

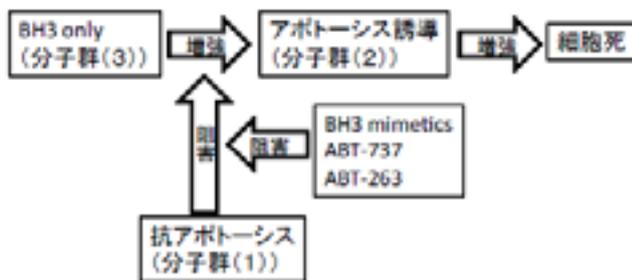
## BH-3 mimetic を用いた軟骨肉腫に対する新規分子標的治療の開発

森 井 健 司

杏林大学医学部整形外科

BCL-2 family は、ミトコンドリアに関連して発生するアポトーシスを制御している蛋白質群を総称する。共通構造物として  $\alpha$  ヘリックス構造をもつ BH (BCL-2 homology) domains のいくつかを保有しており、(1) 抗アポトーシス効果を持つもの (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL), (2) アポトーシス誘導効果を持つもの (Bax, Bak) および、(3) BH3 only と呼ばれ上記 (2) の蛋白質群の作用を増強するもの (Bad, Noxa, Bim, And, Bid) の 3 群に分類される。分子群 (1) は分子群 (3) と結合して分子群 (2) のアポトーシス誘導を抑制する (Chonghaile TN, et al. Oncogene 27 Suppl 2008; 1: S149-157.)。

が同定されるとともに、この結合の阻害はアポトーシスを誘導することが明らかとなった。近年 BH3 only に類似した阻害物質 (BH-3 mimetic) を人工的に合成し、悪性腫瘍にアポトーシスシグナルを誘導することが試みられている (Oltersdorf T, et al. Nature 2005; 435: 677-681.)。これら新規合成物質のひとつ ABT-737 は CML, AML, 腎細胞癌, 前立腺癌, 骨髄腫, 肺小細胞癌などの培養細胞にアポトーシスを誘導する。また同薬剤を経口投与可能となるように改変した ABT-263 は ALL や肺癌モデルで有効性が確認され、第 1 相臨床試験が開始されている (Wilson WH, et al. J Clin Oncol 26 8511 2008; (ASCO proceeding))。しかし悪性骨腫瘍に関しての検討は行われていない。そこで私は現在有効な補助療法が確立されていない軟骨肉腫の制御に、本物質が有効であるかどうかを検証した。



骨軟部腫瘍を含む多くの癌細胞では、正常細胞と比べて、抗アポトーシスシグナルが亢進しており、Bcl-2 family をターゲットとした治療法が模索されてきた。近年 Bcl-xL の構造解析より、同分子の BH3 only 結合部位

軟骨肉腫細胞株は CS-1 および SW1353 を用いた。BH-3 mimetic は ABT-263 および ABT-737 を使用した。アポトーシス制御関連蛋白質の細胞株における発現、とくに BH-3 mimetic のターゲットである Bcl-2, Bcl-xL や効果発現に必須である Bax や Bad の発現を Western blot で検証した。次に BH-3 mimetic の軟骨肉腫に対する活性を検証するため種々の濃度で同物質を軟骨肉腫細胞株に作用させ、顕微鏡下での形態の観察を経時的に行った。また細胞の増殖を MTS assay により検証した。さらに同薬剤が実際にアポトーシスを細胞に誘発しているかを ELISA および caspase3 および 9 の cleavage により解析した。

軟骨肉腫細胞株においては BH-3 mimetic のターゲットとなりうる Bcl-2 や Bcl-xL の発現が確認された。また

BH-3 mimetic が効果を発現する上で分子内に存在が必須である pro-apoptotic protein である Bax や Bad も発現していることが確認された。

顕微鏡下の観察において BH-3 mimetic の作用時間や濃度に依存して、軟骨肉腫細胞の増殖が阻害された。MTS assay では濃度依存的に細胞株の増殖が阻害されていることが確認された。

ELISA において BH-3 mimetic は軟骨肉腫細胞株に DNA の fragmentation を誘発していることが確認された。また Western blot により BH-3 mimetic は caspase3 および 9 の cleavage を誘発していることが確認された。以上より BH-3 mimetic が軟骨肉腫細胞株に apoptosis を誘発していることが示唆された。

近年の化学療法，画像診断，外科的治療技術の進歩

により，悪性骨軟部腫瘍の治療成績は著しく向上した。しかし既存の化学療法に反応しない症例においてはいまだ予後不良例が存在しており，効果的な補助療法の確立はその治療成績の向上に不可欠である。BH-3 mimetic の特性を骨軟部腫瘍の治療に応用することを目的として軟骨肉腫細胞株に対する作用を *in vitro* で解析した。今回の検討から BH-3 mimetics は軟骨肉腫において有用な補助療法の一つの選択肢となりうることが示された。臨床応用に向けてさらに検討を重ねる予定である。

#### List of publications

(現在投稿準備中)

#### 講演記録

1. 演題名「BH-3 mimetic を用いた軟骨肉腫に対する新規補助療法の開発」(第 27 回日本整形外科学会基礎学術集會に採択され 平成 24 年 10 月 27 日 名古屋にて発表予定です)