



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1619号
学位記番号	第1154号
氏名	吉田 嵩
授与年月日	平成 30年 3月 26日
学位論文の題名	<p>Potent anti-tumor activity of a syringolin analog in multiple myeloma: A dual inhibitor of proteasome activity targeting <math>\beta 2</math> and <math>\beta 5</math> subunits (<math>\beta 2</math> と <math>\beta 5</math> サブユニットのプロテアソーム活性を阻害するシリンゴリン誘導体の多発性骨髄腫における強力な抗腫瘍活性)</p> <p>Oncotarget; accepted for publication</p>
論文審査担当者	主査： 稲垣 宏 副査： 岡本 尚, 飯田 真介

## 論 文 内 容 の 要 旨

[背景] 多発性骨髄腫は、B リンパ球の最終分化細胞である形質細胞の腫瘍であり、M 蛋白血症と、貧血、腎障害や骨病変などさまざまな症候を来す難治性の造血器悪性腫瘍である。従来はメルファランなどのアルキル化剤やコルチコステロイドが治療の主体であったが、近年はプロテアソーム阻害薬や免疫調節薬といった分子標的薬が重要な役割を果たすようになった。骨髄腫細胞では、免疫グロブリンやサイトカインなどの分泌蛋白質合成が活発に行われているため、蛋白質処理機能を有するプロテアソームが高度に発達している。プロテアソームを標的とした阻害薬としてボルテゾミブ (BTZ) が用いられており、20S プロテアソームの $\beta 5$ サブユニットの活性を抑制する。20S プロテアソームの活性を持つ主なサブユニットは $\beta 5$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 1$ であり、それぞれキモトリプシン様活性、トリプシン様活性、カスパーゼ様活性を示すが、 $\beta 5$ サブユニット以外の他のプロテアソーム活性の標的治療としての意義については十分に解明されていない。今回我々は $\beta 5$  サブユニットおよび $\beta 2$  サブユニットの活性を共に抑制するシリンゴリン誘導体 (syringolog-1)を用いて多発性骨髄腫細胞における抗腫瘍効果とその作用機序について検討した。syringolog-1 は、北海道大学 市川研究室の千葉らによって合成された。シリンゴリンの膜透過性を高め殺細胞活性を高めた新規のプロテアソーム阻害薬である (Angewandte Chemie 2014;53(19):4836-4839)。

[方法と結果]多発性骨髄腫細胞株において、syringolog-1 の殺細胞活性を検討したところ、BTZ と同等の濃度で十分な活性を認めた (MTS アッセイ)。また BTZ 耐性骨髄腫細胞株に対しては、BTZ に比べ syringolog-1 の方が強い殺細胞活性を示した。20S プロテアソームアッセイでは syringolog-1 の投与により、 $\beta 5$  サブユニットと $\beta 2$  サブユニット活性の両者の抑制を濃度依存的に認め、BTZ 耐性骨髄腫細胞株においても同様の結果を認めた。細胞周期解析では、G2/M 期の細胞周期停止を認めた。アポトーシス検出アッセイでは、syringolog-1 の 10 nM の投与で十分なアポトーシスを誘導し、ウェスタンブロット法による解析で CHOP や NOXA の発現亢進を認め、これらは小胞体ストレス誘導による細胞内ストレスに起因するものと考えられた。患者検体を用いた同様の解析 (MTS アッセイ、20S プロテアソームアッセイ、ウェスタンブロット法) でも、syringolog-1 は BTZ と同等の抗腫瘍効果が認められた。既存の報告では、骨髄腫細胞における増殖・生存維持の抑制には、 $\beta 5$  サブユニット活性の阻害だけでなく、 $\beta 2$  サブユニット活性の阻害も重要であると報告されている。そのため我々は、 $\beta 2$  サブユニット (*PSMB7*) を標的とする siRNA を多発性骨髄腫細胞株に導入し、ノックダウンを行ったところ、コントロール siRNA の導入に比べ有意なアポトーシスの増加を認め、さらに $\beta 5$  サブユニット (*PSMB5*) および $\beta 2$  サブユニット (*PSMB7*) を同時に抑制したところ、コントロール及びそれぞれの単独抑制と比べ、有意なアポトーシスの増加を認めた。さらに syringolog-1 の *in vivo* 活性を検討するため、免疫不全マウスに骨髄腫細胞を接種し生着後、syringolog-1 を投与したところ、コントロールに比べ、有意に骨髄腫細胞の増殖抑制を認めた。さらに BTZ 耐性多発性骨髄腫株を用いて同様な検討を行ったが、syringolog-1 の投与では、通常骨髄腫細胞の検討と同様な結果を認め、BTZ 投与群よりも BTZ 耐性の増殖が有意に抑制される結果であった。

[考察]多発性骨髄腫細胞において、 $\beta 2$  サブユニットの抑制によりアポトーシスが誘導された。また $\beta 2$  サブユニットと $\beta 5$  サブユニットの同時抑制で、付加的な抗腫瘍効果が認められた。BTZ 耐性多発性骨髄腫においても同様の抗腫瘍効果を認め、シリンゴリン誘導体 syringolog-1 は、BTZ 耐性となった多発性骨髄腫の治療においても有用な治療薬となりうる可能性が示された。

## 論文審査の結果の要旨

【背景】多発性骨髄腫は、Bリンパ球が終末分化した形質細胞の悪性腫瘍である。近年、骨髄腫治療におけるキードラッグとして、プロテアソーム阻害薬や免疫調節薬などの分子標的薬が重要な役割を担うようになった。代表的なプロテアソーム阻害薬であるボルテゾミブ (BTZ) の作用機序は 20S プロテアソームの  $\beta 5$  サブユニット (キモトリプシン様活性) の抑制だが、 $\beta 5$  以外のプロテアソームサブユニットの治療標的としての意義は十分に解明されていない。今回我々は、 $\beta 5$  サブユニットおよび  $\beta 2$  サブユニットの活性を共に抑制するシリンゴリン誘導体 (syringolog-1) の多発性骨髄腫細胞における抗腫瘍効果について検討した。

【方法と結果】骨髄腫細胞株において syringolog-1 の殺細胞活性を検討したところ、BTZ と同等の濃度で十分な活性を認めた (MTS アッセイ)。また BTZ 耐性株では、BTZ に比べ syringolog-1 の方が強い殺細胞活性を示した。プロテアソームアッセイにて、syringolog-1 は濃度依存的に  $\beta 5$  サブユニットに加えて  $\beta 2$  サブユニット活性 (トリプシン様活性) の抑制も認め、BTZ 耐性株においても同様であった。syringolog-1 は 10 nM の濃度で十分なアポトーシスを誘導し、ウェスタンブロット法による解析で小胞体ストレス誘導を介した CHOP や NOXA の発現亢進を認めた。患者検体においても syringolog-1 は BTZ と同等の効果を認めた。 $\beta 2$  サブユニット活性阻害の意義を検討するため、 $\beta 2$  サブユニット (*PSMB7*) を標的とする siRNA を骨髄腫細胞株に導入したところ、アポトーシスの誘導を認め、さらに  $\beta 5$  (*PSMB5*)・ $\beta 2$  サブユニットを同時に抑制したところ、コントロール及びそれぞれの単独抑制に比べ、有意なアポトーシスの増加を認めた。免疫不全マウスを用いた異種移植モデルマウスにおいても、syringolog-1 の投与は BTZ 耐性株も含めて骨髄腫細胞の顕著な増殖抑制を認めた。

【考察】骨髄腫細胞において、 $\beta 2$  サブユニットの抑制によりアポトーシスが誘導された。また  $\beta 2$ ・ $\beta 5$  サブユニットの同時抑制で、相加的な抗腫瘍効果が認められた。BTZ 耐性骨髄腫細胞においても同様の効果を認め、シリンゴリン誘導体 syringolog-1 は、BTZ 耐性となった多発性骨髄腫の治療においても有用な治療薬となりうる可能性が示された。

【審査の内容】主査の稲垣教授より、20S プロテアソームにおける  $\alpha$  サブユニットや 19S プロテアソームの意義、ボルテゾミブ耐性化の機序、耐性細胞株の樹立法など 7 項目、第一副査の岡本教授からは骨髄腫の治療標的としてプロテアソームが選ばれている理由、 $\beta$  サブユニットの持つキモトリプシン活性がなぜ骨髄腫細胞増殖に必要なのか、syringolin から syringolog-1 を合成する過程でどのような工夫が成されたのか、MTS アッセイの原理など 9 項目、そして第二副査の飯田教授からは骨髄腫患者における染色体病型の意義と治療反応性や予後との関連、骨髄腫治療における自家造血幹細胞移植や同種造血幹細胞移植の役割など 3 項目の専門領域における質問がなされた。各々の質問に対して学位申請者からは概ね満足の出来る回答が得られ、学位論文の趣旨および研究手法や臨床的意義を十分に理解していることが確認された。本研究により、20S プロテアソームの  $\beta 5$  および  $\beta 2$  サブユニットの阻害活性を有する Dual inhibitor が他のプロテアソーム阻害薬に耐性化した多発性骨髄腫患者に対しても有効である可能性が示され、新たな薬剤開発につながる可能性を示したことは重要な意義がある。以上より、審査委員会は申請者に対して博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 稲垣 宏 副査 岡本 尚 飯田 真介