

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

磯野 誠

(泌尿器科学専攻)

防衛医科大学校

平成29年度

目次

第 1 章 緒言	1 頁
第 2 章 腎癌細胞における新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 belinostat と HIV protease 阻害薬 ritonavir の併用	
第 1 節 背景	4 頁
第 2 節 対象および方法	5 頁
第 3 節 結果	9 頁
第 4 節 考察	12 頁
第 5 節 小括	15 頁
第 3 章 腎癌細胞における HIV protease 阻害薬 ritonavir と新規プロテアソーム 阻害薬 delanzomib の併用	
第 1 節 背景	16 頁
第 2 節 対象および方法	17 頁
第 3 節 結果	21 頁
第 4 節 考察	24 頁
第 5 節 小括	27 頁
第 4 章 考察	28 頁
第 5 章 結論	30 頁

謝辞 31 頁

引用文献 32 頁

図 39 頁

第1章 緒言

腎細胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) は、成人における悪性腫瘍のうち、およそ 3% を占めており、その罹患率および死亡率は世界規模で年々2-3%の割合で増加傾向にある^{1,2)}。RCC 患者の 25-30%は、診断時にすでに転移病巣を有すると報告されている¹⁾。転移を有する RCC に対しては 2005 年以降、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いるが³⁾、完全寛解に至ることは非常にまれであり⁴⁾、転移を有する RCC 患者の全生存期間の中央値は 26.4 か月に留まっている⁵⁾。つまり、現在までのところ、進行した RCC に対して治癒的な効果を期待できる治療法は存在しないのが現実である。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える。

進行癌に対して現在広く使用されている分子標的薬は、特定の分子あるいはシグナル伝達経路を標的として、それらを特異的に阻害する作用機序を有する薬剤である。しかし、当然のことながら、癌細胞には未だ解明されていないものも含めて、無数のシグナル伝達経路が存在することが考えられ、ある特定の分子あるいはシグナル伝達経路を阻害することでは癌の根治は不可能であると考ええる。今回私は、従来とは異なった視点から癌治療へのアプローチ方法を見直し、その結果、以下のような小胞体ストレスを標的にした癌治療に注目した。

一般に、細胞内において立体構造が壊れて機能異常を来した変性タンパクは、熱ショックタンパク (heat shock protein, HSP) などの分子シャペロンによって修復される。この修復が失敗した場合、通常これらの変性タンパクはユビキチンを目印として付加され

(ユビキチン化タンパク)、その後プロテアソームによって認識され分解される⁶⁾。これをユビキチン-プロテアソーム経路と呼び、細胞内のタンパクの恒常性維持に重要な役割を果たしている(図 1A)。小胞体は、そもそも細胞内構造物のひとつであるが、多くの細胞内タンパクの折りたたみや成熟を担っており、種々の重要なタンパクの機能維持にとって必要不可欠である⁷⁾。また、小胞体は、細胞内におけるタンパク恒常性の維持、特に変性タンパクの処理において主要な役割を果たしている⁸⁾。つまり、小胞体内では、変性タンパクが細胞内に過度に蓄積されないうちに適切に処理されるようにユビキチン-プロテアソーム経路が働いて細胞内タンパク量を調節し、それによって細胞内のタンパク恒常性が維持されている^{7,9)}。しかしながら、変性タンパクが細胞内で過剰に蓄積し、それらが適切に処理されきれずに細胞内での調節が破綻してしまった場合には、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とされる¹⁰⁾。そこで私は、この理論を腎癌細胞に対する新しい治療アプローチとして応用できるのではないかと考えた。つまり、腎癌細胞内で変性タンパクを過剰に蓄積させ、効率的に小胞体ストレスを誘導することができれば、効果的に腎癌細胞を死滅できると考えた訳である。

ユビキチン-プロテアソーム経路に作用する抗腫瘍薬のひとつにプロテアソーム阻害薬がある。その作用機序は、細胞内でプロテアソームを阻害することでユビキチン化タンパクの分解を妨げ、アポトーシスを誘導することである¹¹⁾。しかしながら、進行腎癌に対する第2相臨床試験では、その効果は限定的なものであると報告されている¹²⁾。そこで私は、プロテアソーム阻害作用のある薬剤を単剤で用いるのではなく、他の薬剤と併用することによって、腎癌細胞内により効率的に変性タンパクを蓄積すること

ができると考えた。具体的には、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、腎癌細胞内に過剰な変性タンパクを蓄積させ、小胞体ストレスを誘導できると仮定した（図 1B）。

まず第 2 章では、併用する薬剤として新規ヒストン脱アセチル化酵素（histone deacetylase, HDAC）阻害薬 belinostat と HIV protease 阻害薬 ritonavir を選択し、腎癌細胞に対しての抗腫瘍効果について検討を行った。次いで第 3 章では、ritonavir と新規プロテアソーム阻害薬 delanzomib の併用についての検討を行った。

第2章 腎癌細胞における新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 belinostat と HIV protease 阻害薬 ritonavir の併用

第1節 背景

Belinostat は、再発性の末梢性 T 細胞リンパ腫に対する治療薬として米国食品医薬品局で承認を受けている新規 HDAC 阻害薬である¹³⁾。Belinostat は、HDAC6 を阻害し、HSP90 などの分子シャペロンの機能を抑制することによって、細胞内の変性タンパクを増加させると考えられている¹⁴⁾。一方、ritonavir は HIV protease 阻害薬であり、HIV に感染した患者の治療において世界中で広く使用されている薬剤である。Ritonavir は多様な機能を有し、その中のひとつとしてプロテアソーム阻害作用を持つこと¹⁵⁾、また、HSP90 の機能を抑制することで細胞内の変性タンパクを増加させることも報告されている¹⁶⁾。

本研究で私は、腎癌細胞に対して、これらの臨床的に使用可能な 2 剤を併用した実験を行った。Belinostat と ritonavir の併用によって、HSP90 の機能が相乗的に抑制され、また ritonavir のプロテアソーム阻害作用によって細胞内に変性タンパクが蓄積されることで小胞体ストレスおよびアポトーシスが誘導されると考えた（図 2）。

第2節 対象および方法

(1) 細胞培養

腎癌細胞株 (769-P、786-O、Caki-2) は、American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) から購入した。それらの細胞株は、10% ウシ胎児血清および 1% ペニシリン・ストレプトマイシン (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を含む Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) あるいは McCoy's 5A medium を用いて、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

(2) 薬剤

Belinostat は Selleck Chemicals (Houston, TX, USA) から購入し、ritonavir は Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada) から購入して、dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。カスパーゼ阻害薬である Z-VAD-FMK、および小胞体ストレス誘導薬である tunicamycin は Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA) から購入した。Tunicamycin は蒸留水に溶解した。これらの薬剤は-20°C で保存した。

(3) 細胞増殖能の評価

細胞増殖能を CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, Madison, WI, USA) を用いた MTS アッセイで評価した。細胞を 96 ウェルプレートに 5×10^3 細胞/ウェルで 24 時間前培養し、5 μ M belinostat、10–50 μ M ritonavir で処理し、48 時間引き続き培養した。その後、CellTiter 96® AQueous One Solution を培地で希釈 (CellTiter 96® AQueous One

Solution 4 ml に対して培地 21 ml) し、それぞれのウェルに加えてから 30 分後に、マイクロプレートリーダーを用いて、490 nm の波長で吸光度を計測した。それぞれのグループにおいて 6 ウェルずつ使用し、吸光度の平均値を評価した。

(4) コロニー形成能の評価

細胞を 6 ウェルプレートに 1×10^2 細胞/ウェルで 24 時間前培養し、5 μ M belinostat、10–50 μ M ritonavir を添加した。添加後に引き続き 48 時間培養した後、培養液を交換し、そのまま 1–2 週間培養を継続した。コロニーは phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した後、100%メタノールで固定した。ギムザ染色を行い、それぞれの処理群のコロニー数を計測した。実験は、各条件で 3 ウェルずつ行い、コロニー数の平均値を評価した。

(5) フローサイトメトリー

細胞周期の変化とアポトーシスの評価は、フローサイトメトリーを用いて行った。腎癌細胞を 6 ウェルプレートに 1.5×10^5 細胞/ウェルで 24 時間前培養し、5 μ M belinostat、および 10–50 μ M ritonavir の添加後に引き続き 48 時間培養した。その後、PBS で洗浄してからトリプシンを用いて細胞をはがして回収した。細胞周期解析には、回収された細胞を PBS で洗浄した後 propidium iodide (PI) で核染色し、Cell Quest Pro Software (BD Biosciences, San Jose, CA, US) を用いて各細胞周期に属する細胞数の計測を行った。またアポトーシスの評価には、回収された細胞を PBS で洗浄した後に

Annexin V Apoptosis Detection Kit (Beckman Coulter, Marseille, France)を用いて、Annexin V で染色を行い、フローサイトメーターで Annexin V 陽性細胞の蛍光強度を計測した。各条件で 10,000 個の細胞について計測を行った。さらに併用投与によって誘導されるアポトーシスがカスパーゼ依存性であるかどうかを調べるため、カスパーゼ阻害薬である Z-VAD-FMK を用いて実験を行った。Belinostat と ritonavir の併用投与に 40 μ M Z-VAD-FMK を加えたグループと加えないグループに分けて 48 時間培養し、フローサイトメーターを用いて Annexin V 陽性の蛍光強度計測し、併用投与におけるカスパーゼの影響について評価した。各条件で 10,000 個の細胞について計測を行った。

(6) Western blot 法

Belinostat と ritonavir の併用投与によるタンパク発現の変化は western blot 法を用いて評価した。腎癌細胞を 10 cm プレートに 3.0×10^6 細胞/プレートで 24 時間前培養し、5 μ M belinostat、および 10–50 μ M ritonavir を添加し、引き続き 48 時間培養した。その後、PBS で洗浄し、radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 50 mM NaF, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4)を加え、30 分氷上に静置した後にタンパクを抽出した。それぞれの投与グループのタンパク濃度を Lowry 法で測定した後、同量のタンパクを 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis で分離し、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA) に転写した。次いで、Tris-buffered saline (TBS)に Tween 20 を 0.1%の濃度 (weight/volume) で加えたもの (TBS-T) を作成し、5%スキムミルクを含む TBS-T で非特異的な抗体の結合に対するブロッキングを 60 分

間室温で行った後、1 次抗体を加え、4°C で一晩反応させた。2 次抗体は、それぞれの 1 次抗体に応じて、horseradish-tagged secondary antibodies (Rabbit IgG, 1:5000, Bio-Rad)もしくは horseradish-tagged secondary antibodies (Mouse IgG, 1:5000, Bio-Rad)を使用し、室温で 60 分間反応させた。その後に TBS-T でニトロセルロース膜を 10 分間、3 回洗浄し、ECL Plus system (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA)を用いて目的とするバンドを可視化した。

本実験で使用した 1 次抗体は、抗 acetylated histone H3 抗体 (1:3000, Abcam, Cambridge, UK)、抗 cyclin D1 抗体、抗 glucose-regulated protein (GRP) 78 抗体、抗 HDAC1 抗体、抗 HDAC2 抗体、抗 HDAC3 抗体、抗 HDAC6 抗体 (1:400, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、抗 cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 抗体、抗 endoplasmic oxidoreductin-1-like protein alpha (Ero1-L α) 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) および抗 β -actin 抗体 (1:3000, Millipore, Billerica, MA, USA) である。

(7) 統計学的解析

Belinostat と ritonavir の併用効果が相乗的であるかを評価するため、MTS アッセイの結果について CalcuSyn software (Biosoft, Cambridge, UK)を用いて combination index (CI) を計算した。コロニー形成アッセイにおいては、全群間に全く差がないか否かの仮説を一元配置分散分析で検定した後、併用投与グループとの差を Mann-Whitney U test (StatView software; SAS Institute, Cary, NC, USA)で検定した。P < 0.05 をもって有意な差とした。

第3節 結果

(1) 小胞体ストレスの誘導により腎癌細胞の増殖能は抑制された

腎癌細胞に対して、小胞体ストレスの誘導が細胞増殖抑制効果を有するかを調べるため、腎癌細胞株に tunicamycin を添加して 48 時間培養し、MTS アッセイで細胞増殖能を評価した。Tunicamycin は N-グリコシル化阻害薬であるが、変性タンパク反応を引き起こし小胞体ストレスの誘導薬として広く使用されている薬剤である¹⁷⁾。Tunicamycin を加えることにより、濃度依存的に腎癌細胞の増殖は抑制された (図 3)。

(2) Belinostat と ritonavir の併用によって腎癌細胞の増殖能は相乗的に抑制された

MTS アッセイでは、belinostat と ritonavir の併用、特に 5 μ M belinostat と 50 μ M ritonavir の併用時に腎癌細胞の増殖が効果的に抑制されることが示された (図 4A)。光学顕微鏡所見では、併用投与を行ったグループでは大多数の細胞が死滅して浮遊しており、各々の単剤を添加したグループと比較してもその差は著明であった (図 4B)。Chou-Talalay method を用いて CI を計算し¹⁸⁾、併用効果が相乗的であるか否かを調べたところ、5 μ M belinostat と 50 μ M ritonavir の併用効果は相乗的もしくは相加的であることが分かった (表 1; CI < 1 である場合は相乗効果があり、値が小さいほど相乗効果が強いことを示している。CI の値が 1 前後の場合は相加効果があることを示している)。私はさらに、belinostat と ritonavir の併用が腎癌細胞の長期増殖能に与える影響について、コロニー形成能を評価することで調べた。併用投与によって、腎癌細胞のコ

ロニー形成能は有意に抑制され（図 4C; *P < 0.05）、belinostat と ritonavir の併用は効果的に腎癌細胞の長期増殖能を抑制することが示された。

（3）Belinostat と ritonavir の併用によってアポトーシスが誘導された

Belinostat と ritonavir の併用による細胞周期の変化をフローサイトメトリーで細胞周期解析を行い、評価した。今回用いたすべての細胞株で、belinostat および ritonavir 各々の単剤で処理することによって sub-G1 分画の細胞数は増加したが、それらは併用によってさらに増加した（図 5A）。さらに belinostat と ritonavir の併用によって cyclin D1 の発現が著明に減少しており（図 5B）、このことは併用投与によって細胞周期が抑制されたことを裏付ける結果となった。

Belinostat と ritonavir の併用投与は、cleaved PARP の発現を増加し（図 6A）、また、Annexin V アッセイでは、Annexin V 陽性細胞数の著明な増加が確認された（図 6B）。細胞周期解析における sub-G1 分画の細胞数の増加と合わせて評価するに、belinostat と ritonavir の併用によってアポトーシスが著明に誘導されていることが示された。

私はさらに、併用投与によって誘導されるアポトーシスがカスパーゼ依存性であるかを調べた。786-O 細胞および Caki-2 細胞においては、カスパーゼ阻害薬 Z-VAD-FMK を付加して培養したところ、併用投与による Annexin V 陽性細胞数は減少した。他方で、769-P 細胞においては、Z-VAD-FMK の付加によって、併用投与による Annexin V 陽性細胞数は増加した（図 6C）。769-P 細胞において、Z-VAD-FMK の付加により Annexin V 陽性細胞数が増加した理由は不明であるが、少なくとも 786-O 細胞および

Caki-2 細胞においては、本併用によって誘導されるアポトーシスはカスパーゼ依存性であることが明らかとなった。

(4) Belinostat と ritonavir の併用によって小胞体ストレスが誘導された

次に、小胞体ストレスのマーカーである GRP78 や Ero1-L α の発現の変化を調べることとで、併用投与が小胞体ストレスを誘導しているかを評価した (図 7)。すべての細胞株において、50 μ M ritonavir の添加によって、小胞体ストレスの主な調節因子である GRP78 の発現は増加し、つまり ritonavir 単剤でも小胞体ストレスが誘導されることが示された。他方で、5 μ M belinostat 単剤処理では、769-P 細胞と 786-O 細胞において GRP78 の発現が増加することが観察された。予想通り、すべての細胞株において GRP78 は、5 μ M belinostat と 50 μ M ritonavir による併用を行ったときに最も強く発現した。769-P 細胞と 786-O 細胞においては、Ero1-L α の発現についても同様の結果を得られた。以上より、腎癌細胞において、belinostat と ritonavir の併用投与は小胞体ストレスを効果的に誘導することが示唆された。

(5) Belinostat と ritonavir の併用によってヒストンのアセチル化が増強された

Belinostat は HDAC 阻害薬であることを考慮し、私は併用投与によるヒストンのアセチル化についても調べた。Belinostat 単剤処理により、ヒストンのアセチル化は増加したが、驚くべきことに、併用投与によって、このアセチル化はさらに増強した (図 8A)。この作用機序を調べるため、次に私はヒストンのアセチル化を制御する HDAC

の発現の変化についても評価を行った。Belinostat と ritonavir の併用投与は、HDAC 自体の発現を減少させており（図 8B）、このことが併用投与によるヒストンアセチル化の増強メカニズムのひとつと考えられた。

第 4 節 考察

本研究は、belinostat と ritonavir の併用が進行性腎癌に対する治療法として有用である可能性を示したものである。

ヒストンアセチル化および脱アセチル化は、クロマチン構造の調整において必須である¹⁹⁾。ヒストンのアセチル化はエピジェネティックな遺伝子の制御において重要な役割を担っている。一般的に、ヒストンのアセチル化によってヒストンと DNA 間の結合は部分的に弱まり、その結果転写活性が高まるとされるが、逆にヒストン脱アセチル化の場合はヒストンタンパクへの DNA の結合が強まり転写が抑制されるとされている²⁰⁾。ヒストンアセチル化の程度は、histone acetyltransferase および HDAC の均衡によって調整されている。HDAC はまた、ヒストン以外のタンパクの脱アセチル化にも関与しているとされ、それらのタンパクの機能を活性化あるいは阻害するとされる²¹⁾。

HDAC が標的としているタンパクの中には、転写因子、転写調節因子、DNA 転写酵素、核輸送タンパク、そして分子シャペロンなども含まれている²²⁾。つまり、HDAC 阻害薬で治療することによって、分子シャペロンの機能は抑制されることになり、その結果細胞内の変性タンパクの修復が阻害され、変性タンパクの蓄積が促されることが考えられる。具体的には、HDAC6 を阻害することで HSP90 などの分子シャペロンがアセ

チル化され、その機能が抑制されることが報告されている¹⁴⁾。HDAC 阻害薬の詳細な作用機序はいまだ不明な部分も多いが、HDAC を標的にした薬剤は多くの作用効果を持ち、*in vitro* および *in vivo* において細胞増殖能を抑制することや分化およびアポトーシスを誘導する可能性が報告されている^{23, 24)}。

Belinostat もまた、エピジェネティックな制御にかかわる新規 HDAC 阻害薬であり²⁵⁾、HDAC6 の抑制を介して HSP90 等の分子シャペロンの機能を抑制するとされる²⁶⁾。初期の全身治療が奏功しなかった抵抗性あるいは再発性の末梢性 T 細胞リンパ腫 (peripheral T-cell lymphoma, PTCL) や皮膚 T 細胞性リンパ腫 (cutaneous T cell lymphoma, CTCL) の患者を対象とした臨床第 2 相試験では、belinostat の奏功率はそれぞれ PTCL で 25%、CTCL で 14%であった²⁷⁾。しかしながら、固形癌に対しての HDAC 阻害薬単剤による治療効果は限定的であることが報告されており、単剤で使用するよりも化学療法、分子標的薬、放射線治療などとの併用が望ましいとされる²⁸⁾。

Ritonavir は HIV protease 阻害薬として広く使用されている薬剤であるが、近年その抗腫瘍効果が注目されている。その作用機序は多岐にわたり、Akt 経路の抑制作用²⁹⁾、nuclear factor-kappa B (NF-κB)の抑制作用³⁰⁾、HSP90 の抑制作用¹⁶⁾、プロテアソームの阻害作用¹⁵⁾ などが報告されている。私たちの研究グループも以前、ritonavir を HSP90 の阻害薬である 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin と併用で投与した場合に、HSP90 の転写因子である heat shock factor 1 の発現が減少して腎癌細胞の増殖が抑制されることを示し、HSP90 の抑制が腎癌増殖の抑制に重要であることを報告している³¹⁾。

私は本研究を開始するにあたり、HDAC 阻害薬と ritonavir を併用することにより細胞内に効果的に変性タンパクが蓄積され、小胞体ストレスが誘導され则认为した。私たちの研究グループは実際、HDAC 阻害薬 suberoylanilide hydroxamic acid と ritonavir の併用が腎癌細胞に対して致死的効果を有することを示したが³²⁾、その研究においては小胞体ストレス誘導について示しておらず、また作用機序も不明であった。さらに、私たちの知りうる限りでは、belinostat と ritonavir の併用効果についてはどの癌細胞においても調べられていない。上記で示した通り、belinostat と ritonavir の併用は、多くの濃度条件下でアポトーシスを誘導し、相乗的に腎癌細胞の増殖を抑制した。予想した通り、併用投与によって GRP78 や Ero1-L α などの小胞体ストレスマーカーの発現が増加し、腎癌細胞において小胞体ストレスが誘導されていることが示された。Ritonavir 単剤でも小胞体ストレスは誘導されており、このことは、ritonavir の作用機序と考えられるプロテアソームの阻害作用¹⁵⁾や HSP90 の阻害作用¹⁶⁾に矛盾しない結果であった。本併用投与では、belinostat と ritonavir の併用によって、さらに HSP90 が抑制され¹⁴⁾、変性タンパクの修復が阻害されることで細胞内に蓄積し、小胞体ストレスの誘導が亢進したものと思われた。また小胞体ストレス誘導以外にも、変性タンパクが過剰に蓄積することは、それ自体が癌細胞にとって毒性を持つと報告されており³³⁾、この蓄積そのものも併用投与における重要な作用機序と考えられた。本研究結果はまた、腎癌細胞の増殖抑制における小胞体ストレスの重要性を示してきた、これまでの私たちグループの研究結果にも矛盾しないものである^{34, 35)}。

Ritonavir との併用は、belinostat によって引き起こされたヒストンアセチル化を増強する結果となった。上述のように、ヒストンアセチル化は癌細胞の増殖抑制を引き起こ

すエピジェネティックな機序のひとつであり³⁶⁾、併用投与のもうひとつの重要な作用機序であると考えられる。さらに、belinostat と ritonavir の併用によって HDAC の発現そのものが減少しており（図 8B）、併用投与がヒストンアセチル化を促進するメカニズムのひとつと考えられた。しかしながら、併用により HDAC の発現が減少した機序については、本研究においては明らかではない。

調べうる限りでは、本研究は、belinostat と ritonavir の併用投与が腎癌細胞に対して効果的な抗腫瘍効果を持つことを示した初めての研究である。本併用の作用機序は、小胞体ストレス誘導およびヒストンアセチル化という、従来行われてきた治療とは全く異なるものであり、従って、これまでの治療に抵抗性のある進行腎癌の患者にも有効である可能性がある。本併用投与の問題点としては、ritonavir が薬物代謝酵素である CYP3A4 を阻害する作用を有するため³⁷⁾、肝臓での代謝を阻害することで血中の belinostat の濃度を上昇させる可能性が挙げられる。臨床応用のためには、第 1 相試験で注意深く薬剤濃度の安全域を設定する必要がある。

第 5 節 小括

Belinostat と ritonavir の併用は、腎癌細胞において小胞体ストレスとヒストンアセチル化を誘導し、相乗的に細胞増殖を抑制した。

第3章 腎癌細胞における HIV protease 阻害薬 ritonavir と新規プロテアソーム阻害薬 delanzomib の併用

第1節 背景

前章においても取り上げた小胞体ストレス誘導の概念は、一部の癌に対する治療法としてすでに臨床応用されている³⁸⁾。この章では、腎癌細胞において HIV protease 阻害薬である ritonavir にプロテアソーム阻害薬を併用して小胞体ストレスを誘導する方法について報告する。Ritonavir は第2章の考察で述べたように、プロテアソーム¹⁵⁾と HSP90¹⁶⁾を抑制することが報告されている。つまり、ritonavir を添加することによって、細胞内では分子シャペロンの機能が抑制され、変性タンパクが正常構造に修復されることなく増加し、同時に、プロテアソーム阻害により、それらの分解が抑制され、細胞内に蓄積されることが考えられる。しかしながら、ritonavir 単剤のみの投与では腎癌細胞に対する抗腫瘍効果は限定的であり、その一因として、ritonavir がプロテアソームを完全に阻害することができないため、一部の増加した変性タンパクがユビキチン化された後にプロテアソームによって分解されてしまい、十分な蓄積が得られないことが考えられた。そこで私は、ritonavir にプロテアソーム阻害薬を併用することを着想した。Delanzomib (CEP-18770) は新規のプロテアソーム阻害薬であるが、他の固形癌や多発性骨髄腫の患者における臨床第1相試験が終了し、安全性が確認された薬剤である³⁹⁾。私は、ritonavir に delanzomib を併用することで、プロテアソームが完全に阻害され、ritonavir によって増加した変性タンパクが効率的に腎癌細胞内に蓄積されると仮定した（図

9)。本研究では、ritonavir と delanzomib の併用が *in vitro* および *in vivo* において腎癌細胞の増殖を抑制するかを調べ、さらにその作用機序についても分析した。

第2節 対象および方法

(1) 細胞培養

ヒト腎癌細胞株 (769-P、786-O、Caki-2) およびマウス腎癌細胞株 Renca は、American Type Culture Collection から購入した。細胞株は、10% ウシ胎児血清および 1% ペニシリン・ストレプトマイシン (Invitrogen) を含む RPMI medium あるいは McCoy's 5A medium を用いて、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

(2) 薬剤

Ritonavir は Toronto Research Chemicals から購入し、delanzomib は Selleck Chemicals から購入して、DMSO に溶解した。カスパーゼ阻害薬である Z-VAD-FMK は Enzo Life Sciences から購入した。これらの薬剤は使用するまで -20°C で保存した。

(3) 細胞増殖能の評価

細胞増殖能を CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega) を用いた MTS アッセイで評価した。細胞を 96 ウェルプレートに 5×10^3 細胞/ウェルで 24 時間前培養し、25–50 μ M ritonavir と 10–50 nM delanzomib で処理した後、引き続き 48 時間培養した。第2章で述べたのと同様の方法で MTS アッセイを行い、評価した。

(4) コロニー形成能の評価

細胞を 6 ウェルプレートに 1×10^2 細胞/ウェルで 24 時間前培養し、50 μ M ritonavir および 25 nM delanzomib の添加後に引き続き 48 時間培養した。48 時間培養後は、培養液を交換し、10 日間培養を継続した。第 2 章で述べたのと同様の方法で処理を行い、ギムザ染色液で染色した後にコロニー数を計測した。

(5) フローサイトメトリー

細胞周期の変化とアポトーシスの評価は、フローサイトメトリーを用いて行った。細胞を 6 ウェルプレートに 1.5×10^5 細胞/ウェルで 24 時間前培養し、50 μ M ritonavir と 50 nM delanzomib で処理した後に 48 時間引き続き培養した。その後、PBS で洗浄し、トリプシンを用いて細胞を回収した。細胞周期解析は、第 2 章で述べたのと同様の方法で行った。またアポトーシスの評価には、回収された細胞を Annexin V Apoptosis Detection Kit (Beckman Coulter)を用い、Annexin V と 7-AAD による二重染色を行った後にフローサイトメーターで Annexin V 陽性細胞数を計測した。Ritonavir と delanzomib の併用投与によって誘導されるアポトーシスがカスパーゼ依存性であるかどうかを調べるため、ritonavir と delanzomib の併用にカスパーゼ阻害薬である Z-VAD-FMK を 40 μ M の濃度で付加したグループと付加しないグループに分けて 48 時間培養し、フローサイトメーターで Annexin V 陽性細胞数を計測した。

(6) マウス皮下腫瘍モデルを用いた実験

動物実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った（承認番号：14068）。5 週齢、平均体重 20 g の雄ヌードマウス（BALB/c Slc-nu/nu）は CLEA (Tokyo, Japan) から購入した。Renca 細胞（ 1×10^7 cells）を、マウスの背部に皮下注射した。薬剤投与は注射 5 日後から開始し、投与開始日を day 1 とした。実験を始めるにあたり、マウスを無作為に 4 グループに分け、それぞれのグループが 5 匹ずつになるようにした。コントロールグループは DMSO を腹腔内注射し、その他のグループはそれぞれ ritonavir (15 mg/kg)、delanzomib (30 μ g/kg)、ritonavir と delanzomib の併用の投与を行った。我々は以前、腎癌培養株 Caki-1 を用いたマウス皮下腫瘍モデルで、プロテアソーム阻害薬である bortezomib を 60 μ g/kg で、また、ritonavir を 50 mg/kg で使用した経験がある^{34, 35)}。我々の知り得る限り、これまで delanzomib を用いた動物実験の報告は存在せず、動物実験における至適投与量は不明である。In vitro においては、bortezomib と delanzomib は、ともに近い濃度（nM レベル）で作用するため、in vivo における delanzomib の投与量も bortezomib と同様で良いと考えられるが、本実験では、まず安全性を考慮して、delanzomib の投与量を bortezomib の投与量の 50% に設定した。また、Renca は Caki-1 に比べて ritonavir に対する感受性が高いため、ritonavir の投与量もこれまで使用経験のある投与量の 30% とした。注射は 1 日 1 回、月曜から金曜までの週 5 日で行った。マウスは注意深く観察し、腫瘍径は 2 日おきに計測した。腫瘍体積は、腫瘍長径に短径の 2 乗をかけ、その 2 分の 1 として計算した（腫瘍体積 = $0.5 \times \text{長径} \times \text{短径}^2$ ）。Day 13 に体重、腫瘍径を計測後、マウスを安楽死させた。

(7) Western blot 法

Ritonavir と delanzomib の併用によるタンパク発現の変化は western blot 法を用いて評価した。腎癌細胞を 10 cm プレートに 3.0×10^6 細胞/プレートで 24 時間前培養し、50 μ M ritonavir、および 25–50 nM delanzomib で処理し、引き続き 48 時間培養した。タンパク抽出および western blot 法は第 2 章と同様の方法で行った。

本実験で使用した 1 次抗体は、抗 acetylated histone H3 抗体 (1:3000, Abcam)、抗 cyclin-dependent kinase (CDK4) 抗体、抗 cyclin D1 抗体、抗 GRP78 抗体、抗ユビキチン抗体、抗 sestrin 2 (sesn2) 抗体 (1:400, Santa Cruz Biotechnology)、抗 cleaved PARP 抗体、抗 endoplasmic reticulum resident protein 44 (ERp44) 抗体、抗 Ero1-L α 抗体、抗 Akt 抗体、抗 mammalian target of rapamycin (mTOR) 抗体、抗 phosphorylated mTOR (p-mTOR) 抗体、抗 S6 ribosomal protein (S6) 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology)、抗 AMP-activated protein kinase (AMPK) 抗体 (1:400, ProteinTech Group, Chicago, IL, USA)、抗 light chain (LC) 3 抗体 (1:500, Cosmo Bio, Tokyo, Japan)、および抗 β -actin 抗体 (1:3000, Millipore) である。

(8) 統計学的解析

Ritonavir と delanzomib の併用効果が相乗的であるかどうかを評価するため、MTS アッセイの結果について CalcuSyn software (Biosoft) を用いて combination index (CI) を計算した。コロニー形成アッセイにおいては、全群間に全く差がないか否かの仮説を一元配

置分散分析で検定した後、併用投与グループとの差を Mann-Whitney U test (StatView software; SAS Institute, Cary, NC, USA)で検定した。P < 0.05 をもって有意な差とした。

第3節 結果

(1) Ritonavir と delanzomib の併用により腎癌細胞の増殖能は相乗的に抑制された

MTS アッセイの結果によると、ritonavir (25–50 μ M)と delanzomib (10–50 nM)の併用投与は濃度依存的に腎癌細胞の増殖を抑制した (図 10A)。光学顕微鏡所見では、併用投与により大多数の細胞が死滅して浮遊しており、殺細胞効果は ritonavir 単剤投与や delanzomib 単剤投与と比較すると明らかであった (図 10B)。Chou-Talalay method を用いて CI を計算し¹⁸⁾、併用効果が相乗的であるかを調べたところ、すべての細胞株で 50 μ M ritonavir と 50 nM delanzomib の併用効果は相乗的 (combination indexes < 1) であった (表 2)。私はさらに、ritonavir と delanzomib の併用が腎癌細胞の長期増殖能に与える影響について、コロニー形成能を評価することで調べた (図 10C)。併用投与によって、腎癌細胞のコロニー形成能は著明に抑制された (*P < 0.05)。マウス皮下腫瘍モデルを用いた実験では、ritonavir と delanzomib の併用投与によって腫瘍の増殖は抑制され、単剤投与グループと比較しても腫瘍体積は有意に小さかった (図 10D)。また、どの投与グループにおいても、下痢や体重減少などの明らかな有害事象は認めなかった。

（２）Ritonavir と delanzomib の併用により細胞周期が抑制された

Ritonavir と delanzomib の併用による細胞周期の変化は、フローサイトメトリーで細胞周期解析を行って評価した（図 11A）。今回用いたすべての細胞株で、ritonavir 単剤および delanzomib 単剤の投与は sub-G1 分画の細胞数を増加させたが、併用投与は、この細胞数をさらに増加させた。また ritonavir と delanzomib の併用によって、CDK4 および cyclin D1 の発現が著明に減少し（図 11B）、これは細胞周期解析の結果に矛盾しないものであった。

（３）Ritonavir と delanzomib の併用によりアポトーシスが誘導された

Ritonavir と delanzomib の併用によって cleaved PARP の発現が増加した（図 12A）。また、フローサイトメトリーによる Annexin V アッセイでは、併用投与は Annexin V 陽性細胞数を著明に増加し、アポトーシスの誘導が示された（図 12B）。私はさらに、併用によって誘導されるアポトーシスがカスパーゼ依存性であるかを調べた。769-P 細胞、786-O 細胞、Caki-2 細胞において、ritonavir と delanzomib の併用にカスパーゼ阻害薬 Z-VAD-FMK を付加して培養したところ、annexin V 陽性細胞数は、付加していないものに比べて著明に減少した（図 12C）。すなわち、併用投与によって誘導されるアポトーシスはカスパーゼ依存性であることが示唆された。

（４）Ritonavir と delanzomib の併用により小胞体ストレスが誘導された

予想通り、すべての細胞株において、併用投与を行うことで小胞体ストレスマーカーである GRP78、ERp44 および Ero1-L α の発現が増加し（図 13A）、小胞体ストレスの誘導が示された。私の仮説では、ritonavir 投与によって生じるユビキチン化された変性タンパクは、delanzomib によってプロテアソームによる分解を免れるため、ユビキチン化タンパクの発現は 2 剤の併用によって増加することが予想されていた。しかしながら、腎癌細胞をそれぞれの条件下で 48 時間処理し、ユビキチン化タンパクの発現の変化を調べたところ、769-P、786-O、Caki-2 では、50 μ M ritonavir および 25, 50 nM delanzomib の併用によって、予想に反してユビキチン化タンパクの発現が減少した（図 13A）。併用投与によって起こったユビキチン化タンパク発現の減少について、さらに掘り下げる目的で、私は 50 μ M ritonavir と 50 nM delanzomib を併用して腎癌細胞をそれぞれ 12 時間、24 時間、48 時間培養し、ユビキチン化タンパクの発現を調べた（図 13B）。その結果、興味深いことに、併用投与 12 時間後、24 時間後では時間依存的にユビキチン化タンパクの発現が増加したが、48 時間後では逆に減少した。

（５）Ritonavir と delanzomib の併用により mTOR 経路が阻害されオートファジーとヒストンアセチル化が誘導された

HIV protease 阻害薬は、癌細胞において小胞体ストレスおよびオートファジーを誘導し、mTOR の活性を阻害することが報告されているが⁴⁰⁻⁴²、プロテアソーム阻害薬との併用に関して調べたものは現在のところ存在しない。私は ritonavir と delanzomib 併

用の作用機序をさらに探究する目的で、オートファジーのマーカーである LC3-II 、 mTOR 関連タンパク、およびアセチル化ヒストンの発現の変化を western blot 法で調べた。併用投与により LC3-II の発現は増加し、オートファジーの誘導が示された (図 14A) 。これは、先述のように、併用投与によって細胞内に変性タンパクが過剰に蓄積した結果凝集し、非可溶性分画に移行するという説明にも矛盾しない。なぜなら、凝集したタンパクはオートファジーを誘導し、オートファジーによって分解されるからである⁴³⁾。Akt 、 mTOR、 p-mTOR および mTOR の下流にある S6 の発現は、ritonavir と delanzomib の併用によって減少した (図 14B) 。また、併用投与によって、内因性の mTOR 阻害物質である sesn2 や AMPK の発現が増加しており、これは 2 剤の併用が mTOR 活性を阻害している裏付けとなった。興味深いことに、併用投与によってヒストンのアセチル化も増加した (図 14C) 。

第 4 節 考察

本研究では、HIV protease 阻害薬として広く使用されている ritonavir に、新規プロテアソーム阻害薬である delanzomib を併用することで、腎癌細胞の増殖が効果的に抑制されることを示した。Ritonavir と delanzomib を併用する効果は、GRP78 、 ERp44 および Ero1- α といった小胞体ストレスマーカーの発現が増加していることから、腎癌細胞において変性タンパクを蓄積させ、小胞体ストレスを誘導することに関係していると考えられる。小胞体ストレス反応が過度に活性化された場合、その結果としてアポトーシスが誘導されるため⁴⁴⁾、小胞体ストレス誘導は 2 剤の併用投与における重要な作用機序のひとつと考えられる。悪性細胞は非悪性細胞に比べてベースの小胞体ストレスが高

いことが特徴であり、従って、小胞体ストレスを増加させることは選択的に癌細胞を攻撃できる可能性を有している⁴⁵⁾。

HIV protease 阻害薬 ritonavir は癌の治療薬となりうる可能性を持っている⁴⁶⁾。第2章の考察でも述べた通り、ritonavir が抗腫瘍効果を持つ根拠となる作用機序としては、Akt 経路を阻害する²⁹⁾、NF- κ B を抑制する³⁰⁾、プロテアソームを抑制する¹⁵⁾、HSP90 を抑制する¹⁶⁾ ことなどが挙げられる。しかしながら、ritonavir 単剤ではその抗腫瘍効果は限定的であり、その原因のひとつとして、ritonavir のプロテアソーム阻害作用が不完全なため、一部の増加した変性タンパクがプロテアソームによって分解されてしまい、十分に細胞内に蓄積されないことが考えられた。そこで、私は、ritonavir にプロテアソーム阻害薬を併用することを着想した。プロテアソーム阻害薬である delanzomib は、変性タンパクの分解を阻害する作用を持つ⁴⁷⁾。実際、本研究では ritonavir と delanzomib の併用によって腎癌細胞の増殖能やコロニー形成能は効果的に抑制され、著明なアポトーシス誘導を引き起こす結果となった。

本研究では、ritonavir と delanzomib の併用投与によって、ユビキチン化タンパクの発現は投与後 12 時間、24 時間で時間依存的に増加した。しかしながら、投与後 48 時間では、小胞体ストレスマーカーの発現が増加したにもかかわらず、ユビキチン化タンパクの発現は減少した。これは、腎癌細胞内にユビキチン化タンパクの蓄積が過剰に起こった場合には、タンパクが凝集し、非可溶性の分画へと移行することで⁴⁸⁾、lysate 内のユビキチン化タンパク発現が減少したものと考えられた。

オートファジーは、小胞体ストレスの増加に伴う、もうひとつの細胞内プロセスである⁴⁹⁾。一般的に、オートファジーは、低栄養、低酸素、有害物質の蓄積といった細

胞にとってのストレスに対する反応として誘導される⁵⁰⁾。詳細な作用機序は未だ不明な部分も多いが、オートファジーは、小胞体で処理しきれない変性タンパクの一部を消化し、処理していると考えられる。本研究では **ritonavir** と **delanzomib** の併用によって過剰な小胞体ストレスが惹起された結果、オートファジーが誘導されたものと思われた。小胞体ストレスを誘導する薬剤で癌細胞を治療することは、さらに内因性の **mTOR** 阻害物質である **sesn2** の発現を増加させ、**mTOR** 経路の活性化を阻害することが報告されている⁴²⁾。**mTOR** の阻害はオートファジーを誘導し⁵¹⁾、またオートファジーが過剰に誘導された結果、癌細胞においては増殖停止やアポトーシスの誘導といった様々な反応が起こる⁵²⁾。今回の併用において、アポトーシスとオートファジーに直接の関連性があるかは不明であるが、いずれにしてもオートファジー誘導は重要な作用機序のひとつであると考えて良いであろう。

ヒストンアセチル化の誘導も、**ritonavir** と **delanzomib** の併用のもうひとつの重要な作用機序であると考ええる。先述のように、ヒストンアセチル化は、転写活性を増加させ癌細胞増殖を抑制するエピジェネティックな機序を介したアプローチである^{36,53)}。本研究におけるヒストンアセチル化誘導についての詳細な作用機序は未だ不明であるが、私たちの研究グループは以前にも、**ritonavir** とプロテアソーム阻害薬の併用によって **HDAC** の発現が減少することを示しており^{34,48)}、このことはヒストンアセチル化誘導を説明する一助になるかもしれない。**HDAC** の中でも、特に **HDAC6** の阻害は **HSP90** のアセチル化を誘導し、分子シャペロンとしての機能を抑制することが報告されている¹⁴⁾。**Ritonavir** と **delanzomib** の併用によって **HDAC6** の発現が抑制されたことは、結果として **ritonavir** による **HSP90** 抑制を更に増強することになったものと考えられる。

調べうる限りでは、癌細胞における ritonavir と delanzomib の併用の研究は本研究が初めてであり、ユビキチン化タンパクの蓄積という概念をもとにした新規腎癌治療開発の基礎的な根拠となりうる。この併用は、小胞体ストレス誘導、ヒストンアセチル化といった、現行の治療法とは全く異なる作用機序を介した治療法であり、現行の治療に対して抵抗性を示す進行腎細胞癌の患者に対しても臨床応用する価値があると考ええる。しかしながら、第2章でも述べたように、ritonavir は CYP3A4 阻害作用も持ち³⁷⁾、delanzomib の肝臓での分解を阻害することで、その血中濃度を上昇させる可能性があるため、臨床第1相試験の際には薬剤の濃度を注意深くモニタリングする必要がある。

第5節 小括

Ritonavir と delanzomib の併用は小胞体ストレスおよびヒストンアセチル化を誘導し、腎癌細胞増殖を効果的に抑制した。

第4章 考察

私は、臨床的に使用可能な薬剤を用いて小胞体ストレスを誘導し、腎癌細胞を効果的に死滅させることが可能であることを示した。上記2つの実験で共通する治療戦略として、ユビキチン-プロテアソーム経路の抑制が挙げられる。一般的に、細胞内で変性した異常タンパクは、付加されたユビキチンが目印となり、プロテアソームによって認識されて、分解、除去される⁶⁾。ユビキチン化タンパクは細胞毒性を有するため³³⁾、ユビキチン-プロテアソーム経路を抑制し、ユビキチン化タンパクを蓄積する薬剤は腎癌細胞にとって新たな抗腫瘍薬となりうる。また、腎癌においてはプロテアソームの発現が高いことが報告されており⁵⁴⁾、第2章、第3章のような併用によってより効率的に腎癌細胞内にユビキチン化タンパクを蓄積させることは腎癌治療において理にかなっていると考えられる。

上述のとおり、それぞれの併用で用いた薬剤はいずれも米国食品医薬品局で承認されたもの、あるいは臨床第1相試験で安全性が確認されたものであるが^{13,39)}、調べる限りでは、固形腫瘍に対しての併用効果を検討した研究は見当たらない。上記2つの研究における共通した作用機序は、分子シャペロンを阻害する薬剤（第2章では belinostat および ritonavir、第3章では ritonavir）によって腎癌細胞内のユビキチン化タンパクを増加させ、さらにプロテアソーム阻害作用を持つ薬剤（第2章では ritonavir、第3章では delanzomib および ritonavir）を併用することでそれらの分解を阻害し、細胞内に蓄積することである。大変興味深いのは、HIV プロテアーゼ阻害薬である ritonavir が分子シャペロン阻害作用、プロテアソーム阻害作用の両者を持ち合わせている点である。第2章と第3章の実験は、ともに ritonavir を用いており、分子シャペロンとプロテ

アソームを同時に阻害している点では同じであるが、どちらの分子の阻害に重点を置いているか、の点で異なっている。すなわち、第2章の実験では、HDAC 阻害薬である belinostat との併用によって分子シャペロンの阻害作用を増強すること、つまり癌細胞内の変性タンパクの増加に重点を置いている。一方で、第3章の実験では、プロテアソーム阻害薬である delanzomib との併用によってプロテアソーム阻害作用を増強すること、すなわち変性タンパクの分解阻害に重点を置いている。表1と表2の combination index を比較した限りにおいては、第3章の実験、つまりプロテアソーム阻害に重点を置く併用投与の方が、より相乗的に腎癌細胞の増殖を抑制すると考えられた。Ritonavir 単剤での抗腫瘍効果は限定的であったが、最近、我々の研究グループは別の HIV プロテアーゼ阻害薬 nelfinavir と ritonavir の併用が膀胱癌に対して効果的に抗腫瘍効果を持つことを示した⁵⁵⁾。また、現在進行中の研究では、腎癌細胞に対しても同併用が効果的であることが分かっており、作用機序の解明を含め、さらなる探究を行っている。

現在臨床現場で広く使用されている抗腫瘍薬の多くは、分子標的薬をはじめ、特定の分子やシグナル伝達経路を標的としている。しかしながら、未解明なものも含めて、癌増殖には無数の分子やシグナル伝達経路が関わっており、それらのうちの一部を抑制するのみでは癌治療にとって不十分であると考ええる。今回の研究は、特定の分子や個々のシグナル伝達経路に捉われない、いわばマクロな視点からの癌治療へのアプローチであり、今後、腎癌に対してのみならず、多くの進行癌に対する新規治療開発に貢献できるものと考ええる。

第 5 章 結論

細胞内に変性タンパクを蓄積させ、小胞体ストレスを誘導することで腎癌細胞を効果的に死滅させる方法についての研究を行った。本研究は、進行腎癌に対する新しい作用機序を介した治療法開発に資するものとする。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究において御指導、御高閲を賜りました、防衛医科大学校泌尿器科学講座教授 浅野友彦先生に深甚なる感謝の意を表します。また終始懇切に多大なる直接の御指導、御高閲を賜りました防衛医科大学校泌尿器科学講座講師 佐藤全伯先生、同助教 浅野貴子先生に感謝の意を表しますとともに、多岐にわたってご助力頂きました防衛医科大学校泌尿器科学講座の皆さまに謝意を表します。

本論文第2章の主旨は *Oncol Res.* 2016;24:327-335 で発表した。

引用文献

- (1) Gupta K, Miller JD, Li JZ, et al. Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. *Cancer Treat Rev.* 2008; 34: 193-205.
- (2) Figlin R, Sternberg C, Wood CG. Novel agents and approaches for advanced renal cell carcinoma. *J Urol.* 2012; 188: 707-15.
- (3) Posadas EM, Figlin RA. Systemic therapy in renal cell carcinoma: advancing paradigms. *Oncology (Williston Park)* 2012; 26: 290-301.
- (4) Su D, Stamatakis L, Singer EA, et al. Renal cell carcinoma: molecular biology and targeted therapy. *Curr Opin Oncol.* 2014; 26: 321-7.
- (5) Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 3584-90.
- (6) Hasselgren PO, Fischer JE. The ubiquitin-proteasome pathway: review of a novel intracellular mechanism of muscle protein breakdown during sepsis and other catabolic conditions. *Ann Surg.* 1997; 225: 307-16.
- (7) Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* 2011; 334: 1081-6.
- (8) Moenner M, Pluquet O, Bouchecareilh M, et al. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res.* 2007; 67: 10631-4.

- (9) Cao SS, Kaufman RJ. Unfolded protein response. *Current Biology*. 2012; 22: R622-6.
- (10) Schönthal AH. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress signaling in cancer. *Biochem Pharmacol*. 2013; 85: 653-66.
- (11) Zavrski I, Naujokat C, Niemöller K, et al. Proteasome inhibitors induce growth inhibition and apoptosis in myeloma cell lines and in human bone marrow myeloma cells irrespective of chromosome 13 deletion. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003; 129: 383-91.
- (12) Kondagunta GV, Drucker B, Schwartz L, et al. Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 3720-5.
- (13) Lee HZ, Kwitkowski VE, Del Valle PL, et al. FDA approval: belinostat for the treatment of patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2015; 21: 2666-70.
- (14) Bali P, Pranpat M, Bradner J et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem*. 2005; 280: 26729-34.
- (15) André P, Groettrup M, Klenerman P, et al. An inhibitor of HIV-1 protease modulates proteasome activity, antigen presentation, and T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 13120-4.
- (16) Srirangam A, Mitra R, Wang M, et al. Effects of HIV protease inhibitor ritonavir on Akt-regulated cell proliferation in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12:1883-96.

- (17) Sidrauski C, Chapman R, Walter P. The unfolded protein response: an intracellular signalling pathway with many surprising features. *Trends Cell Biol.* 1998; 8: 245-9.
- (18) Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Requil.* 1984; 22: 27-55.
- (19) Marks P, Rifkind RA, Richon VM, et al. Histone deacetylase and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer.* 2001; 1:194-202.
- (20) Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389: 349-52.
- (21) Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, et al. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene.* 2005;363 :15-23.
- (22) Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene.* 2007; 26: 5541-52.
- (23) Saunders N, Dicker A, Popa C, et al. Histone deacetylase inhibitors as potential anti-skin cancer agents. *Cancer Res.* 1999; 59: 399-404.
- (24) Huang H, Reed C, Zhang J, et al. Carboxypeptidase A3 (CPA3): a novel gene highly induced by histone deacetylase inhibitors during differentiation of prostate epithelial cancer cells. *Cancer Res.* 1999; 59: 2981-8.

- (25) Plumb JA, Finn PW, Williams RJ, et al. Pharmacodynamic response and inhibition of growth of human tumor xenografts by the novel histone deacetylase inhibitor PXD101. *Mol Cancer Ther.* 2003; 2: 721-8.
- (26) Gravina GL, Marampon F, Muzi P, Mancini A, Piccolella M, Negri-Cesi P, Motta M, Lenzi A, Di Cesare E, Tombolini V, Jannini EA, Festuccia C. PXD101 potentiates hormonal therapy and prevents the onset of castration-resistant phenotype modulating androgen receptor, HSP90, and CRM1 in preclinical models of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2013; 20: 321-37.
- (27) Foss F, Advani R, Duvic M, et al. A phase II trial of Belinostat (PXD101) in patients with relapsed or refractory peripheral or cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2015; 168: 811-9.
- (28) Thomas A, Rajan A, Szabo E, et al. A phase I/II trial of belinostat in combination with cisplatin, doxorubicin, and cyclophosphamide in thymic epithelial tumors: a clinical and translational study. *Clin Cancer Res.* 2014; 20: 5392-402.
- (29) Kumar S, Bryant CS, Chamala S, et al. Ritonavir blocks AKT signaling, activates apoptosis and inhibits migration and invasion in ovarian cancer cells. *Mol Cancer.* 2009; 8: 26.
- (30) Dewen MZ, Tomita M, Katano H, et al. An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappa B and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. *Int J Cancer.* 2009; 124: 622-9.
- (31) Sato A, Asano T, Ito K, et al. 17-allylamono-17-demethoxygeldanamycin and ritonavir inhibit renal cancer growth by inhibiting the expression of heat shock factor-1. *Int J Oncol.* 2012; 41: 46-52.

- (32) Sato A, Asano T, Horiguchi A, et al. Combination of suberoylanilide hydroxamic acid and ritonavir is effective against renal cancer cells. *Urology*. 2010; 76: 764.e7-13.
- (33) Mimnaugh EG, Xu W, Vos M, et al. Simultaneous inhibition of hsp 90 and the proteasome promotes protein ubiquitination, causes endoplasmic reticulum-derived cytosolic vacuolization, and enhances antitumor activity. *Mol Cancer Ther*. 2004; 3: 551-66.
- (34) Sato A, Asano T, Ito K, et al. Ritonavir interacts with bortezomib to enhance protein ubiquitination and histone acetylation synergistically in renal cancer cells. *Urology*. 2012; 79: 966.e13-21.
- (35) Sato A, Asano T, Isono M, et al. Panobinostat synergizes with bortezomib to induce endoplasmic reticulum stress and ubiquitinated protein accumulation in renal cancer cells. *BMC Urol*. 2014; 71: 14.
- (36) Wade PA. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet*. 2001; 10: 693-8.
- (37) Eagling VA, Back DJ, Barry MG. Differential inhibition of cytochrome P450 isoforms by the protease inhibitors, ritonavir, saquinavir and indinavir. *Br J Clin Pharmacol*. 1997; 44: 190-4.
- (38) Peñaranda Fajardo NM, Meijer C, Krut FA. The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. *Biochem Pharmacol*. 2016; 118: 1-8.
- (39) Gallerani E, Zucchetti M, Brunelli D, et al. A first in human phase I study of the proteasome inhibitor CEP-18770 in patients with advanced solid tumours and multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2013; 49: 290-6.

- (40) Gills JJ, Lopiccolo J, Tsurutani J, et al. Nelfinavir, A lead HIV protease inhibitor, is a broad-spectrum, anticancer agent that induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 5183-94.
- (41) Gills JJ, Lopiccolo J, Dennis PA. Nelfinavir, a new anti-cancer drug with pleiotropic effects and many paths to autophagy. *Autophagy.* 2008; 4: 107-9.
- (42) Brüning A, Rahmeh M, Friese K. Nelfinavir and bortezomib inhibit mTOR activity via ATF4-mediated sestrin-2 regulation. *Mol Oncol.* 2013; 7: 1012-8.
- (43) Mizushima N. The role of mammalian autophagy in protein metabolism. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2007; 83: 39-46.
- (44) Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology.* 2006; 66: S102-9.
- (45) Scriven P, Brown NJ, Pockley AG, et al. The unfolded protein response and cancer: a brighter future unfolding? *J Mol Med.* 2007; 85: 331-41.
- (46) Gaedicke S, Firat-Geier E, Constantiniu O, et al. Antitumor effect of the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir: induction of tumor-cell apoptosis associated with perturbation of proteasomal proteolysis. *Cancer Res.* 2002; 62: 6901-8.
- (47) Piva R, Ruggeri B, Williams M, et al. CEP-18770: A novel, orally active proteasome inhibitor with a tumor-selective pharmacologic profile competitive with bortezomib. *Blood.* 2008; 111: 2765-75.

- (48) Sato A, Asano T, Okubo K, et al. Ritonavir and ixazomib kill bladder cancer cells by causing ubiquitinated protein accumulation. *Cancer Sci.* 2017; 108: 1194-1202.
- (49) Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, et al. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem.* 2006; 281: 30299-304.
- (50) Wen X, Klionsky DJ. Autophagy is a key factor in maintaining the regenerative capacity of muscle stem cells by promoting quiescence and preventing senescence. *Autophagy.* 2016; 12: 617-8.
- (51) Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 2006; 441: 437-43.
- (52) Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* 2004; 23: 2891-906.
- (53) Sato A. Vorinostat approved in Japan for treatment of cutaneous T-cell lymphomas: status and prospects. *Onco Targets Ther.* 2012; 5: 67–76.
- (54) Kanayama H, Tanaka K, Aki M, et al. Changes in expressions of proteasome and ubiquitin genes in human renal cancer cells. *Cancer Res.* 1991; 51: 6677-85.
- (55) Sato A, Asano T, Okubo K, et al. Nelfinavir and ritonavir kill bladder cancer cells synergistically by inducing endoplasmic reticulum stress. *Oncol Res.* 2017, *in press*.

図 1A

ユビキチン-プロテアソーム経路

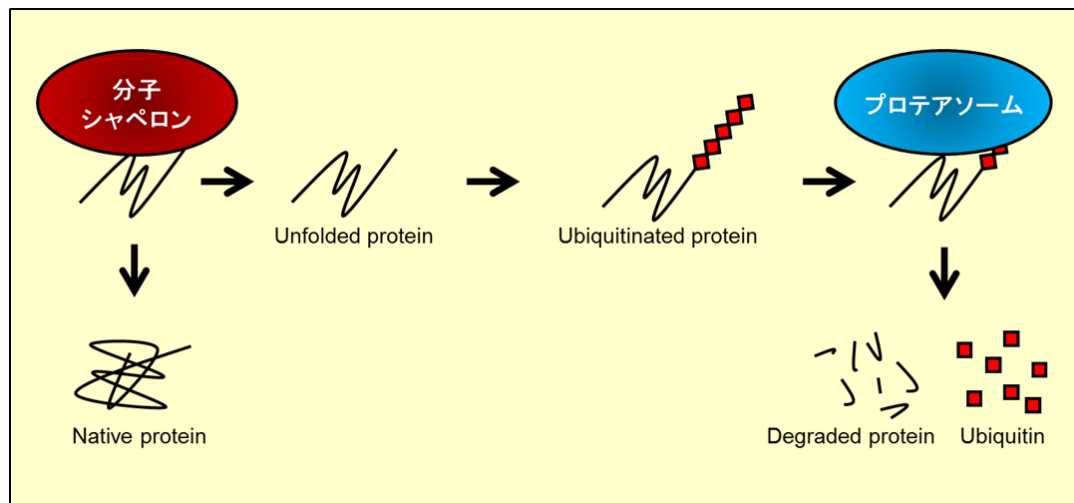


図 1B

ユビキチン-プロテアソーム経路の阻害と小胞体ストレスの誘導

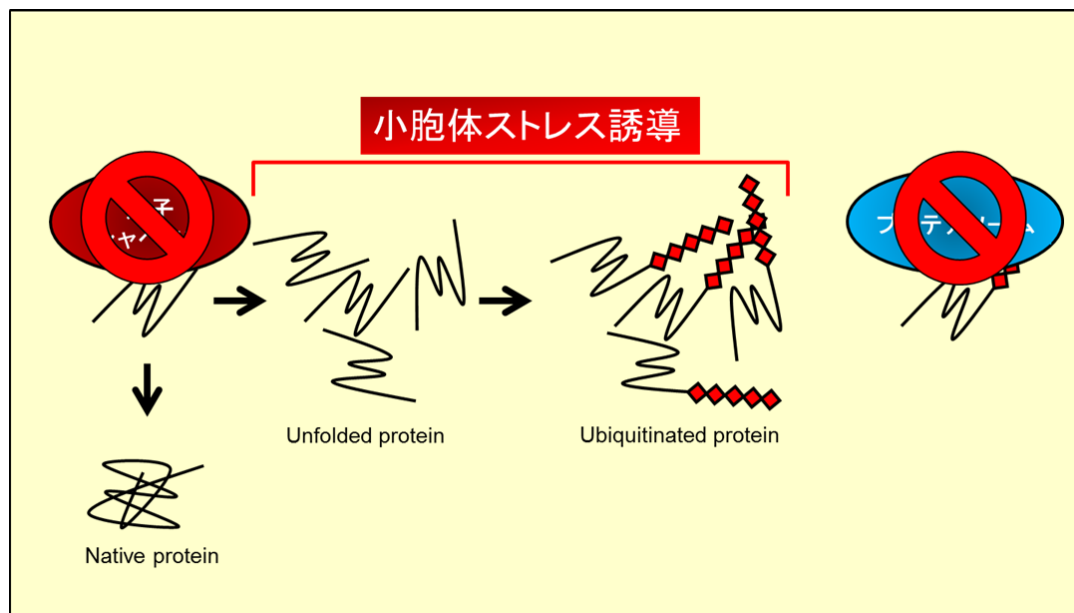


図 2

新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 belinostat と HIV protease 阻害薬 ritonavir の併用

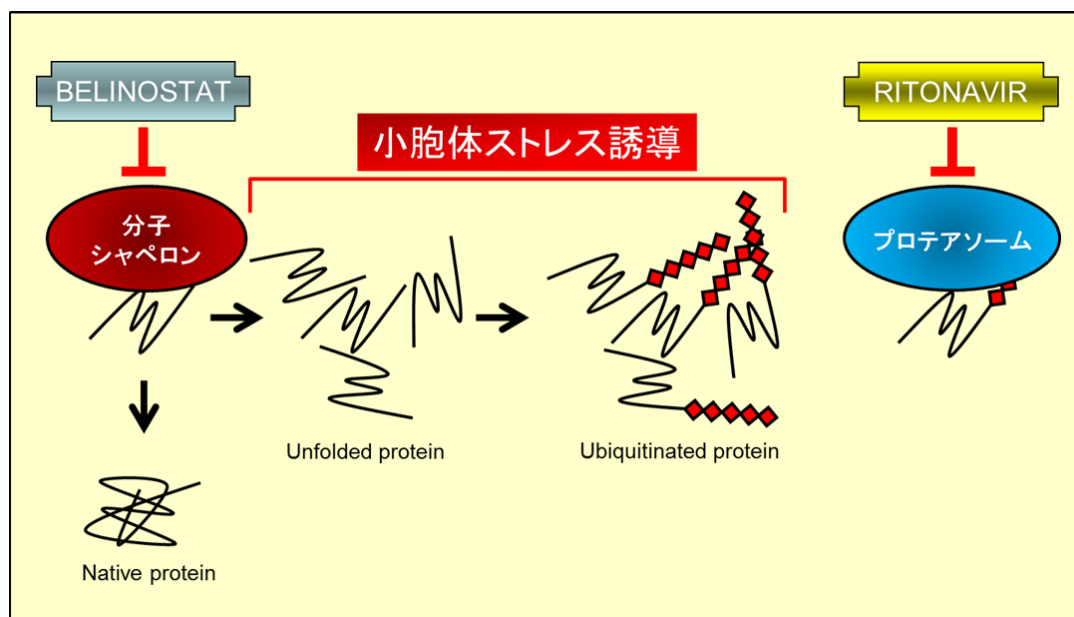
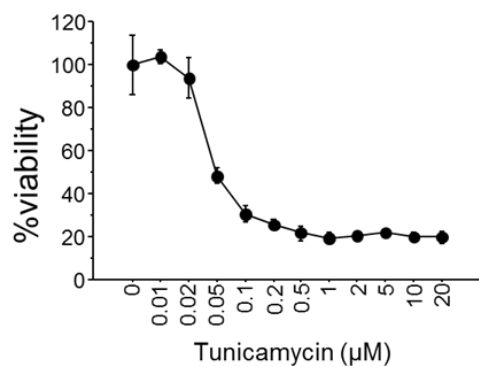


図 3

小胞体ストレスが腎癌細胞増殖におよぼす影響 (MTS アッセイ; mean \pm SD, $n = 6$)。腎癌細胞を、小胞体ストレスを誘導する薬剤である tunicamycin (0.01–20 μ M)で 48 時間処理し、cell viability を MTS アッセイで評価した。

769-P



786-O

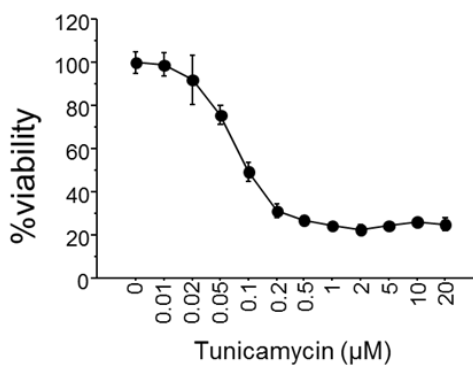


図 4A

Belinostat と ritonavir の併用による細胞増殖能の抑制 (MTS アッセイ; mean \pm SD, n = 6)。腎癌細胞を 2.5–5 μ M belinostat、10–50 μ M ritonavir およびその併用で 48 時間処理し、cell viability を MTS アッセイで評価した。

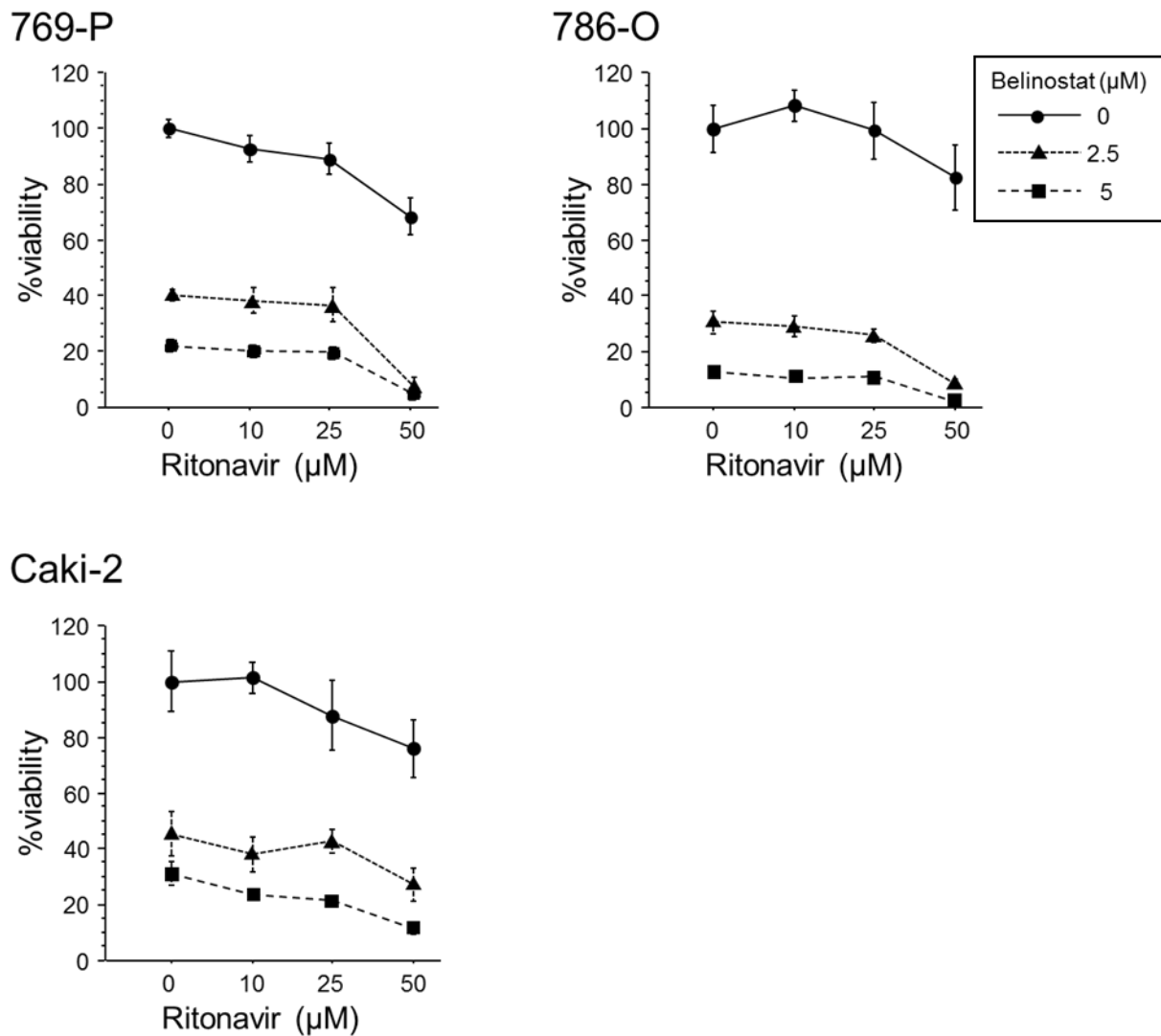


図 4B

Belinostat と ritonavir の併用効果。腎癌細胞を 5 μ M belinostat、50 μ M ritonavir およびその併用で処理し、48 時間後に細胞形態の変化を位相差顕微鏡で観察した（倍率 \times 100）。

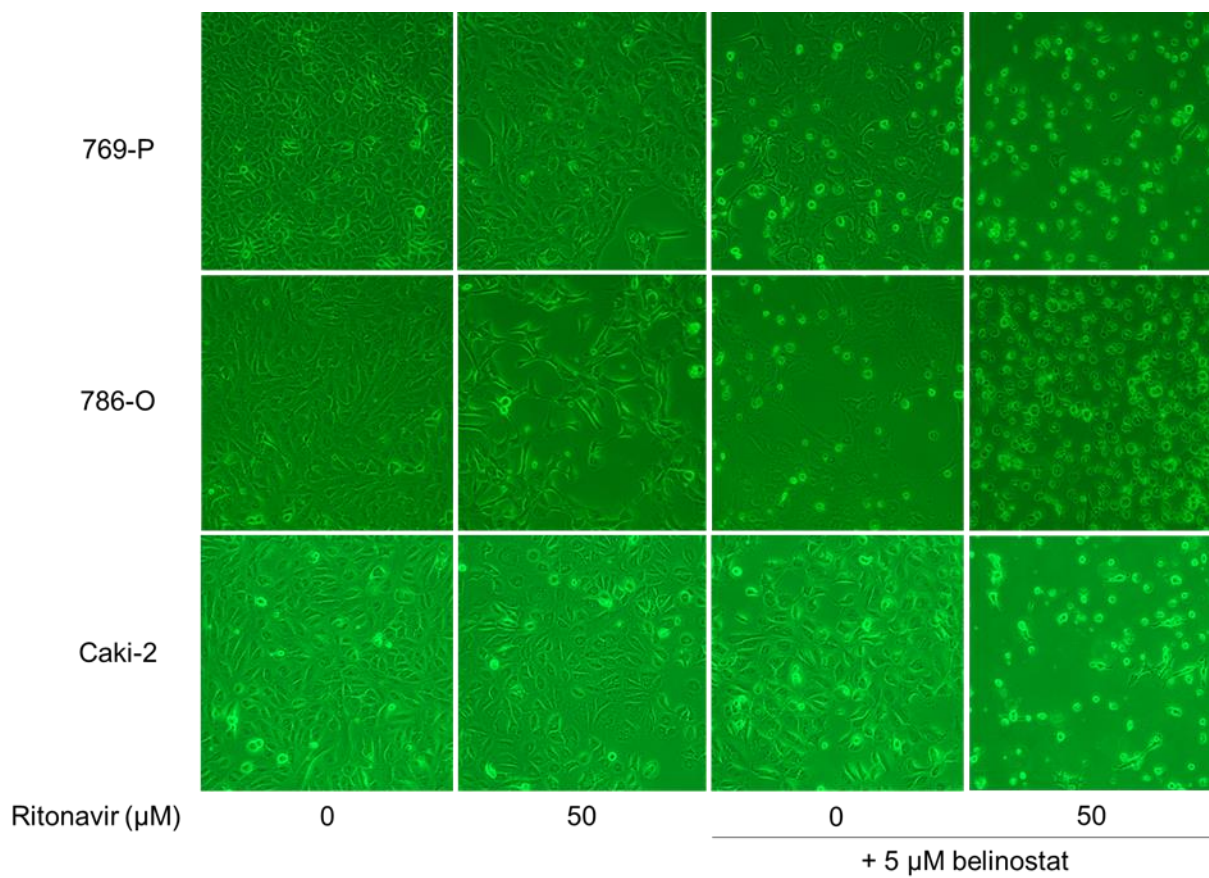


図 4C

Belinostat と ritonavir によるコロニー形成阻害 (mean \pm SD, n = 3, *P < 0.05)。腎癌細胞を 5 μ M belinostat、50 μ M ritonavir およびその併用で 48 時間処理し、培地を交換後、10 日間培養してコロニー形成能の変化を評価した。

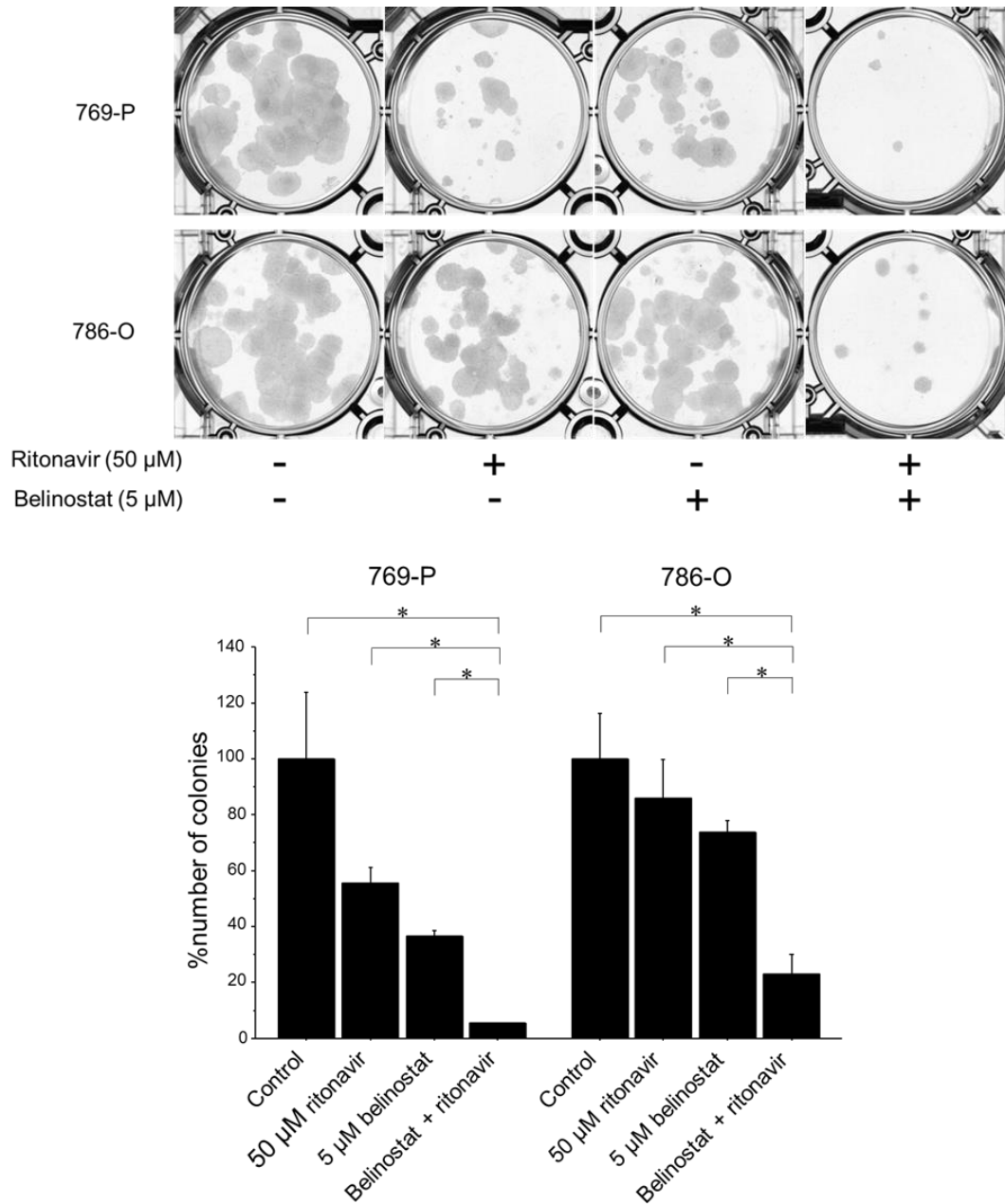


図 5A

Belinostat と ritonavir の併用が腎癌の細胞周期におよぼす影響。腎癌細胞を 5 μ M belinostat、50 μ M ritonavir およびその併用で 48 時間処理し、細胞周期の変化をフローサイトメトリーで検討した。右上の数値は sub-G1 分画にある細胞の割合 (%) を示している。

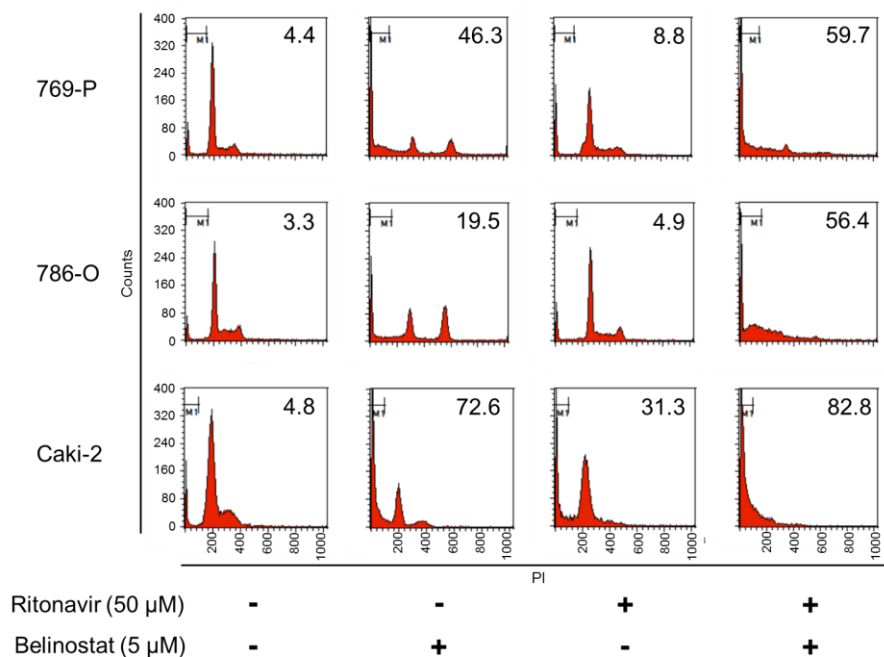


図 5B

Belinostat と ritonavir の併用による細胞周期関連蛋白の発現の変化。腎癌細胞を 5 μ M belinostat、25–50 μ M ritonavir およびその併用で 48 時間処理し、cyclin D1 の発現の変化を western blot 法で検討した。

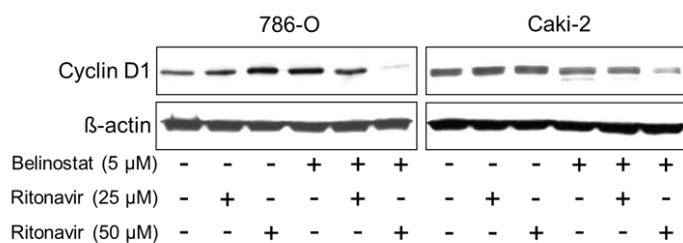


図 6A

Belinostat と ritonavir の併用によるアポトーシス関連蛋白の発現の変化。腎癌細胞を 5 μ M belinostat 、 25–50 μ M ritonavir およびその併用で 48 時間処理し、 western blot 法で cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) の発現の変化を評価した。

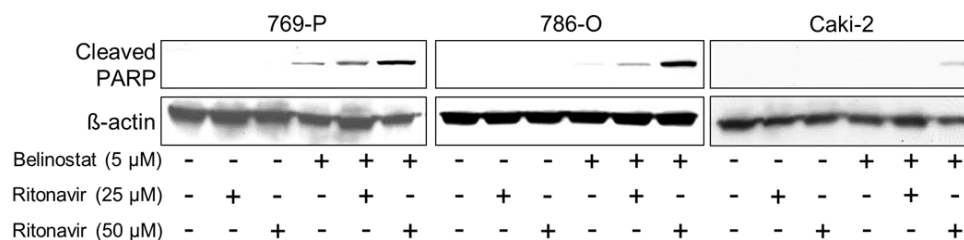


図 6B

Belinostat と ritonavir の併用によるアポトーシスの誘導。腎癌細胞を 5 μ M belinostat 、 25–50 μ M ritonavir およびその併用で 48 時間処理し、フローサイトメーターで Annexin V の蛍光信号強度（右上の数値）を計測した。

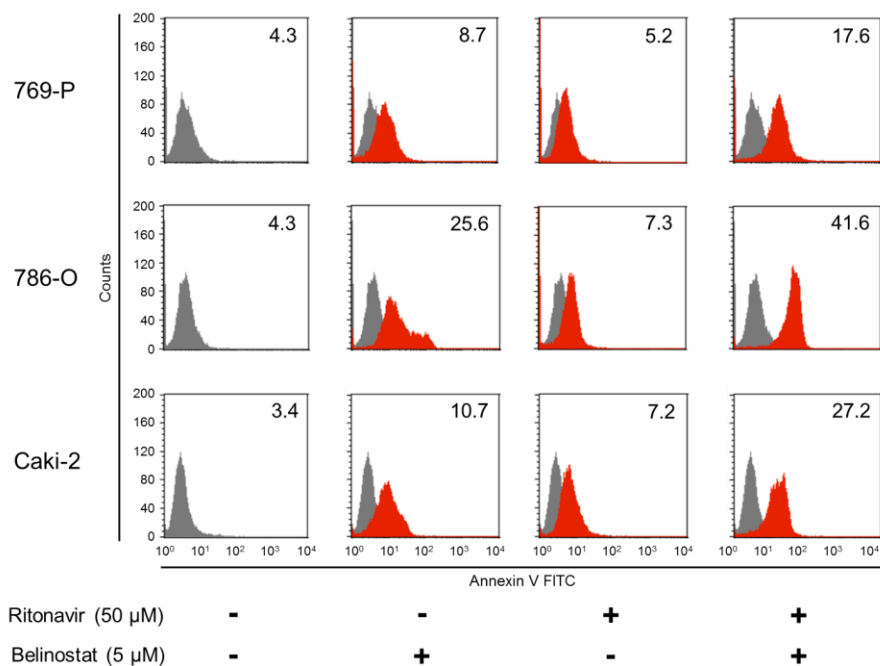


図 6C

Belinostat と ritonavir の併用により誘導されるアポトーシスのカスパーゼ依存性の評価。腎癌細胞を 5 μ M belinostat と 50 μ M ritonavir 、カスパーゼ阻害薬 Z-VAD-FMK (40 μ M) およびその併用で処理し、48 時間後にフローサイトメーターで Annexin V 陽性細胞の割合（右上の数値）を計測した。

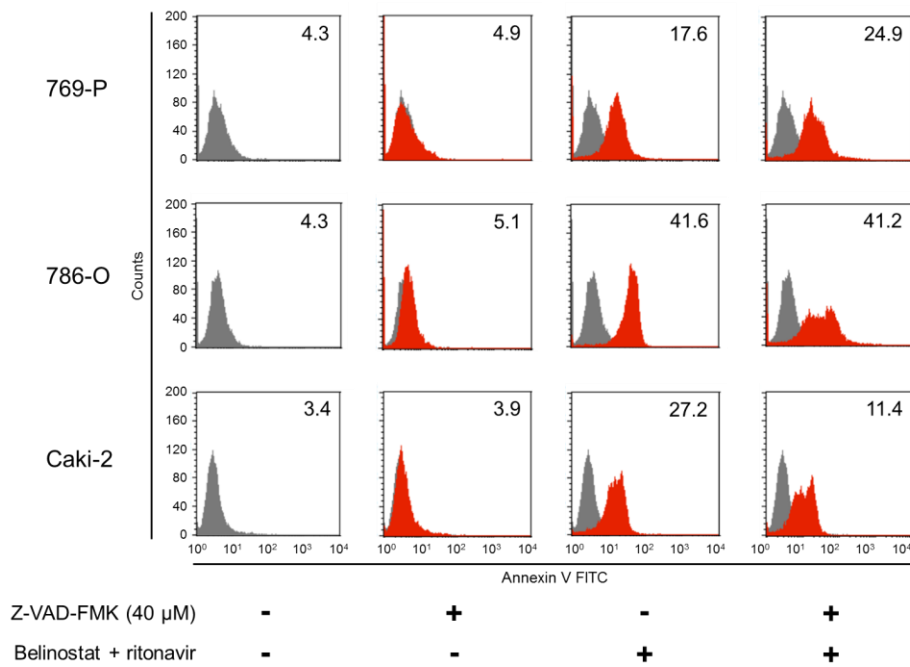


図 7

Belinostat と ritonavir の併用による小胞体ストレスの誘導。腎癌細胞を 5 μ M belinostat、25–50 μ M ritonavir およびその併用で 48 時間処理し、western blot 法で小胞体ストレス関連タンパクの発現の変化を評価した。GRP78, glucose-regulated protein 78; Ero1-L α , endoplasmic oxidoreductin-1-like protein alpha.

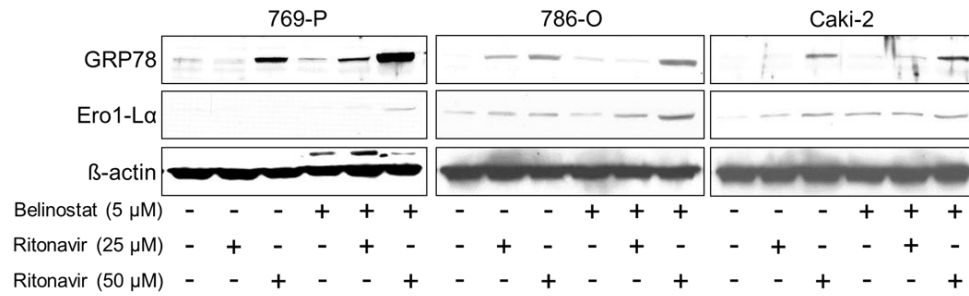


図 8A

Belinostat と ritonavir の併用によるヒストンアセチル化の誘導。腎癌細胞を 5 μ M belinostat 、25–50 μ M ritonavir およびその併用で 48 時間処理し、western blot 法でアセチル化ヒストンの発現の変化を評価した。H3, histone H3.

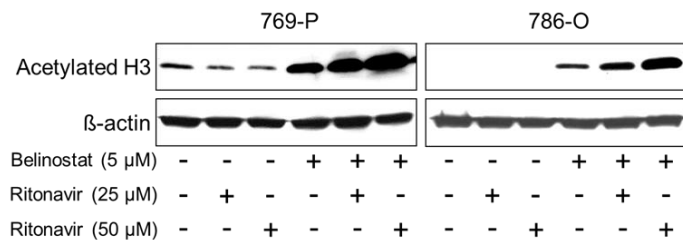


図 8B

Belinostat と ritonavir の併用による histone deacetylase (HDAC) の発現の変化。腎癌細胞を 5 μ M belinostat 、25–50 μ M ritonavir およびその併用で 48 時間処理し、western blot 法で HDAC1, -2, -3, -6 の発現の変化を評価した。

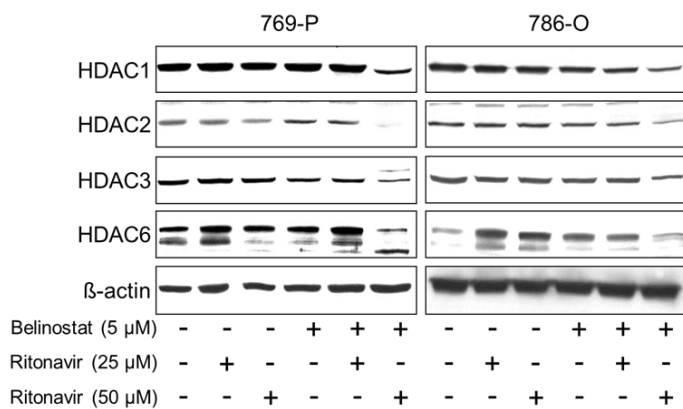


図 9

HIV protease 阻害薬 ritonavir と新規プロテアソーム阻害薬 delanzomib の併用

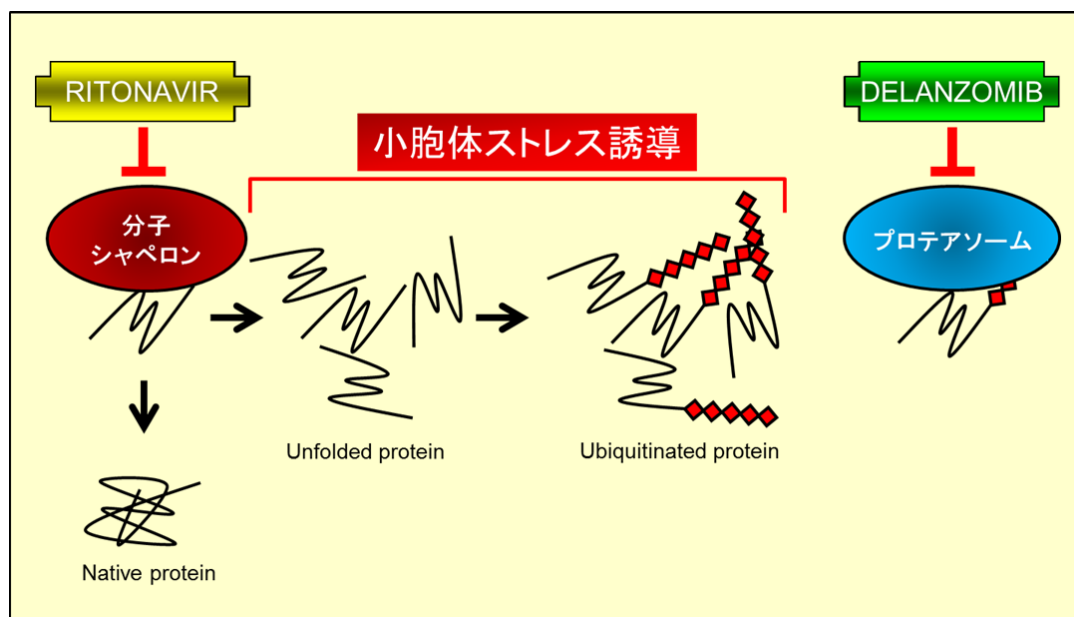
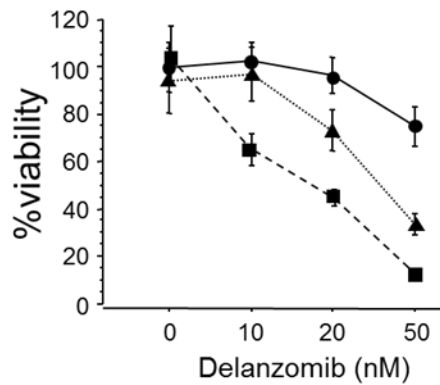


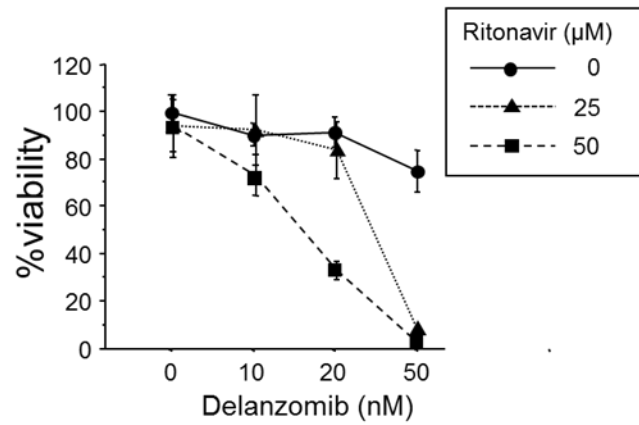
図 10A

Ritonavir と delanzomib の併用による細胞増殖能の抑制 (MTS アッセイ; mean \pm SD, n = 6)。腎癌細胞を 25–50 μ M ritonavir 、10–50 nM delanzomib およびその併用で 48 時間処理し、cell viability を MTS アッセイで評価した。

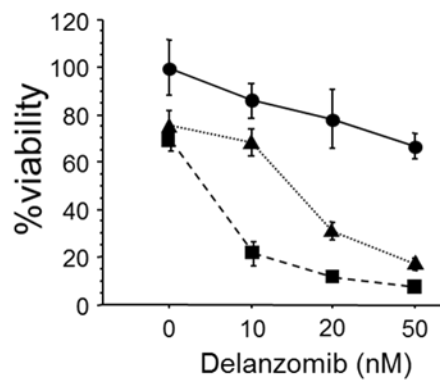
769-P



786-O



Caki-2



Renca

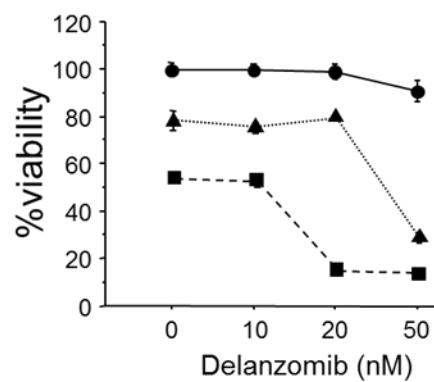


図 10B

Ritonavir と delanzomib の併用効果。腎癌細胞を 50 μ M ritonavir 、50 nM delanzomib およびその併用で処理し、48 時間後に細胞形態の変化を位相差顕微鏡で観察した（倍率 $\times 100$ ）。

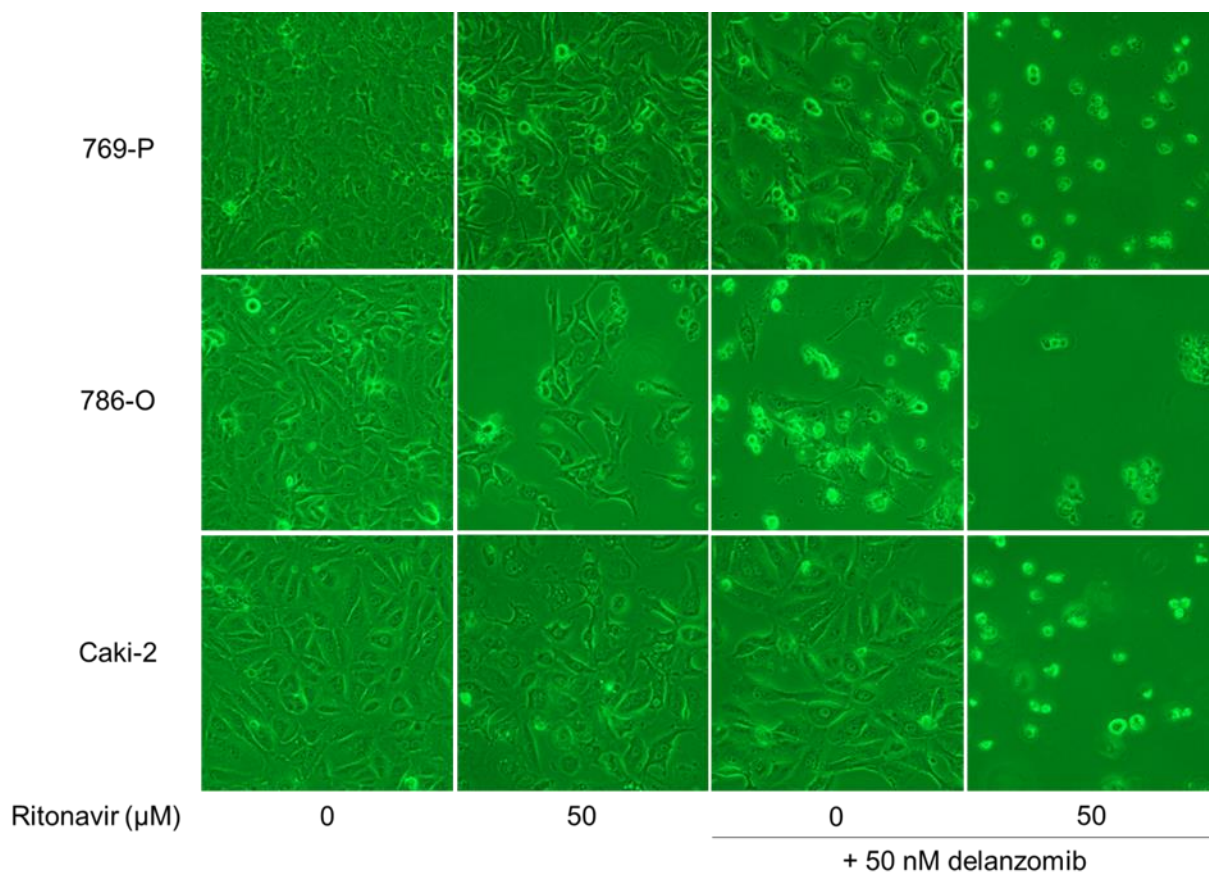


図 10C

Ritonavir と delanzomib によるコロニー形成阻害 (mean \pm SD, n = 3, *P < 0.05)。腎癌細胞を 50 μ M ritonavir、25 nM delanzomib およびその併用で 48 時間処理し、培地を交換後、10 日間培養してコロニー形成能の変化を評価した。

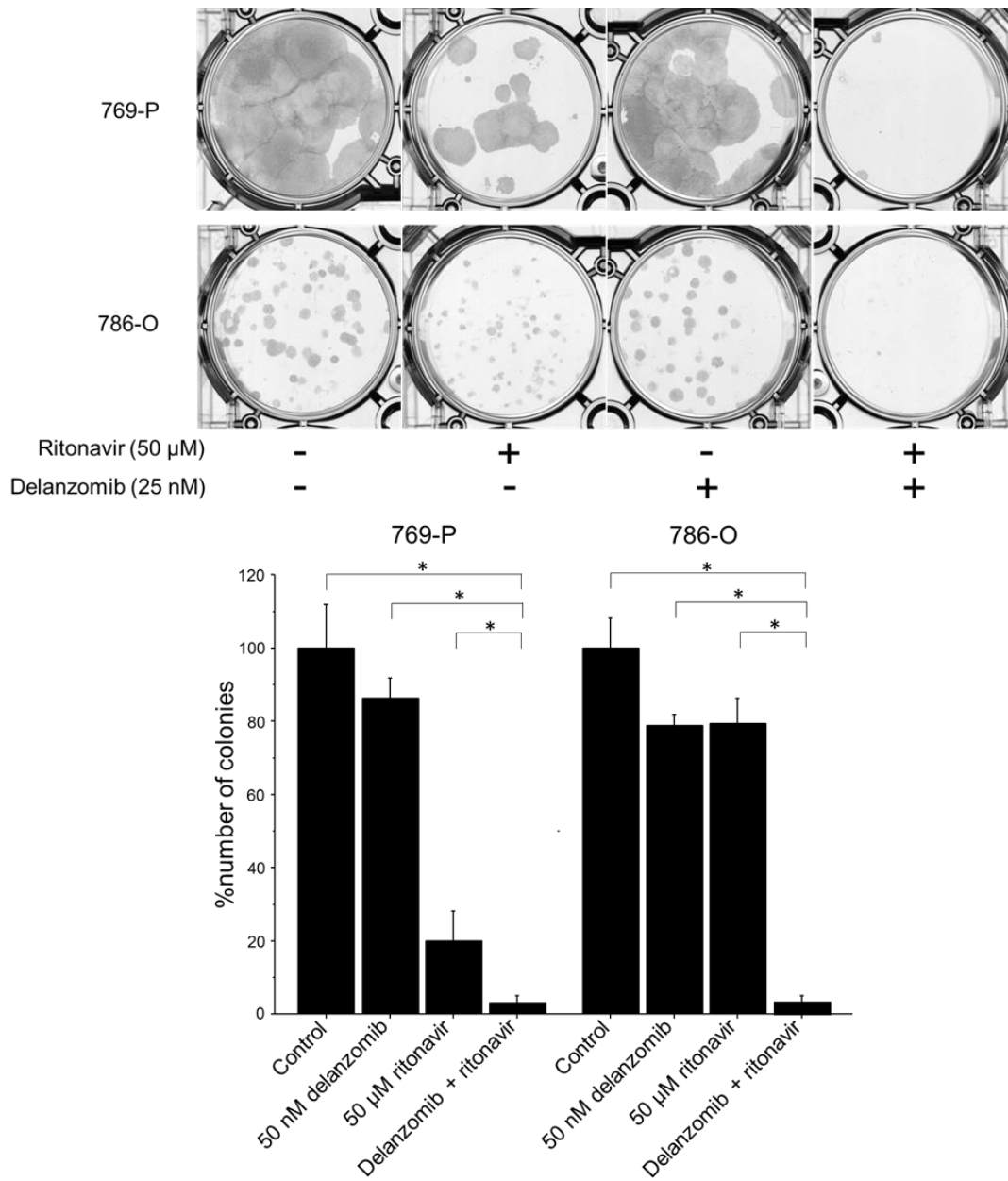


図 10D

In vivo における ritonavir と delanzomib の併用効果 (mean \pm SD, n = 5, *P = 0.0472, **P = 0.0463, ***P = 0.009)、および体重の変化 (*P < 0.05)。Renca 細胞を用いてヌードマウス皮下腫瘍モデルを作成し、ritonavir と delanzomib による治療を行った。コントロールグループは DMSO を腹腔内注射し、他の 3 グループは ritonavir (15 mg/kg) 単剤、delanzomib (30 μ g/kg) 単剤、ritonavir と delanzomib の併用投与を行った。

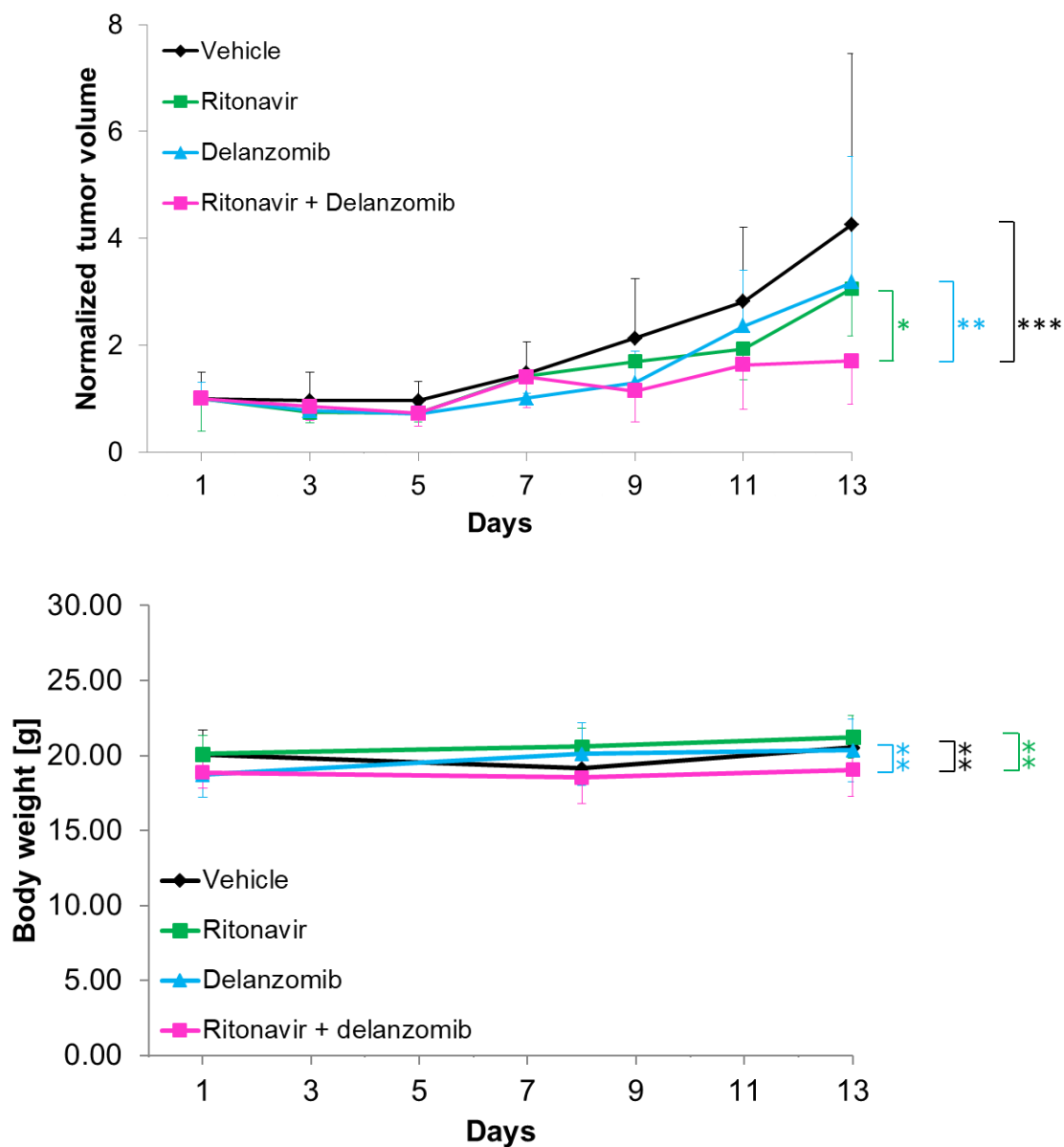


図 11A

Ritonavir と delanzomib の併用が腎癌の細胞周期におよぼす影響。腎癌細胞を 50 μ M ritonavir 、 50 nM delanzomib およびその併用で 48 時間処理し、細胞周期の変化をフローサイトメトリーで検討した。右上の数値は sub-G1 分画にある細胞の割合 (%) を示している。

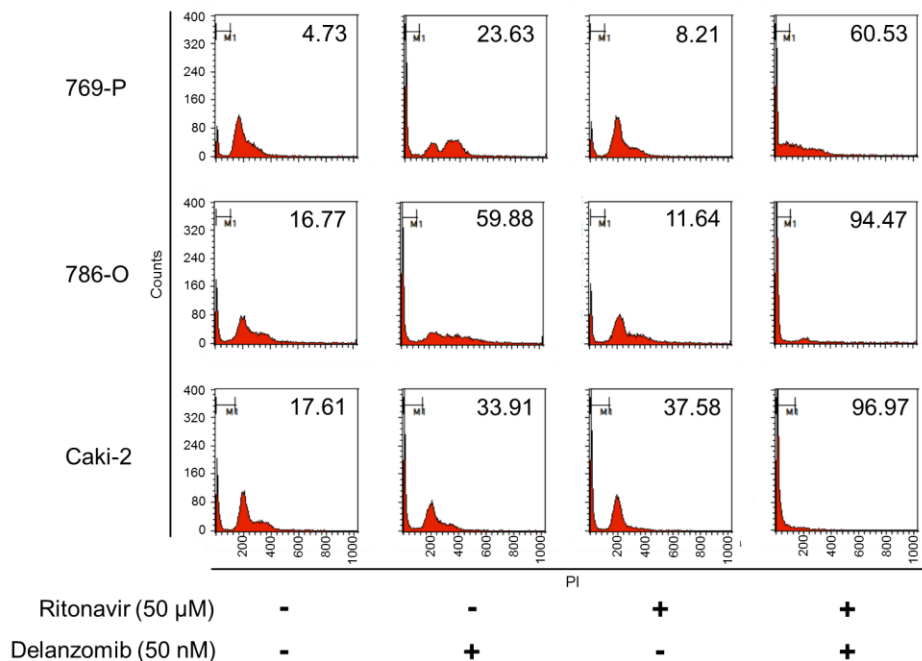


図 11B

Ritonavir と delanzomib の併用による細胞周期関連蛋白の発現の変化。腎癌細胞を 50 μ M ritonavir 、 25–50 nM delanzomib およびその併用で 48 時間処理し、cyclin-dependent kinase (CDK) 4 と cyclin D1 の発現の変化を western blot 法で検討した。

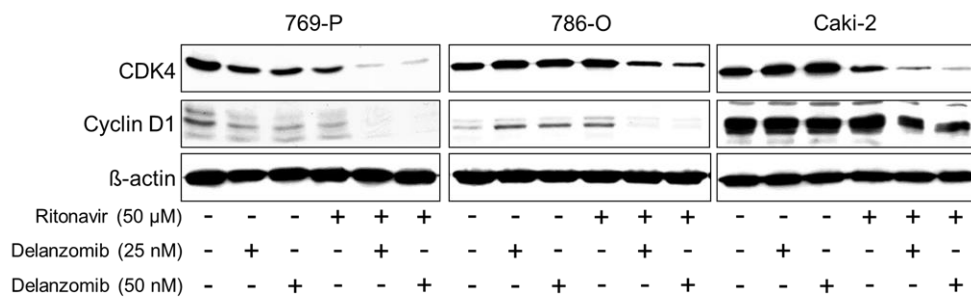


図 12A

Ritonavir と delanzomib の併用によるアポトーシス関連蛋白の発現の変化。腎癌細胞を 50 μ M ritonavir 、 25–50 nM delanzomib およびその併用で 48 時間処理し、western blot 法で cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) の発現の変化を評価した。

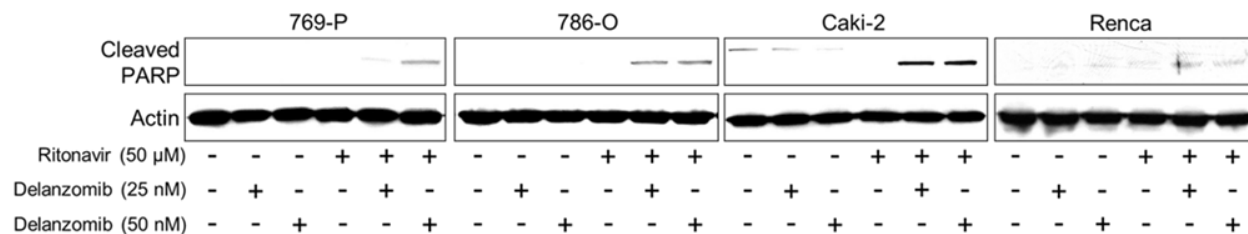


図 12B

Ritonavir と delanzomib の併用によるアポトーシスの誘導。腎癌細胞を 50 μ M ritonavir 、 50 nM delanzomib およびその併用で 48 時間処理し、フローサイトメーターで Annexin V 陽性細胞の割合（右上の数値、%）を計測した。

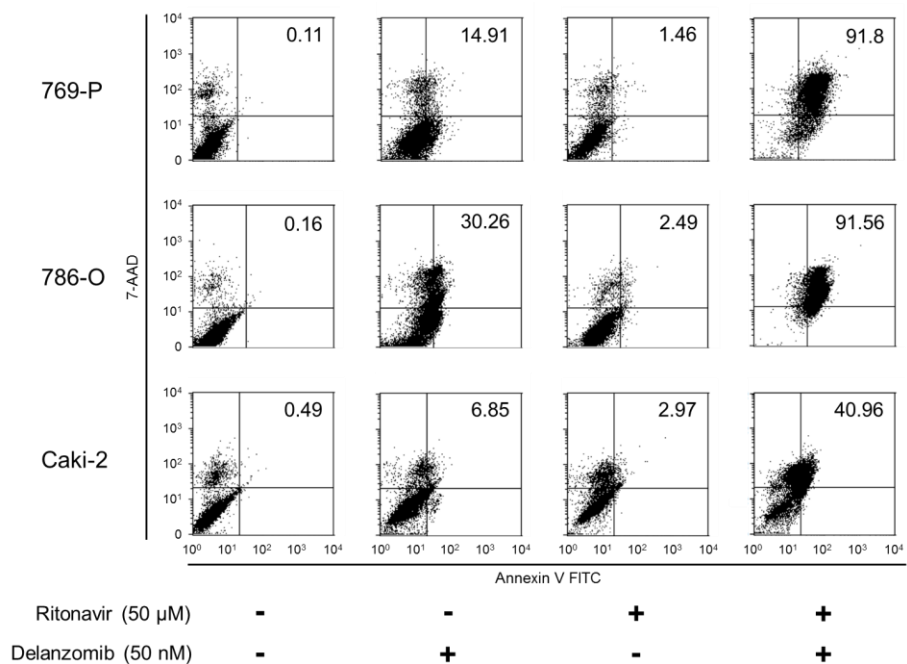


図 12C

Ritonavir と delanzomib の併用により誘導されるアポトーシスのカスパーゼ依存性の評価。腎癌細胞を 50 μ M ritonavir と 50 nM delanzomib 、カスパーゼ阻害薬 Z-VAD-FMK (40 μ M)およびその併用で処理し、48 時間後にフローサイトメーターで Annexin V 陽性細胞の割合（右上の数値、%）を計測した。

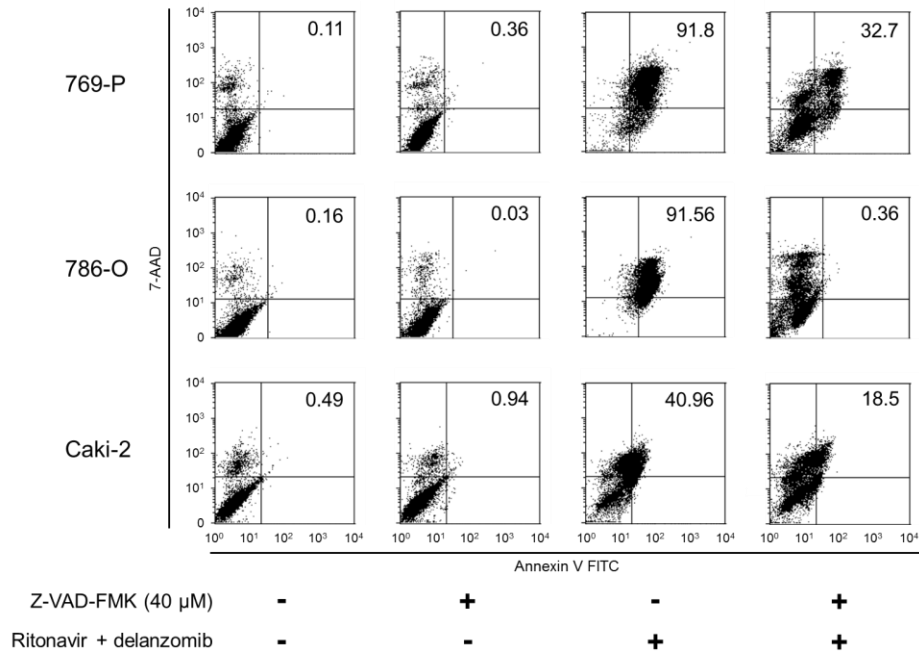


図 13A

Ritonavir と delanzomib の併用による小胞体ストレスの誘導。腎癌細胞を 50 μ M ritonavir 、 25–50 nM delanzomib およびその併用で 48 時間処理し、western blot 法で小胞体ストレス関連タンパク、ユビキチン化タンパクの発現の変化を評価した。GRP78, glucose-regulated protein 78; ERp44, endoplasmic reticulum resident protein 44; Ero1-L α , endoplasmic oxidoreductin-1-like protein alpha.

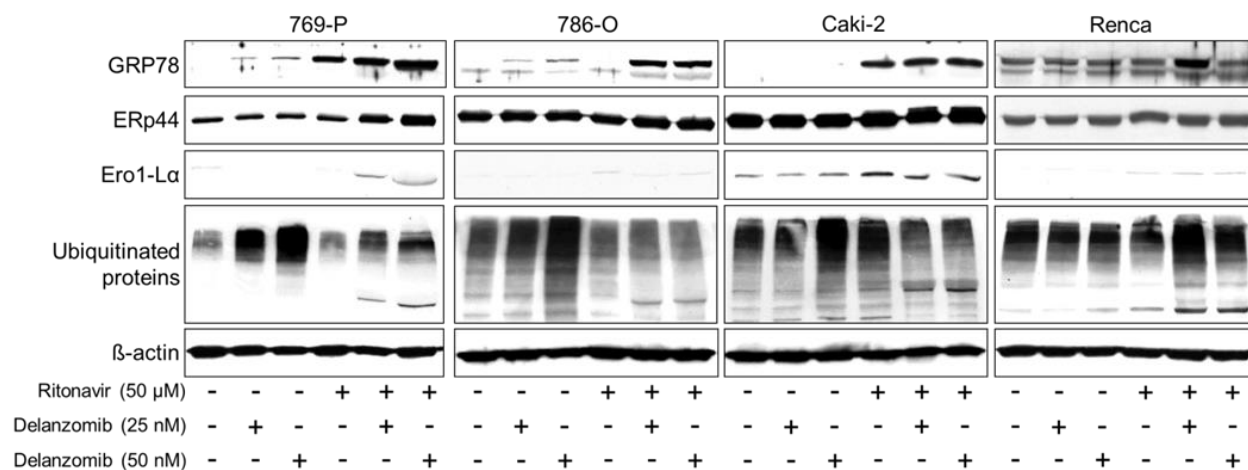


図 13B

Ritonavir と delanzomib の併用によるユビキチン化タンパク発現の経時的変化。腎癌細胞を 50 μ M ritonavir と 50 nM delanzomib の併用で 12 時間、24 時間、48 時間処理し、ユビキチン化タンパクの発現の変化を western blot 法で検討した。

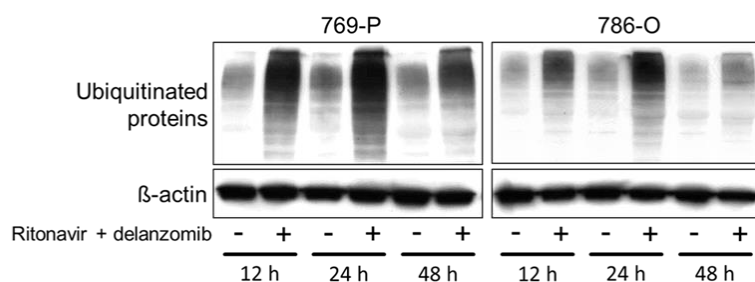


図 14A

Ritonavir と delanzomib の併用によるオートファジーの誘導。腎癌細胞を 50 μ M ritonavir 、 25–50 nM delanzomib およびその併用で 48 時間処理し、western blot 法でオートファジーのマーカーである light chain (LC) 3-II の発現を評価した。

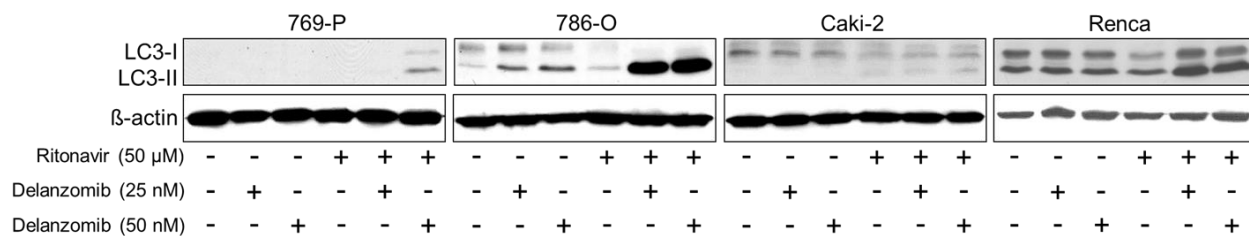


図 14B

Ritonavir と delanzomib の併用による mTOR 経路の阻害。腎癌細胞を 50 μ M ritonavir 、 25–50 nM delanzomib およびその併用で 48 時間処理し、western blot 法で mTOR 関連タンパクの発現を評価した。Sesn2, sestrin 2; AMPK, AMP-activated protein kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; S6, S6 ribosomal protein.

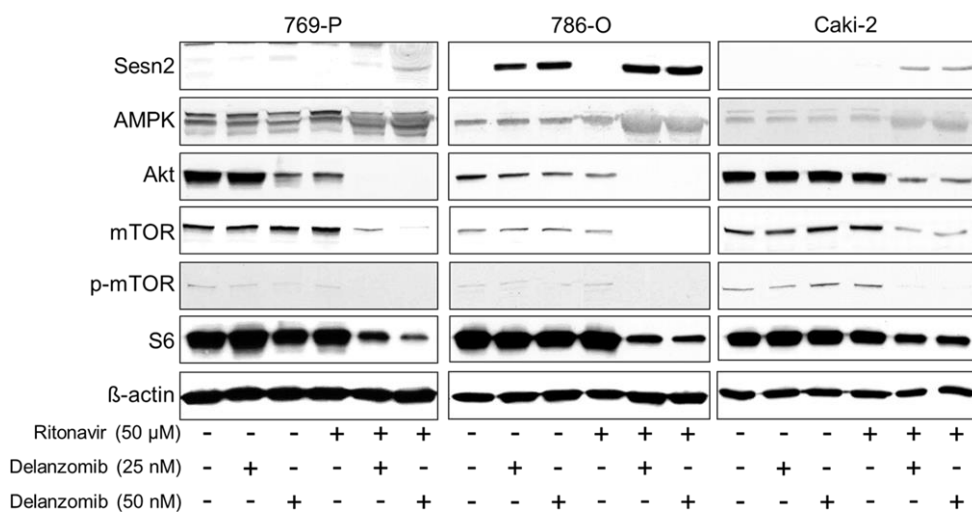


図 14C

Ritonavir と delanzomib の併用によるヒストンアセチル化の促進。腎癌細胞を 50 μ M ritonavir 、 25–50 nM delanzomib およびその併用で 48 時間処理し、 western blot 法でアセチル化ヒストンの発現を評価した。H3, histone H3.

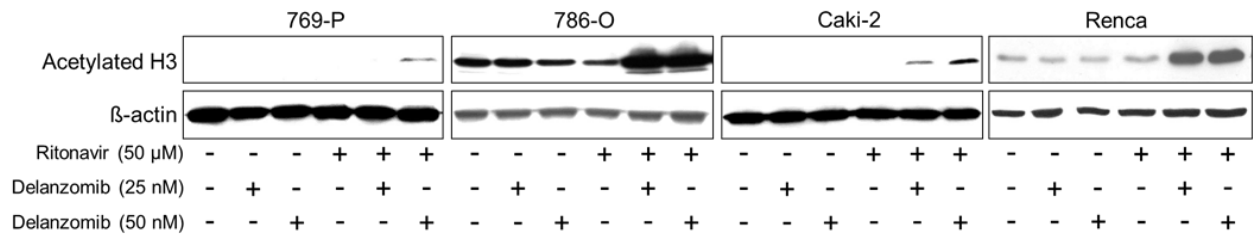


表 1

腎癌細胞株における 5 μ M belinostat と 10–50 μ M ritonavir の combination index (CI)。CI < 1 は相乗効果であることを示している。

	Ritonavir (μ M)		
	10	25	50
769-P	0.859	0.924	0.421
786-O	1.258	1.497	0.914
Caki-2	0.829	1.005	1.081

表 2

腎癌細胞株における 25–50 μ M ritonavir と 10–50 nM delanzomib の combination index (CI)。CI < 1 は相乗効果であることを示している。

Ritonavir (μ M)	Delanzomib (nM)		
	10	25	50
769-P			
25	0.195	0.137	0.260
50	0.049	0.049	0.102
786-O			
25	1.157	0.781	0.003
50	0.121	0.024	0.000
Caki-2			
25	0.695	0.068	0.038
50	0.020	0.011	0.009

