

土井 誠志 論文内容の要旨

主 論 文

The histone deacetylase inhibitor FR901228 induces caspase-dependent apoptosis via the mitochondrial pathway in small cell lung cancer cells

ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 FR901228 は小細胞肺癌株においてミトコンドリア経路を通じてカスパーゼ依存性のアポトーシスを誘導する

土井 誠志、早田 宏、岡 三喜男、鶴谷 純司、北崎 健、
中村 洋一、上平 憲、河野 茂

(Molecular Cancer Therapeutics 2004;3(11):1397-1402)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：河野 茂教授)

緒 言

ヒストンはDNAを含むヌクレオソームの中心となる蛋白であり、そのアセチル化はヒストンアセチル基転移酵素 (Histone acetyltransferase;HAT) とヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylase;HDAC)により調節されている。HDACを阻害することはDNAの構造を変化させ、遺伝子の転写を修飾する。

FR901228 (depsipeptide)はHDAC阻害薬であり、いくつかの癌細胞に対して分化・細胞死を誘導する。我々はFR901228により小細胞肺癌細胞株の増殖が抑制されることを報告したが、FR901228により起こる細胞死の詳細についてはまだ十分解明されていない。アポトーシスはカスパーゼによって主に調節されており、その経路としてデスレセプター経路とミトコンドリア経路の2つがある。デスレセプター経路においてはカスパーゼ8, 3が関与し、ミトコンドリア経路ではミトコンドリアからのチトクロムcの放出によりApaf-1、カスパーゼ9が活性化し、その後カスパーゼ3が活性化され細胞死を起こす。BCL-2ファミリーはミトコンドリアからのチトクロムcの放出を調節していると言われ、同ファミリーのうちBAXがチトクロムcの放出を促進する一方、BCL-2、BCL-XLは放出を抑制している。今回我々はFR901228によるカスパーゼ依存性

アポトーシスがBCL-2、BCL-XL発現の低下を伴うミトコンドリア経路によるものであることを示した。

対象と方法

小細胞肺癌細胞株として H69、H526、PC6 を用いた。生存細胞の測定には WST-1 assay を用いた。アポトーシスの証明のため細胞死を示す sub-G1 期の測定を行い、また DNA の分節化を電気泳動で評価した。カスパーゼ活性（カスパーゼ 3, 8, 9）を colorimetric assay にて測定し、FR901228 によるアポトーシス阻害にカスパーゼ 3 阻害薬（Z-DEVD-fmk）を用いた。bcl-2、bcl-xL、bax の m-RNA 発現量を RT-PCR、また BCL-2、BCL-XL、BAX 蛋白発現を Western blot にて評価した。また FR901228 と bcl-2 アンチセンスを併用した抗腫瘍効果の増強について検討した。

結 果

小細胞肺癌細胞株 H69、H526、PC-6 は FR901228（1-10nmol/L）の投与にて用量依存性に増殖が抑制された。細胞周期については FR901228 投与にて sub-G1 期の増加、また細胞株 DNA の分節化が見られアポトーシスを生じたと考えられた。colorimetric assay にてカスパーゼ 3 活性は FR901228 投与にて上昇が見られた。FR901228 とカスパーゼ 3 阻害薬併用によりカスパーゼ 3 の活性が低下、それに伴い抗腫瘍効果が抑制された。以上から FR901228 はカスパーゼ依存性の細胞死を起こすと考えられた。FR901228 投与により各細胞株においてカスパーゼ 3, 9 活性の上昇を認めたがカスパーゼ 8 の活性は上昇せず、ミトコンドリア経路によるアポトーシスと考えられた。FR901228 投与により bcl-2、bcl-xL m-RNA の抑制が見られたが bax の抑制は見られず、蛋白レベルでも同様の結果だった。蛋白合成阻害薬であるシクロヘキサミド投与にて FR901228 投与による bcl-2 m-RNA 発現抑制が阻害され、FR901228 による bcl-2 の抑制には何らかの別な蛋白の合成が必要であると考えられた。小細胞肺癌細胞株に bcl-2 アンチセンスを導入したところ、FR901228 によるカスパーゼ 3 活性の上昇、抗腫瘍効果の増強が見られた。

考 察

小細胞肺癌の治療に対してさまざまな薬剤に対する耐性が主要な障害となっている。薬剤耐性に関与すると考えられている BCL-2、BCL-XL の発現を FR901228 は抑制するため、未治療症例とともに治療抵抗性の小細胞肺癌に対して臨床的に有用である可能性がある。