

平成25年 2月

# 清水幸恵 学位論文審査要旨

主査 大野耕策  
副主査 兼子幸一  
同 渡辺高志

## 主論文

Proteasome inhibitor MG132 induces NAG-1/GDF15 expression through the p38 MAPK pathway in glioblastoma cells

(プロテアソーム阻害薬MG132は膠芽腫細胞においてp38MAPK経路を介してNAG-1/GDF15の発現を誘導する)

(著者：清水幸恵、門脇光俊、吉岡裕樹、神部敦司、渡辺高志、H. Karimi Kinyamu、Thomas E. Eling)

平成25年 Biochemical and Biophysical Research Communications 430巻  
1277頁～1282頁

## 参考論文

1. 三叉神経痛を呈した小脳橋角部類上皮腫の1例

(著者：清水幸恵、黒崎雅道、渡辺高志)

平成23年 CI研究 33巻 127頁～131頁

# 学 位 論 文 要 旨

Proteasome inhibitor MG132 induces NAG-1/GDF15 expression through the p38 MAPK pathway in glioblastoma cells

(プロテアソーム阻害薬MG132は膠芽腫細胞においてp38MAPK経路を介してNAG-1/GDF15の発現を誘導する)

Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 (NAG-1) は、多くの抗腫瘍効果を示す薬剤によって誘導されるが、そのメカニズムは十分には理解されていない。NAG-1トランスジェニックマウスは、前立腺癌や大腸癌に対し抵抗性を示すことからNAG-1は腫瘍抑制因子である事が示唆される。またプロテアソーム阻害薬は、臨床前試験にて膠芽腫に対し抗腫瘍効果を示す事が報告されている。本研究では、プロテアソーム阻害薬MG132とボルテゾミブが、膠芽腫細胞においてNAG-1の発現とその分泌を引き起こすことを明らかにした。p38MAPK経路を介して引き起こされるNAG-1の発現は、プロテアソーム阻害薬の膠芽腫に対する抗腫瘍効果に寄与している可能性が示唆される。

## 方 法

実験には市販のヒト膠芽腫細胞株と薬剤を使用した。培養細胞内におけるNAG-1前駆タンパクの発現はウエスタンブロッティングにて確認し、培養液中に分泌されたNAG-1タンパクの濃度はEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) により定量した。細胞内NAG-1 mRNAレベルはReverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) により測定し、NAG-1プロモーター活性はルシフェラーゼ定量システムを用いて解析した。また、ヨウ化プロピジウム染色によるフローサイトメトリー解析にてSub-G1期細胞の同定を行った。統計解析には両側2標本の *t* 分布検定を行い、*p* 値が0.05未満で有意差ありと判定した。

## 結 果

プロテアソーム阻害薬MG132とボルテゾミブは、膠芽腫細胞においてNAG-1 mRNAとそのタンパク発現を誘導した。MG132は、U87MG細胞においてSub-G1期の細胞数の増加を引き起こした。NAG-1遺伝子をノックダウンすると、MG132によって引き起こされるSub-G1期の細胞数は減少した。以上より、NAG-1はMG132が誘導する膠芽腫の細胞死に関与している事が示唆された。MG132によるNAG-1の誘導は薬剤濃度と投与時間に依存していた。その誘導メカ

ニズムとして、NAG-1プロモーターの-133から+41領域を介して転写活性が行われる事が確認された。また、MG132はNAG-1 mRNAを安定化させ、その半減期を1.5時間から8時間以上に増加させた。さらに、p38MAPK阻害薬の併用やp38遺伝子のノックダウンによってMG132によるNAG-1の発現誘導が減少した事から、介在するシグナル伝達経路としてp38MAPK経路が示唆された。

## 考 察

p53はNAG-1誘導の重要な伝達経路として関わっているが、膠芽腫の約35%程度で変異が認められる。故に、p53経路を介さない治療薬の開発が重要となる。最近の報告によると、MG132はp38MAPK経路を含む種々の伝達経路を活性化させて膠芽腫の細胞死を誘導し、その増殖を抑制する。p38MAPKシグナル伝達経路を介したNAG-1誘導は、MG132の膠芽腫に対する腫瘍抑制効果に重要な役割を担っていると思われる。

mRNAの安定化によるNAG-1発現誘導メカニズムは膠芽腫において重要である。膠芽腫ではNAG-1プロモーター領域における高度なメチル化がしばしば確認される。この高度なメチル化によって、非ステロイド性解熱鎮痛剤などの抗腫瘍効果を示す薬剤のNAG-1誘導は阻害され、これら薬剤がもたらす抗腫瘍効果に耐性が生じる事が報告されている。MG132は主に転写後メカニズムによってNAG-1を誘導するため、NAG-1プロモーターが高度にメチル化した膠芽腫においてもMG132によるNAG-1の発現効果が期待できる。

NAG-1は腫瘍抑制因子としてMG132が引き起こす膠芽腫の細胞死に関与している事が示唆される。膠芽腫細胞においてNAG-1の発現は星細胞に比べ低く、また薬剤投与にて誘導されたNAG-1が、腫瘍の細胞死や増殖抑制に関与していると報告されている。一方、マウス膠芽腫細胞株においてNAG-1は腫瘍増殖を促進するという説や、膠芽腫患者の脳脊髄液中のNAG-1タンパク濃度の上昇が、患者の予後と相関するという報告もある。しかし癌の晩期相においてNAG-1は腫瘍増殖を促進しているのではなく、腫瘍増殖の結果として上昇しているとも考えられる。膠芽腫におけるNAG-1の役割について更なる検討が必要である。

## 結 論

プロテアソーム阻害薬の膠芽腫に対する新しい作用機序としてp38MAPK経路を介したNAG-1の発現誘導を明らかにした。この作用機序の応用は、膠芽腫治療の改善と発展に対する重要な貢献となることが期待される。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は膠芽腫細胞を用いて、プロテアソーム阻害薬の新しい抗腫瘍メカニズムとして、腫瘍抑制因子であるNAG-1との関連性を検討したものである。その結果、プロテアソーム阻害薬MG132とボルテゾミブが、膠芽腫細胞においてNAG-1の発現とその分泌を引き起こすことを明らかにした。p38MAPK経路を介して引き起こされるNAG-1の発現は、プロテアソーム阻害薬の膠芽腫に対する抗腫瘍効果に寄与している可能性が示唆された。本論文の内容は、分子生物学を含めた脳腫瘍の分野で、新規治療薬としてのプロテアソーム阻害薬とNAG-1の有用性を示唆するものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。