

MEK 阻害剤と微小管重合阻害剤の併用による がん細胞死誘導増強の分子機構

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻

川畠 拓誠

【目的】当研究室では多くのヒト固形がんにおいて ERK-MAP キナーゼ経路が恒常に活性化していることに注目し、ERK-MAP キナーゼ経路の選択的遮断が「制がん」につながる可能性を検討してきた。MEK 阻害剤を利用して ERK-MAP キナーゼ経路を遮断することで、その異常亢進が認められるがん細胞の増殖は完全に抑制されるが、それだけでは有意な細胞死誘導に至らない。そこで、他の作用機序を持つ細胞増殖阻害物質と組み合わせることで、より有効な制がん効果（細胞死誘導の相乗的増強）が得られる可能性を検討した結果、MEK 阻害剤と併用することで、ERK-MAP キナーゼ経路が恒常に活性化されているがん細胞において特徴的に、微小管重合阻害剤の細胞死誘導効果が極めて顕著に増強されることを見出している。本研究では、MEK 阻害剤と微小管重合阻害剤の併用による細胞死誘導増強の分子機構を明らかにする目的で、以下の解析を進めた。

【方法・結果】本研究では ERK-MAP キナーゼ経路の恒常的活性化が認められるヒトがん細胞株（纖維肉腫由来 HT-1080 細胞など）を用いて、微小管重合阻害剤（低濃度の Vincristine など）と MEK 阻害剤（PD0325901 など）の併用による細胞死誘導の分子機構を検討した。微小管重合阻害剤の細胞増殖阻害作用は紡錘体微小管崩壊による M 期停止によるとされている。一方、MEK 阻害剤による ERK-MAP キナーゼ経路の遮断は G1 期停止を誘導する。このように、細胞周期に対する各薬剤の作用点が異なることから、両薬剤併用による細胞死が細胞周期のどの時点から誘導されるかを明らかにする目的で、HT-1080 細胞株を薬剤処理した後、各条件下 100 個以上の細胞の動態を Time lapse 顕微鏡で 48 時間まで経時的に観察した。その結果、①Vincristine 処理によって M 期停止が誘導されるが、多くの細胞では細胞死に至らず、次の周期に進行する、②PD0325901 処理は最初の M 期進行には影響を及ぼさないが、M 期通過後に顕著な G1 期停止を誘導する、③両薬剤を併用処理した際には、顕著な M 期停止の後に細胞死が誘導され、細胞死に至る時間も短縮されることを見出した（図 1）。次に、両薬剤処理により誘導された M 期停止が細胞死誘導に連動する可能性を検討する目的で、Metaphase から Anaphase への進行を制御するチェックポイント、Spindle Assembly Checkpoint (SAC) の構成分子、Mad2 あるいは BubR1 を siRNA 法によりノックダウンした際、細胞周期動態、および細胞死がどのように影響されるかを解析した。その結果、上記いずれの条件下においても両薬剤併用処理による M 期停止が起こらず、細胞死誘導も顕著に抑制された。なお、通常の条件下では、がん細胞を両薬剤で同時処理している。一方、PD0325901 を先行処理して G1 期停止を誘導した後、Vincristine 処理を行った際には、両薬剤併用による細胞死誘導がほぼ完全に抑制された。さらに、他の作用機序によって M 期停止を誘導する幾つかの薬剤（微小管脱重合阻害剤 [Paclitaxel]、キネシン 5 阻害剤 [Monastrol]、Polo-like kinase 阻害薬 [Plk inhibitor III]）の細胞死誘導作用も、MEK 阻害剤との併用によって大幅に増強された。これより、上記薬剤併用による細胞死誘導増強においては、SAC の機能を介した M 期停止が必須の役割を果たしている可能性が示唆された。

Figure 1. The combination of a MEK inhibitor and a microtubule inhibitor induces pronounced cell death during prolonged mitotic arrest in tumor cells. Exponentially growing HT-1080 cells were treated with the indicated agents and observed by time-lapse microscopy, with images being acquired every 5 min for 48 h. Fate profiles of 100 representative cells are shown for each condition, with each horizontal line representing one cell, the length of the line denoting the duration of a given behavior, and the color of the line representing the behavior. VCR, vincristine; VNR, vinorelbine; PTX, paclitaxel.

次に、微小管重合阻害剤と MEK 阻害剤の併用処理で誘導された M 期停止以降、細胞死に至る反応過程について、様々な Apoptosis 関連分子の変動に焦点を当てて解析した。その結果、Vincristine 処理で M 期に停止させた細胞においては、Bcl-2 ファミリーに属する Apoptosis 抑制分子、Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) の発現量が経時的に減少し、それは PD0325901 との併用処理でより顕著になること、一方、PD0325901 処理した細胞においては、Bcl-2 ファミリーに属する Apoptosis 促進分子、Bim の発現量が顕著に上昇することを見出した。そこで、両薬剤併用処理による顕著な細胞死誘導における Mcl-1 および Bim の役割に焦点を当てて解析を進めた。その結果、(1) siRNA 法により Bim をノックダウンした細胞では、両薬剤併用による細胞死誘導がほぼ完全に抑制される、(2) Mcl-1 のユビキチン E3 リガーゼである Mule をノックダウンして Mcl-1 の分解を抑制した際にも、両薬剤併用による細胞死誘導が抑制されることを見出した。なお、MEK 阻害剤処理で Bim の発現量が増加するにもかかわらず、それだけでは有為な細胞死誘導に至らない。また、低濃度の微小管重合阻害剤処理で Mcl-1 の発現量を減少させただけでも、顕著な細胞死誘導にはつながらない。そこで、各薬剤処理に応答した Bim と Mcl-1 の発現量変動の結果、両薬剤併用処理したがん細胞内における両分子間の存在量のバランスが大幅に Bim の方に傾き、これが顕著な細胞死誘導において本質的な役割を果たしている可能性を考え、さらに解析を進めた。その結果、(i) siRNA 法を利用して Mcl-1 をノックダウンした HT-1080 細胞に対して、MEK 阻害剤は単独で極めて強力な殺細胞効果を示す、(ii) それは Bim のノックダウンによりほぼ完全に抑制される事を明らかにした。

【結論・考察】本研究より、①ERK-MAP キナーゼ経路が恒常に活性化されているがん細胞において、MEK 阻害剤処理で ERK-MAP キナーゼ経路を選択的に遮断することで、微小管重合阻害剤を含む様々な M 期作用薬の細胞死誘導効果が大幅に増強されること、②MEK 阻害剤と微小管重合阻害剤の併用による顕著な細胞死は、がん細胞内における Apoptosis 促進分子 (Bim : MEK 阻害剤がその発現亢進に関与) と Apoptosis 抑制分子 (Mcl-1 : 微小管重合阻害剤と MEK 阻害剤がその発現抑制に関与) の量的バランスの崩壊 (Apoptosis 促進分子の大過剰) を介して誘導されることが明らかとなった(図2)。これらの知見は、ERK-MAP キナーゼ経路が恒常に活性化されている「がん」に対する極めて有効な「がん化学療法」の開発において、新たな分子標的を提示するとともに、その理論的基盤の確立に向けて確かな一歩となるものであると考えている。

Figure 2. A proposed mechanism of enhanced cell death induction by the combination of a MEK inhibitor and a microtubule inhibitor in tumor cells with constitutive ERK-MAP kinase pathway activation.

【基礎となった学術論文】

1. Kawabata, T., Tanimura, S., Asai, K., Kawasaki, R., Matsumaru, Y. & Kohno, M. Up-regulation of pro-apoptotic Bim and down-regulation of anti-apoptotic Mcl-1 cooperatively mediate the enhanced tumor cell death induced by the combination of a MEK inhibitor and a microtubule inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 287: in press, 2012.

(参考論文)

1. Tanimura, S., Uchiyama, A., Watanabe, K., Kawabata, T., Ozaki, K. & Kohno, M. Blockade of constitutively activated ERK signaling enhances cytotoxicity of microtubule-destabilizing agents in tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378: 650-655, 2009.
2. Watanabe, K., Tanimura, S., Uchiyama, A., Sakamoto, T., Kawabata, T., Ozaki, K. & Kohno, M. Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway enhances the therapeutic efficacy of microtubule-destabilizing agents in human tumor xenograft models. *Clin. Cancer Res.*, 16: 1170-1178, 2010.