

## B細胞腫瘍に対する新規併用化学療法の基礎的検討

国立病院機構名古屋医療センター

臨床研究センター 流動研究員 萩原 和美

### 【研究の背景・目的】

近年の研究により、B細胞リンパ腫の治療成績は大きく向上している。しかし、再発・難治症例や薬剤耐性の獲得などに対抗するため、新規薬剤の開発や適切な併用化学療法を考案することは重要である。そこで本研究では、ベンダムスチンと BCR シグナル伝達経路阻害剤併用法の殺細胞効果を検討し、その有効性の評価と細胞死の分子メカニズムの解析を行った。ベンダムスチンは、これまでに単剤または併用による高い抗腫瘍効果が示されている DNA アルキル化剤である。一方 B 細胞抗原受容体 (BCR) を介したシグナル伝達経路は、その恒常的活性化が B 細胞リンパ腫細胞の生存や増殖に必須であり、この経路を標的とする各種阻害剤の単剤での効果が報告されている。しかし他の薬剤との併用法の検討はあまり行われていない。作用機序や標的を異にするこれら薬剤の併用は、より高い抗腫瘍効果を得られる可能性があり、新規治療法の確立につながると期待できる。

### 【結果】

本研究では、マントル細胞リンパ腫細胞株 Jeko-1、Mino を用いて実験を行った。ベンダムスチンと併用する BCR シグナル伝達経路阻害剤は、Syk 阻害剤 R406、Btk 阻害剤 PCI-32765、PKC-β阻害剤 Enzastaurin の 3 種類を検討した。ベンダムスチンと BCR シグナル阻害剤を併用して 48 時間処理し、MTT assay にて細胞増殖を測定した。この結果より、併用処理による増殖抑制効果が相乗的であるかどうか Combination Index (CI) を算出して評価すると、Jeko-1 細胞ではベンダムスチンと PCI-32765 を併用したとき  $CI = 0.437$  となり、相乗的な抑制効果を示すことが明らかとなった (Figure 1)。同様に Mino 細胞を用いて検討したところ、併用処理により増殖は強く抑制されるが、その効果はいずれの併用においても相乗的ではなかった。よって Jeko-1 細胞を用いてさらに解析を進めた。ベンダムスチンと PCI-32765 を併用処理したとき誘導される細胞死について Annexin V/PI 染色によるフローサイトメトリー解析を行ったところ、48 時間の併用処理により Annexin V 陽性 PI 陰性細胞（初期アポトーシス細胞）が顕著に増加していた (Figure 2)。アポトーシス関連タンパクの発現を検討すると、併用処理サンプルにお

いて Caspase-3 の活性化およびその基質 PARP の分解産物の増加がみとめられた(Figure 3)。これらの結果より、ベンダムスチンと PCI-32765 併用処理により Caspase-3 を介したアポトーシスの誘導が増強されていると考えられた。細胞内シグナル経路に関連するタンパク発現を解析したところ、Akt (Ser473) リン酸化の減少がみとめられ(Figure 3)、細胞内の主要な生存シグナルの一つである PI3K/Akt 経路が抑制されていることが明らかとなった。

【今後の実験計画】

今年度の研究により、マントル細胞リンパ腫細胞株 Jeko-1 において、ベンダムスチンと Btk 阻害剤 PCI-32765 併用は、Akt リン酸化の抑制を介して、アポトーシスを促進し細胞増殖を抑制している可能性が示された。Akt リン酸化の減少によるアポトーシスの促進メカニズムを明らかにするため、併用処理サンプルにおける Akt 下流の標的分子の発現およびリン酸化状態を解析し、これら結果をまとめて論文投稿する予定である。

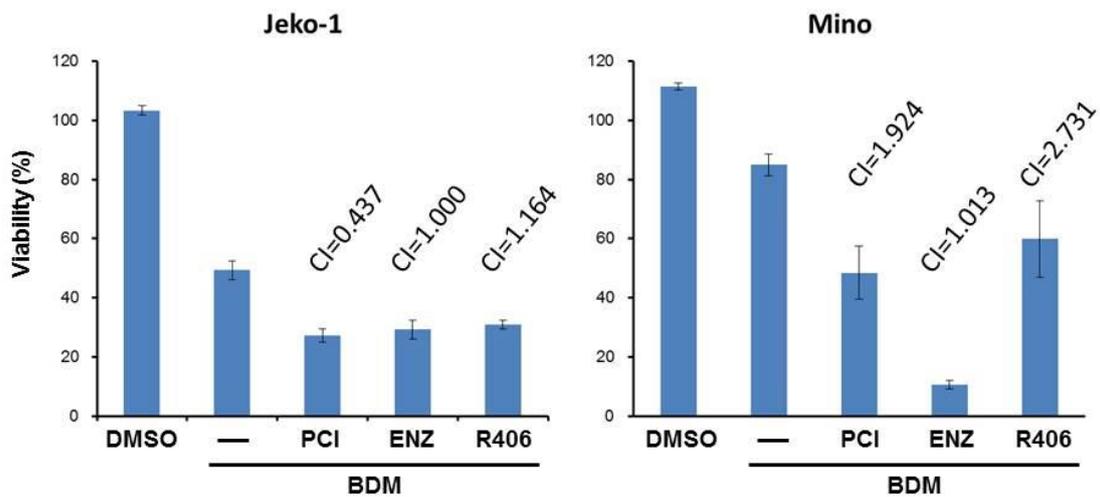


Figure 1 併用処理による相乗効果の検討

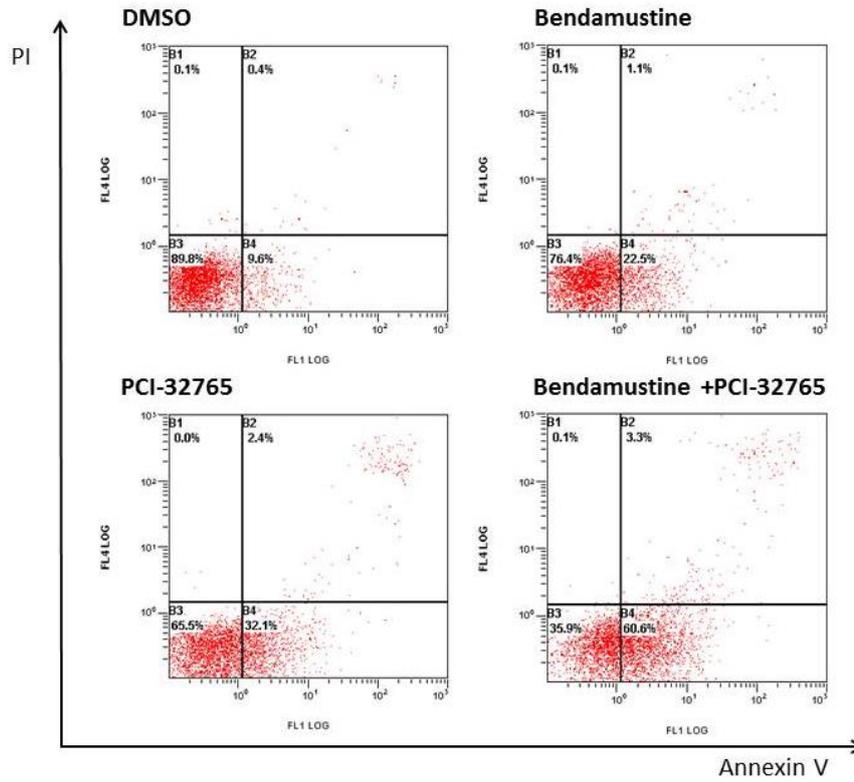


Figure 2 Annexin V/PI 染色によるアポトーシス細胞の検出

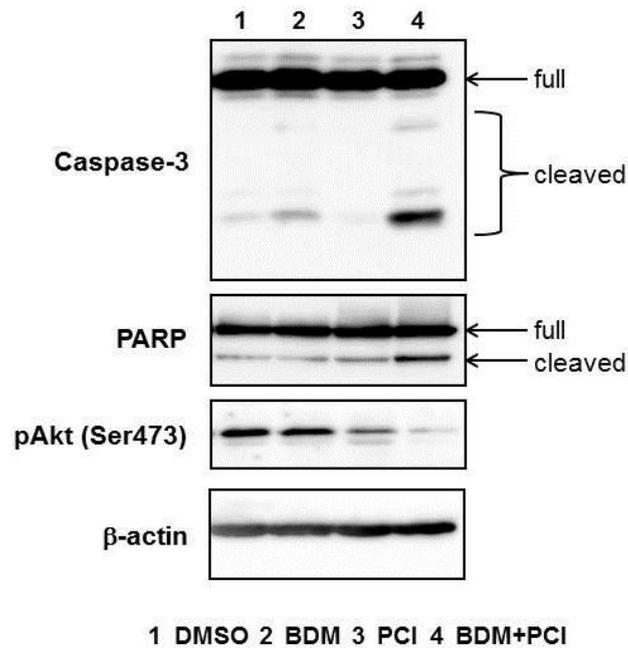


Figure 3 Western Blottingによる蛋白発現解析