

## 論文の要旨

申請者 磯野 誠

### 研究論文題目

腎癌細胞に対する小胞体ストレスを標的とした新規治療開発に関する研究

### 1 目的

進行あるいは再発した腎癌に対する根治的な治療法は現在のところ存在しない。近年、チロシンキナーゼ阻害薬や mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害薬といった分子標的治療薬が広く使用されており、進行腎癌の治療成績を改善しているが、完全寛解に至ることは非常にまれである。故に、より効果的な治療法を開発することは必須であり、新規の治療経路や薬剤を用いて新しいアプローチによる治療法を探究することが必要であると考えられる。

細胞内で立体構造が壊れ機能異常を来した異常蛋白は、分子シャペロンにより修復される。この修復が失敗した場合、これらの異常蛋白はユビキチンを目印として付加された後にプロテアソームで分解される。これが細胞の蛋白恒常性維持機構であるユビキチン-プロテアソーム経路である。ここで、異常蛋白が細胞内に蓄積されると、小胞体ストレスが誘導され、アポトーシス経路が活性化して細胞死が起こる。つまり、癌細胞内で異常蛋白を効率的に蓄積できれば効果的に癌細胞を死滅できることになる。

そこで、私は、分子シャペロンとプロテアソームを同時に阻害することで、細胞内に異常蛋白を蓄積し、小胞体ストレスを誘導できると仮定し、研究を行った。

### 2 対象並びに方法

腎癌培養株 769-P、786-O、Caki-2、Renca を用いて、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬 belinostat と HIV protease 阻害薬 ritonavir の併用、および ritonavir と新規プロテアソーム阻害薬 delanzomib の併用を行った。

- (1) Cell viability は MTS assay で、コロニー形成阻害能は colony formation assay で検討した。
- (2) アポトーシスの誘導および細胞周期の変化は flow cytometry で解析した。
- (3) マウス皮下腫瘍モデルを作成し、*in vivo*における検討を行った。
- (4) 小胞体ストレス誘導、オートファジー誘導、細胞周期および mTOR 関連蛋白の発現の変化を western blot 法で検討した。

### 3 結果

- (1) Belinostat と ritonavir の併用、および ritonavir と delanzomib の併用は、相乗的に腎癌細胞増殖を抑制し (combination index < 1)、有意にコロニー形成を阻害した。
- (2) 併用投与により、cyclin D1 および cyclin-dependent kinase 4 の発現は抑制され、細胞周期における sub-G1 分画の細胞数は増加した。更に、併用投与により Annexin V 陽性細胞数が著明に増加し、アポトーシスの誘導が示された。この併用により惹起されたアポトーシスは、カスパーゼ阻害薬である Z-VAD-FMK を用いた検討により、カスパーゼ依存性と考えられた。
- (3) *In vivo*においては、ritonavir と delanzomib の併用投与は、マウスの皮下腫瘍の増大を有意に抑制した。
- (4) 併用投与により、glucose-regulated protein 78、endoplasmic reticulum resident protein 44、endoplasmic oxidoreductin-1-like protein といった小胞体ストレスマーカーの発現が増加し、相乗的な小胞体ストレスの誘導が示された。
- (5) 一方で、ritonavir と delanzomib の併用投与により、オートファジーのマーカーである light chain 3-II の発現が増加し、併用投与がオートファジーも誘導していることが示された。大変興味深いことに、我々は併用投与が mTOR の発現を抑制すること、および mTOR 抑制作用を有する AMP-activated protein kinase および sestrin 2 の発現を増加することを発見した。この mTOR 経路の抑制は、併用療法によるオート

ファジー誘導をよく説明しており、小胞体ストレス誘導と共に重要な作用メカニズムと考えられた。

#### 4 考 察

Belinostat は、HDAC6 をアセチル化することで分子シャペロンを阻害する作用を持つ。一方、ritonavir は、分子シャペロンとプロテアソームを阻害する。従って、両者の併用により異常蛋白が蓄積し、小胞体ストレスが誘導されることが考えられた。また、ritonavir はプロテアソームのみならず分子シャペロンも阻害する作用を有するため、delanzomib との併用が異常蛋白を蓄積し、小胞体ストレスを誘導すると考えられた。

#### 5 結 論

分子シャペロンとプロテアソームの同時阻害は、効率的に小胞体ストレスを誘導し、腎癌細胞を死滅させることが示された。本研究における小胞体ストレスの誘導には、臨床的に使用可能な薬剤のみを用いており、これら併用療法の将来的な臨床応用が期待される。