加えて代謝拮抗作用を併せもつと推測されている。しかしながら、BDM を用いた臨床研究では、アルキル化剤・代謝拮抗薬耐性症例への高い有効性、単剤で多剤併用療法と同等の高い有効性などが報告されており、単純な DNA アルキル化作用・代謝拮抗作用の相加効果で BDM の作用を完全に説明することは難しい。本研究において申請者らは、BDM の構造特異性に着目し、その作用機序の解明を試みた。

まず、核酸類似構造に着目し、核酸輸送体を介した BDM の細胞内輸送について検討した。BDM の細胞内促進輸送は、基質反応性の高い BDM を分解前に細胞内に移行させることで、BDM の特徴である速く、強い DNA 傷害作用に寄与すると考えられた。

次に、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤に共通の構造である短鎖脂肪酸側鎖に着目し、BDM の HDAC 阻害作用について検討した。BDM による HDAC 阻害作用は、クロマチン弛緩による転写促進・DNA 修復阻害・細胞分裂関連蛋白機能阻害など様々な機序を通じて特異的な抗腫瘍スペクトル・遺伝子発現誘導の原因となると考えられた。

最後に、作用機序の解明に基づいた BDM と各種抗腫瘍薬の併用効果について検討した。BDM の核酸輸送体による促進輸送・HDAC 阻害作用はそれぞれ核酸類似体・HDAC 阻害剤との相互作用に影響し、さらに、DNA を標的とする抗腫瘍薬の作用を増強すると考えられた。

これらの検討は、BDM の臨床応用における重要な理論的裏付けとなり、さらなる治療適応拡大に繋がるものと期待される。

2 研究方法

BDM の作用機序に関して、①核酸輸送体を介した BDM の細胞内促進輸送、②BDM の HDAC 阻害作用、③BDM と核酸類似体・HDAC 阻害剤との併用効果、について検討した。

①核酸輸送体を介した BDM の細胞内促進輸送

核酸輸送体阻害剤を用いて BDM の殺細胞効果が阻害されるか検討した。BDM の殺細胞効果

は MTT 細胞増殖アッセイによって測定した。

②BDM の HDAC 阻害作用

BDM によって各種 HDAC およびアセチル化ヒストンの発現に変化があるかウェスタンブロッティング法で検討した。

③BDM と核酸類似体・HDAC 阻害剤との併用効果

BDM と核酸類似体・HDAC 阻害剤を加えた時の殺細胞効果を測定し、Chou-Talalay 法を用いて併用効果を解析した。核酸類似体の殺細胞効果に大きな影響を持つ核酸輸送体発現が BDM と核酸類似体の併用効果に関連しているか検討するために、BDM による核酸輸送体誘導作用について定量 RT-PCR 法、ウェスタンブロッティング法で検討し、BDM と核酸類似体の投与順序による殺細胞効果の変化について MTT 細胞増殖アッセイ、Chou-Talalay 法で検討した。また、BDM と HDAC 阻害剤あるいは他のアルキル化剤との併用効果に HDAC 阻害作用が関連しているか検討するために、BDM と HDAC 阻害剤を併用したときのヒストンアセチル化誘導をウェスタンブロッティング法で検討し、HDAC ノックダウンによるアルキル化剤の殺細胞効果変化について MTT 細胞増殖アッセイで検討した。

3 研究成果

①核酸輸送体を介した BDM の細胞内促進輸送

BDM が早期に S 期細胞増加・チェックポイントキナーゼ活性化・アポトーシスを誘導することを確認した。BDM はシクロフォスファミド (CY) の代謝産物である 4-ヒドロキシシクロフォスファミド (4-OHCY) より短い暴露時間で十分な殺細胞効果を発揮した。

核酸輸送体阻害剤 Dilazep、NBTI は、濃度依存的に BDM、陽性コントロールとして用いたフルダラビン、シタラビン (Ara-C) の殺細胞効果を減弱したが、4-OHCY の殺細胞効果は減弱しなかった。

②BDM の HDAC 阻害作用

BDM によって HDAC3、SIRT1、SIRT7 の分解が誘導され、分解と並行してヒストンアセチル化が見られた。クラス I HDAC である HDAC1、HDAC2 の発現には変化が見られなかった。ヒストンアセチル化は様々な部位で見られたが、とくにヒストン H3K18 アセチル化が強く見られた。

HDAC3 は核内に主に局在し、SIRT1、SIRT7 は細胞質に主に局在した。HDAC3 については分解と同時に分解産物が核内に検出された。BDM によって、HDAC3、SIRT1、SIRT7 が分解され、ヒストン H3K18 アセチル化が増加するのと並行して、ヒストン H3 の細胞質内での発現が増加した。

③BDM と核酸類似体、HDAC 阻害剤との併用効果

殺細胞効果において、BDM と核酸類似体、4-OHCY、HDAC 阻害剤ロミデプシンはいずれも相加的～相乗的な併用効果を示した。

BDM は転写レベルで核酸輸送体の発現を強く誘導した。BDM を先に加えてから Ara-C を加えた場合は、Ara-C と BDM を同時に加えるか Ara-C を先に加えてから BDM を加えた場合の併用効果を有意に上回った。

BDM はロミデプシンによるヒストンアセチル化を相加的に増強した。

BDMによって分解されるHDAC3をノックダウンした細胞ではBDMおよび4-OHCYの殺細胞効果が増強した。

4 考察

① 核酸輸送体を介したBDMの細胞内促進輸送

アルキル化剤は生体内での基質反応性が非常に高く、歴史的に細胞内濃度を高める工夫がされてきた。CYは細胞内ではじめて活性代謝物に変換されることで分解を防ぎ、メルファランはアミノ酸であるフェニルアラニンにナイトロジェンマスタードを結合したものであるため、アミノ酸輸送体を介して促進輸送される。BDMはナイトロジェンマスタードに核酸類似体であるbenzimidazole ringが結合しており、核酸輸送体を介した促進輸送が、その特徴的な速く、強いDNA傷害の原因と考えられる。

② BDMのHDAC阻害作用

BDM、CYを含むナイトロジェンマスタードは酪酸残基を有する。酪酸残基は一般的に薬剤に水溶性を付加する目的とされているが、HDAC阻害剤である脂肪酸に見られるようにHDAC阻害作用を有する。BDMはさらにbenzimidazole ringを有することから、より強いHDAC阻害作用を持つことが推測される。BDMによるHDAC3特異的な分解は、HDAC3がHDAC1、HDAC2とは異なる複合体に属すること、HDAC3は核内・核外輸送シグナルを共有すること、HDAC1・HDAC2間の相同性と比較して相同性が低いことなどが原因と考えられ、HDAC3がアルキル化剤治療においてHDAC1、HDAC2と異なる働きを持つことを示唆している。非ヒストン蛋白の脱アセチル化に関わるSIRT1、SIRT7は核内に局在するとされているが、一部の腫瘍細胞においてSIRTの異常な細胞質局在が知られており、腫瘍細胞維持に重要な働きを担っていることが報告されている。今回、ヒストンH3K18を基質とするSIRT1、SIRT7がBDMによって分解されることでヒストンの核内移行に重要なH3K18脱アセチル化が行われず、ヒストンの細胞質蓄積を起こし、DNA合成が抑制される機序が示唆された。

③ BDMと核酸類似体、HDAC阻害剤との併用効果

BDMは核酸輸送体を転写レベルで誘導し、核酸類似体の取り込みを促進していることが示唆された。BDMによる核酸輸送体の誘導は自身の細胞内移行をさらに誘導し、細胞内濃度をより高めると考えられる。

クラスI HDAC阻害剤であるロミデプシンはHDACの酵素活性を阻害するため、HDAC3の分解を誘導するBDMと相加的にヒストンアセチル化作用を示すと考えられる。

BDMは、速やかな細胞内移行によってDNAアルキル化に加えてヒストンアセチル化を誘導することで、遅れて作用するCYなど一般的なアルキル化剤のDNA傷害を相乗的に増強すると考えられる。

これらの機序によってBDMは通常拮抗的に働く各種抗腫瘍薬と優れた併用効果を示すと考えられる。

5 結論

BDMは核酸輸送体によって促進的に細胞内に輸送され、分解による殺細胞効果減少を回避

し、他のアルキル化剤より早期に強い DNA 傷害応答・細胞周期変化・アポトーシスを誘導する。さらに BDM は核酸輸送体の発現を誘導し、自己および Ara-C などの核酸類似体の細胞内移行を促進し、殺細胞効果を増強する。BDM は HDAC3、SIRT1、SIRT7 を分解し、ヒストンアセチル化を誘導する。BDM は、HDAC 分解作用によって、HDAC 阻害剤および CY の殺細胞効果を増強する。

論文審査の結果の要旨

ベンダムスチン (BDM) は、その構造からアルキル化作用と代謝拮抗作用を併せ持つ薬剤として開発され、1960 年代からリンパ腫治療に用いられてきた。近年になり、アルキル化剤・代謝拮抗薬耐性の血液腫瘍にも有効性を示し、単剤で従来の標準併用化学療法と同等の治療効果を示すが報告され、新たな治療選択として注目されている。しかし、その有効性を十分に説明可能な作用機序は明らかになっていない。本研究において、申請者らは、BDM の構造特異性に注目し、その作用機序について解析した。

1) 核酸類似構造に着目し、核酸輸送体を介した BDM の細胞内輸送について検討したところ、BDM は核酸輸送体を介し細胞内に移行した。2) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤に共通する短鎖脂肪酸側鎖に着目し、BDM の HDAC 阻害作用について検討したところ、BDM により HDAC3、SIRT1、SIRT7 の分解が誘導され、ヒストンアセチル化、特に H3K18 アセチル化が強くみられた。これに伴い、ヒストン H3 の細胞質内での発現が増加した。3) BDM は核酸輸送体の発現を誘導し、BDM を Ara-C に先行投与した場合、相乗効果が得られた。また、BDM は HDAC 阻害剤ロミデプシンによるヒストンアセチル化を相加的に増強し、BDM によって分解される HDAC3 をノックダウンすると、BDM の殺細胞効果は減弱した。

本研究は、BDM の臨床応用における重要な裏付けとなる有意義なものである。本論文の内容はすでに国際英文誌である Blood Cancer Journal 誌に publish されている。以上より本論文は、博士 (医学) の学位に十分な quality を有していると考えられた。しかし、学位論文表題は「新規抗腫瘍薬ベンダムスチンの作用機序の解明」であるが、マウスモデルではシクロフォスファミドと HDAC 阻害剤の結果が示されており、研究内容との解離が見られ、修正が必要と考えられる。また「BDM 感受性とアセチル化に相関がみられる」とは言えないという指摘があった。以上の点を修正した改訂版を委員全員が確認し、論文審査合格とした。

最終試験の結果の要旨

発表は学位論文に準じて行われた。発表は明快で、大変に分かりやすく、時間もほぼ予定どおりであった。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめたとおりである。

申請者と審査委員の間で次のような質疑応答がなされた。

1. マウスモデルでは、シクロフォスファミドとではなくベンダムスチンと、ロミデプ

シンの併用を検討すべきではないか？

⇒その併用を試みたが、毒性が強くマウスが死に有意な結果が得られなかった。投与量など再検討をする。

2. HBL-2 のシクロフォスファミドやクロラムブシルに対する感受性はどうか？

⇒HBL-2 のシクロフォスファミドとクロラムブシルに対する IC50 はそれぞれ、1 μ M と 4 μ M で、感受性はある。

3. Chk1 や Chk2 が増加してチェックポイントが活性化した際に、G2/M 期ではなく S 期の増加を認めるのが通常か？

⇒G2/M 期の増加、S 期の増加ともに報告がある。

4. 図 14 の結果からは、アセチル化とベンダムスチンに対する感受性との相関が示唆されたと言えるか？

⇒ベンダムスチンによって、ベンダムスチン高感受性の 2 つの細胞株ではアセチル化を認めたが、低感受性の 2 つの細胞株のうち 1 株ではアセチル化が誘導されなかった。確かに、「相関」と言う文言は例数が少なく適切ではない。

5. Steel-Peckham 法と Chou-Talalay 法との使い分けはどのように行ったのか？

⇒どちらの方法も使われており、特に恣意的に使い分けただけではない。実験指導者の関連で、このようになった。

6. HDAC とプロテアソームインヒビターとの併用はよく言われているが、ベンダムスチンとプロテアソームインヒビターの併用は試みたか？

⇒理論上は効果があると考えられるが、別の実験者が骨髄腫の細胞株で実験しており、今回は試行していない。

7. HDAC 阻害剤とベンダムスチンのどちらを先行投与するのがより効果的と考えられるか？

⇒その実験はやっていないが、HDAC 阻害剤によりクロマチンが緩んだところに、アルキル化剤が作用すると相乗効果が得られると考えられる。

以上からわかるように、申請者は自己の研究テーマに関して深い学識を有し、いずれの質問に対しても的確に返答している。発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質・能力を有することは明らかで、医学博士号を受けるに値すると審査員全員が判断、最終試験に合格とした。