

TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, mediates S-phase cell cycle arrest and suppresses head and neck tumor angiogenesis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 足守, 直樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1963

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 472号	学位授与年月日	平成21年12月11日
氏名	足守直樹		
論文題目	TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, mediates S-phase cell cycle arrest and suppresses head and neck tumor angiogenesis (低分子 Bcl-2 阻害剤、TW-37 は細胞周期において S 期の停止を介在し、頭頸部腫瘍における血管新生を抑制する)		

博士(医学) 足守直樹

論文題目

TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, mediates S-phase cell cycle arrest and suppresses head and neck tumor angiogenesis

(低分子 Bcl-2 阻害剤、TW-37 は細胞周期において S 期の停止を介在し、頭頸部腫瘍における血管新生を抑制する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

Bcl-2 ファミリー蛋白はアポトーシスを制御し、細胞の生存を司っている。抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 や Bcl-xL は多くの癌細胞で過剰発現されており、化学療法や放射線治療の抵抗性に関与している。TW-37 は蛋白の化学構造を元に開発された分子標的薬であり、Bcl-2 の BH3 ドメインに結合することにより Bid や Bad などの向アポトーシス蛋白と競合しアポトーシスを誘導する。この低分子 Bcl-2 阻害剤である TW-37 は単剤投与で抗腫瘍効果のあることがリンパ腫や膵臓癌で認められている。我々は以前にこの TW-37 が血管内皮細胞に対しても増殖抑制効果があり、マウスを用いた *in vivo* の実験において血管新生抑制効果があることを認めた。今回我々は TW-37 とシスプラチンを用いてその抗腫瘍効果、血管新生抑制効果を調べた。

[材料ならびに方法]

ヒト血管内皮細胞株(HDMEC)は Lonza 社から購入したもの、頭頸部扁平上皮癌細胞株(OSCC-3, UM-SCC-1, UM-SCC-74A) はミシガン大学、シカゴ大学でそれぞれ樹立されたものを使用した。細胞増殖抑制はそれぞれの細胞をさまざまな濃度のシスプラチン、TW-37 単剤または併用投与にて 72 時間曝露を行い、10%トリクロロ酢酸による細胞の固定後、細胞内蛋白を Sulforhodamine B と結合させ、その吸光度をマイクロプレートリーダーで求め評価した。アポトーシス及び細胞周期は細胞を薬剤に曝露した後、DNA を Propidium iodide で染色しフローサイトメーターにて解析を行った。*in vivo* では HDMEC と OSCC-3 を混合し、免疫不全マウスの背部に移植した。腫瘍体積が約 200 mm³ になったところで 4 群に分け(コントロール、シスプラチン、TW-37、併用)、腹腔内投与により投薬を開始した。TW-37 は 10 日間連日投与、シスプラチンは 1、6 日目に投与した。腫瘍の大きさを連日計測し各群間で比較検討した。また腫瘍血管新生、アポトーシスの効果を観察するための実験では、投薬開始 7 日目にすべての群から同時に腫瘍を摘出した。腫瘍内新生血管は Factor VIII による免疫染色、アポトーシス細胞は TUNEL 法により染色し、それぞれの群間で比較検討を行った。

[結果]

血管内皮細胞、頭頸部扁平上皮癌細胞に対するシスプラチンの IC₅₀ は 2 μM、TW-37 はそれぞれ 1.1 μM、0.2~0.3 μM であり、*in vitro* では TW-37 により強い増殖抑制効果がみられた。シスプラチン、TW-37 をそれぞれ IC₅₀、IC₅₀ 以下、IC₅₀ 以上の濃度で組み合わせ、単剤投与と併用投与の比較を行ったところ、TW-37 が IC₅₀ またはそれ以上の濃度でのシスプラチンとの併用で細胞増殖抑制に相加あるいは相乗効果を認めた。フローサイトメーターではシスプラチン、TW-37 併用投与により単剤投与よりもアポトーシスの増加が認められた。特に IC₅₀ を超える濃度の TW-37 投与により

細胞周期における S 期の延長がみられ、この濃度の TW-37 とシスプラチンの併用投与により増強効果がみられた。*in vivo* ではシスプラチン、TW-37 併用投与により単剤投与よりも高い腫瘍抑制効果がみられた。また腫瘍内での血管新生抑制、アポトーシス増加も併用投与群に高い効果がみられた。

[考察]

低分子 Bcl-2 阻害剤の抗腫瘍効果は、腫瘍細胞に対する向アポトーシス作用と血管新生抑制作用によるものと推察した。血管新生を抑制するという仮説は我々が報告した (a) Bcl-2 は血管内皮細胞において NF- κ B を介し、血管新生促進物質である CXCL1 と CXCL8 をアップレギュレーションするシグナル伝達経路を開始する (b) アポトーシスを起こす濃度以下の TW-37 で血管新生を抑制する (c) 血管内皮細胞においてアポトーシスを起こす濃度以下の TW-37 の投与により CXCL1 と CXCL8 の発現を抑制する、という結果に基づいている。実際我々は gene silencing による血管内皮細胞での Bcl-2 機能抑制により腫瘍増殖抑制を認めている。これらのことから今回 TW-37 が頭頸部癌に対しても抗腫瘍効果、血管新生抑制効果がみられたと考えられた。また多剤による併用効果をみるためシスプラチンを使用したところ抗腫瘍効果、血管新生抑制効果ともに上乘せ効果がみられ、TW-37 の臨床応用が期待された。

[結論]

新しいタイプの分子標的薬、低分子 Bcl-2 阻害剤である TW-37 が頭頸部癌に対して抗腫瘍効果、血管新生抑制効果を示すことが認められた。またシスプラチンと併用することによりその効果が増強されることが分かった。併用効果増強の理由の一つとして、TW-37 は細胞周期における S 期の延長を誘導し、シスプラチンの感受性を高めていることが示唆された。将来的に頭頸部癌の臨床においてもその効果が期待される。

論文審査の結果の要旨

抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 family は多くの癌細胞で過剰発現しており、化学療法・放射線療法抵抗性に関与する。申請者は低分子 Bcl-2 阻害剤である TW-37 が血管内皮細胞の増殖を抑制することを以前の研究で確認しており、本研究では頭頸部扁平上皮癌における腫瘍血管新生抑制効果と化学療法剤との併用による抗腫瘍効果の増強作用について明らかにすることを目的とした。標的癌細胞として頭頸部扁平上皮癌細胞 3 株を、化学療法剤としては CDDP を用い、*in vitro*、*in vivo* による実験を行い、以下の結果を得た。①血管内皮細胞、頭頸部扁平上皮癌細胞に対する IC₅₀ は CDDP は 2 μ M、TW-37 はそれぞれ 1.1 μ M、0.2~0.3 μ M であった。②TW-37 が IC₅₀、IC₅₀ 以上で CDDP との併用により相加的、相乗的な増殖抑制効果を示した。③CDDP と TW-37 の併用投与によりアポトーシスの増加を認め、TW-37 を IC₅₀ を超える濃度で投与した場合に S 期の延長が見られた。④併用によりマウス移植腫瘍に対して単独よりも強い腫瘍抑制効果、血管新生抑制効果、アポトーシス誘導が見られた。

以上の結果から申請者は以前得られた結果も鑑みて、TW-37 は頭頸部癌細胞には向アポトーシス作用を示し、血管内皮には CXCL1、CXCL8 の発現を抑制することにより血管新生抑制作用を示すものと推察した。さらに TW-37 による S 期延長作用も CDDP との併用効果を高める要因であ

ると推論した。

審査委員会では頭頸部扁平上皮癌に対する分子標的療法薬 TW-37 の作用機序、および CDDP との併用効果を明らかにしたことを高く評価した。

論文審査担当者	主査	今野 弘之		
	副査	北川 雅敏	副査	橋本 賢二