

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 飯塚 まひろ

### 論文題目

Blockage of the mevalonate pathway overcomes the apoptotic resistance to MEK inhibitors with suppressing the activation of Akt in cancer cells

### 論文内容の要旨

多くの癌において MEK 経路が活性化していることから、癌の分子標的薬として MEK 阻害剤の適応拡大が期待されるなか、その耐性化機序の解明と克服は喫緊の課題である。MEK 阻害剤の耐性化機序の一つとして、MEK 経路阻害に伴って惹起される Akt 経路の活性化が問題視されているが、临床上、安全で有効な Akt 経路阻害剤は未だ開発されていないのが現状である。一方、メバロン酸経路はコレステロール生合成をつかさどる重要な代謝経路であると同時に、Rho、Rac、Ras といった低分子 G タンパク質をプレニル化することで、Akt 経路を含む下流の増殖シグナル経路を正に制御していることが知られている。今回、申請者らは、高コレステロール血症治療薬として汎用されているスタチンによるメバロン酸経路の抑制が、Akt 経路の活性化を抑制し、癌細胞に対する MEK 阻害剤のアポトーシス耐性を解除することを見出した。

まずヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 に対し、MEK 阻害剤 CH5126766 とフルバスタチンあるいはシンバスタチンを併用処理したところ、細胞増殖およびコロニー形成の抑制効果を認めた。次にこれら二剤併用処理により、sub-G1 細胞の増加および PARP の切断を認めたことから、MEK 阻害剤とスタチンの併用によりアポトーシスが誘導されたと考えられた。さらに CH5126766 処理後 24 時間後において、Akt がリン酸化され活性化されたが、スタチンはこの Akt のリン酸化を抑制した。またヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 およびヒトメラノーマ細胞株 SK-MEL-28 に対し、MEK 阻害剤 trametinib とフルバスタチンを併用処理した場合においても、同様の現象が確認された。

次に MEK 阻害剤とスタチン併用により誘導されたアポトーシスのメカニズムについて解析した。MDA-MB-231 細胞において、CH5126766 とスタチンにより誘導された sub-G1 細胞は、pan-caspase 阻害剤 z-VAD-fmk の添加により打ち消されたことから、これらのアポトーシスがカスパーゼ依存性であることが示唆された。さらに、CH5126766 とスタチンの併用により、抗腫瘍性サイトカインの一つである TRAIL が MDA-MB-231 細胞内において誘導されることを見出した。TRAIL をノックダウンした MDA-MB-231 細胞においては二剤併用時の sub-G1 細胞の誘導が減弱したため、TRAIL がアポトーシス誘導に少なくとも一部寄与することが示唆された。

続いて、MEK 阻害剤とスタチンの併用効果が、スタチンの on-target な作用によるもの

かどうか、即ち、メバロン酸経路抑制作用に依存するのかどうかについて、メバロン酸経路の中間代謝物であるメバロン酸を用いて検証した。MDA-MB-231 細胞において CH5126766 とスタチンによる sub-G1 細胞の誘導および PARP の切断はメバロン酸の添加によって打ち消され、さらに、CH5126766 によって増強した Akt の活性をスタチンが抑制する作用も、メバロン酸の添加により相殺された。また A549 細胞および SK-MEK-28 細胞においても、trametinib とフルバスタチンによる sub-G1 細胞の誘導がメバロン酸の添加により打ち消されたため、これら一連の併用効果はスタチンがメバロン酸経路を抑制することによる on-target の作用であると考えられた。

さらにメバロン酸経路の最終代謝産物として、コレステロールの他に、ファルネシルニリン酸とゲラニルゲラニルニリン酸が知られているが、これらのうち MEK 阻害剤のアポトーシス感受性増強に最も関連する経路を同定するために以下の実験を行った。CH5126766 とフルバスタチンを併用処理した MDA-MB-231 細胞に、コレステロール、ファルネシルニリン酸、ゲラニルゲラニルニリン酸の各々を添加したところ、ゲラニルゲラニルニリン酸の添加においてのみ、sub-G1 細胞の誘導効果、PARP の切断および Akt 活性の抑制が打ち消されることが示された。さらに、ゲラニルゲラニルニリン酸によるゲラニルゲラニル化を阻害するゲラニルゲラニルトランスフェラゼ阻害剤と CH5126766 を併用したところ、スタチン同様、sub-G1 細胞の誘導および Akt 活性の抑制が認められた。以上の結果から、ゲラニルゲラニル化を阻害することで MEK 阻害剤へのアポトーシス感受性増強をもたらすことが示唆された。

以上の通り、申請者らの研究により、MEK 経路とメバロン酸経路の両経路の阻害により、癌細胞に対し、アポトーシスを惹起することが明らかになった。そのメカニズムとして、メバロン酸経路の阻害、特にゲラニルゲラニル化の阻害により、MEK 阻害剤が誘導する Akt 経路の活性化が抑制されることが示された。また今回、MDA-MB-231 細胞に対して用いた CH5126766 およびフルバスタチンの濃度は、生体内で達成可能な濃度であることを考えれば、本研究は将来的に MEK 阻害剤とスタチンの併用臨床試験を積極的に計画する端緒となる研究として位置づけられる。