

主論文の要旨

YM155 induces apoptosis through proteasome-dependent degradation of MCL-1 in primary effusion lymphoma

YM155 は primary effusion lymphoma の MCL-1 を
プロテアソーム依存性に抑制し、アポトーシスを誘導する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：清井 仁 教授)

小島 勇貴

<緒言>

Primary effusion lymphoma (PEL)は腫瘍形成を伴わず、心嚢水・胸水・腹水に発生する稀な非ホジキンリンパ腫であり、予後は極めて不良である。最近、我々は臨床病態を反映した薬剤評価系の構築を目的として、リンパ腫 Patient derived xenograft (PDX) 細胞とリンパ腫微小環境の構成細胞である Fibroblast reticular cell (FRC) との共培養による *ex vivo* 培養系を構築し、本培養系を用いて PDX 細胞に対する薬剤スクリーニングシステムを開発した。PDX 細胞は、微小環境依存性生存など細胞株では失われている primary 腫瘍細胞の形質が維持されている。PDX スクリーニングシステムは、従来の細胞株を用いたスクリーニングシステムでは着目されない薬剤に抗腫瘍効果を見出すことが期待される。本研究では、PDX スクリーニングシステムを用いて PEL に対する有効な薬剤の発見を目的として研究を行った。

<方法・結果>

PEL-PDX 細胞と FRC を共培養し (Fig 1A)、薬理活性既知の薬剤ライブラリー (3518 種類) を添加し、48 時間後に PEL-PDX 細胞の生細胞率を測定することで各化合物の抗腫瘍効果を評価した。PEL-PDX と同じ患者細胞から樹立した細胞株 (GTO 細胞) を用いて、同様に抗腫瘍効果を評価し、各化合物の PDX 細胞に対する効果と細胞株に対する効果を比較した。PDX 優位に有効な薬剤は 20 種類、細胞株優位に有効な薬剤は 78 種類であり (Fig 1B)、PDX 優位に有効な薬剤には酸化ストレスを誘導する薬剤が多かった (Fig 1C)。活性酸素産生について検討すると、PDX 優位に有効な薬剤ではより活性酸素を産生していた (Fig 1D)。

抗腫瘍効果が最も高かった 10 種類の薬剤 (Table 1) を入手し、*ex vivo* での抗腫瘍効果および *in vivo* での抗腫瘍効果を検討した。PEL-PDX 細胞および PEL マウスモデルに対して有効な薬剤として YM155 を見出した (Fig 2A)。YM155 は PEL-PDX 細胞および PEL の細胞株 3 種に対して濃度依存的な抗腫瘍効果を示し、GI₅₀ は 1.2-7.9 nM であった (Fig 2B)。続いて PEL の細胞株を用いて、細胞死のメカニズムとして apoptosis について検討した。GTO 細胞に YM155 を 1 から 10 nM の濃度で添加して 12 時間曝露し、propidium iodide (PI) 染色にて細胞周期解析を行うと、YM155 の濃度依存性に sub G1 領域、apoptosis の領域が増加した (Fig 2C)。次に Annexin-V と PI 染色で apoptosis を検討し、YM155 を添加した GTO 細胞では apoptosis が増加しており、pan caspase inhibitor (Z-VAD-FMK) を加えることで、それらは抑制された (Fig 2D)。さらに、アポトーシス関連の蛋白発現についてウエスタンブロットで検討した。YM155 を添加した GTO 細胞では caspase 3、7、PARP 切断の増加を認め、Z-VAD-FMK を加えることで、それらは抑制された (Fig 2E)。

YM155 はもともと survivin (anti-apoptosis 蛋白) の阻害薬として開発されたが、MCL-1 (anti-apoptosis 蛋白) の発現低下が重要であるという報告もある。そこで GTO 細胞に YM155 投与後の経時的、および用量依存的な survivin と MCL-1 の蛋白発現量の変化をウエスタンブロットで検討した。survivin は発現低下を認めず、MCL-1 は

12 時間後には発現低下していた (Fig 3A)。また、10 nM の濃度で、survivin は発現低下を認めなかったが MCL-1 は発現低下を認めた (Fig 3B)。これらの結果から PEL 細胞においては YM155 の細胞死の作用機序が MCL-1 の蛋白量減少にあることが示唆された。また、PEL の細胞株 (BCBL-1 細胞) に MCL-1 をヌクレオフェクションで knockdown したところ、コントロールと比較して有意に細胞死の割合が増加した (Fig 3C)。

次に YM155 による MCL-1 発現低下のメカニズムについて検討した。MCL-1 はリン酸化を契機に、ユビキチン化されプロテアソームにより分解されることが報告されている。GTO 細胞に YM155 と共に proteasome 阻害薬である MG132 を添加すると、YM155 による MCL-1 の発現低下が抑制されていた (Fig 4A)。さらに、MCL-1 の degradation を制御している経路に対する YM155 の影響を検討した。MCL-1 の degradation を制御する経路の一つとして MAPK の経路があり、ERK1/2 のリン酸化は MCL-1 のリン酸化、degradation を誘導することが報告されている。GTO 細胞に YM155 を添加すると、リン酸化 ERK1/2 が増加しており、ERK1/2 のキナーゼである MEK1 を阻害する薬剤 (U0126) を YM155 と共に添加すると、MCL-1 の発現低下が抑制されていた (Fig 4B)。YM155 を 1 時間添加すると、MCL-1 の Thr163 におけるリン酸化が増加していた (Fig 4C)。また、YM155 と U0126 を添加した GTO 細胞の死細胞割合を検討すると、YM155 単独よりも U0126 を加えた方が細胞死の割合が減少していた (Fig 4D)。

最後に、PEL マウスモデルで YM155 の薬効を検討した。YM155 (5 mg/kg) を埋め込み式ポンプ (osmotic pump) により持続投与を行う治療群と、DMSO を持続投与するコントロール群をそれぞれ 7 匹用意し、NOG マウスに PEL PDX 細胞腹腔内播種後 Day 21 での腹水量および体重を評価した。YM155 群は腹部膨満がみられず (Fig 5A)、腹水量・体重増加は有意に減少しており (Fig 5B・5C)、PEL マウスモデルに対する YM155 の有効が示された。

< 考察 >

PDX スクリーニングシステムを用いて、YM155 を同定した。YM155 は *ex vivo* 及び *in vivo* において有効性を示し、PEL に対して有効である可能性がある。YM155 は悪性リンパ腫などを対象に Phase II 試験まで行われた薬剤であり、PEL 患者への応用が期待される。

YM155 は high-throughput survivin gene promotor assay により同定された薬剤である。YM155 の薬効メカニズムは、近年 survivin の発現低下以外にも様々な報告がされているが、PEL 細胞に対する薬効メカニズムは本結果から MCL-1 の発現低下による apoptosis 誘導と考えられた。さらに、YM155 による MCL-1 の発現低下は、ERK1/2 のリン酸化を介する proteasome 依存性の MCL-1 degradation によると考えられた。

<結語>

PDX スクリーニングシステムを用いて、PEL に対して *ex vivo* 及び *in vivo* において有効な薬剤を同定した。PEL に対して、YM155 は proteasome 依存性に MCL-1 を degradation し、apoptosis を導くことが示唆された。