

(表紙)

表 題 新規抗腫瘍薬ベンダムスチンの作用機序の解明

論文の区分 博士課程

著 者 名 平岡 信弥

担当指導教員氏名 古川 雄祐 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系 専攻  
血液・免疫疾患学 分野  
造血発生学

2014年 1月 10日申請の学位論文

## 目次

要約	2 p
背景および目的	4 p
実験材料および方法	9 p
結果	13 p
考察	30 p
参考文献	33 p

## 要約

再発難治性血液腫瘍治療に有効な新たな薬剤の開発が望まれている。

ベンダムスチンは、DNA アルキル化作用を持つ nitrogen mustard group、核酸類似の構造である benzimidazole ring、水溶性に寄与するとされる alkane carboxylic acid からなる化合物である。その構造からアルキル化作用と代謝拮抗作用を併せ持つ薬剤として開発され、1960 年代から旧東ドイツでリンパ腫治療に用いられてきた。近年になり、多剤耐性の血液腫瘍に有効性を示し、単剤で従来の標準併用化学療法と同等の治療効果を示すなどの特徴が再発見され、新たな治療選択の一つとして注目されている。

ベンダムスチンの臨床的有効性を十分に説明可能な作用機序は明らかになっていない。ベンダムスチンは一般的なアルキル化剤と比較して速く、強い DNA 傷害を引き起こし、アルキル化剤間での交叉耐性は少ないとされる。また、アルキル化剤や代謝拮抗薬などの従来の抗腫瘍薬と比較して、抗腫瘍スペクトルや誘導する遺伝子も異なっている。これらのことから、ベンダムスチンは DNA アルキル化をより強く発揮する機序に加えて、アルキル化作用・代謝拮抗作用とは異なる作用を併せ持つ可能性が示唆される。

今回、ベンダムスチンの特徴的な構造である benzimidazole ring と alkane carboxylic acid が従来考えられてきた代謝拮抗作用、水溶性への寄与とは異なる役割を持つことを明らかにした。

benzimidazole ring は核酸類似の構造から、核酸輸送体の基質となり、ベンダムスチンの速やかな細胞内移行に重要である。核酸輸送体の阻害剤によって代謝拮抗薬と同様にベンダムスチンの殺細胞効果も減弱した。

また、benzimidazole ring、alkane carboxylic acid は脂肪酸などのヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤に見られる構造であり、ベンダムスチンを含むアルキル化剤は HDAC 分解によるヒストンアセチル化を誘導した。とくに、ベンダムスチンは HDAC3、SIRT1、SIRT7 を分解し、ヒストンアセチル化、中でもヒストン H3K18 アセチル化を強く誘導することを明らかにした。H3K18 以外の部位のアセチル化に働く HDAC1、HDAC2 の発現に変化は見られなかった。HDAC3 をノックダウンすると、ベンダムスチンおよびシクロフォスファミドの殺細胞効果が増強することから、HDAC3 分解がアルキル化剤間の交叉耐性欠如の一因である可能性が示唆された。SIRT1、SIRT7 は血液腫瘍細胞株で核外に異常な局在を示しており、ベンダムスチンによって分解されると共にヒストンの核内移行に重要なヒストン H3K18 脱アセチル化が阻害され、ヒストン H3 の細胞質内蓄積が見られた。このことから、ベンダムスチンは、核内において HDAC 分解とヒストンアセチル化によって、DNA 修復阻害・転写亢進・ヘテロクロマチン解除によ

って DNA 傷害を増強するのみならず、核外でヒストン核内輸送を阻害することで DNA 合成を抑制し、細胞死を誘導する可能性が示唆された。

ベンダムスチンの作用が明らかでない現状で、ベンダムスチンと各種抗腫瘍薬の併用療法には理論的裏付けがなく、ベンダムスチンと抗体薬の併用療法が行われているのみである。今回明らかになった知見をもとに、ベンダムスチンと代謝拮抗薬・HDAC 阻害剤・アルキル化剤との併用効果について検討したところ、ベンダムスチンは、いずれの薬剤とも相加的～相乗的な併用効果を示した。ベンダムスチンが代謝拮抗薬と核酸輸送体を共用するにも関わらず、拮抗せずに作用する機序として、ベンダムスチンによる転写レベルでの核酸輸送体発現誘導を明らかにした。ベンダムスチンは核酸輸送体を誘導するため、ベンダムスチンを先に加えた後に代謝拮抗薬を加えた場合に、より強い併用効果が得られることが明らかになった。また、ベンダムスチンは核酸輸送体を介して速やかに細胞内に移行し、核酸輸送体を誘導することでさらに自身の取り込みを高めている可能性が示唆される。ベンダムスチンおよびアルキル化剤であるシクロフォスファミドは HDAC 阻害剤ロミデプシンとヒストンアセチル化・殺細胞効果において相加的に作用した。アルキル化剤による HDAC3 分解は主に HDAC1、2 の酵素活性を阻害するロミデプシンの作用を相加的に増強することが示唆される。

以上のことから、ベンダムスチンの臨床応用において、ベンダムスチンとアルキル化剤・代謝拮抗薬・HDAC 阻害剤の併用について有望な結果が得られる可能性が示唆される。さらに、薬剤の投与順序についても、ベンダムスチン→代謝拮抗薬の順番で投与される場合により高い殺細胞効果が得られる可能性が示唆される。今回の結果によって、ベンダムスチン単剤およびベンダムスチンを含む併用療法の有効性について新たな理論的裏付けが得られ、ベンダムスチンのさらなる適応拡大に繋がると考えられる。

## 背景および目的

### 1. 研究の背景

近年、血液腫瘍領域において、腫瘍化の分子的メカニズム解明が進み、治療成績が大きく改善するようになってきた。とくに、慢性骨髄性白血病治療におけるチロシンキナーゼ阻害薬、急性前骨髄球性白血病治療におけるレチノイン酸、多発性骨髄腫治療におけるプロテアソーム阻害剤は臨床的に高い有効性を示しており、標準治療に欠かせない薬剤として広く使用されている。

これらの薬剤は標的とする分子が単一であるために、より腫瘍選択的な治療が可能となるが、その反面、標的分子の変異によって容易に耐性が生じ得る。そのため、実臨床において、分子標的薬は従来から使用されてきたアルキル化剤、代謝拮抗剤などと併用して用いられることが多い。多剤併用化学療法後に薬剤耐性を生じて再発・難治となった血液腫瘍に対しては、依然として治療の選択肢が少なく、薬剤耐性を克服する新たな治療薬が望まれている。

薬剤耐性を克服する新たな治療薬の一つとして、近年、ベンダムスチンが注目されている。ベンダムスチンは1960年代に開発された薬剤であるが、低悪性度リンパ腫に対し単独で標準的治療であるCHOP療法（cyclophosphamide、doxorubicin、vincristine、predonisone）と同等の有効性を示すこと、他の抗癌剤に不応性のマンテル細胞性リンパ腫にも治療効果があることが再発見され、“古くて新しい薬”として再発難治性の低悪性度悪性リンパ腫サルベージ治療に使用されるようになってきている (1)。

ベンダムスチンは、nitrogen mustard group・benzimidazole ring・alkane carboxylic acid からなるユニークな構造をしており、DNAアルキル化作用・代謝拮抗作用を併せ持つことで従来のアルキル化剤より優れた抗腫瘍効果を示すことを期待して開発された (2)。

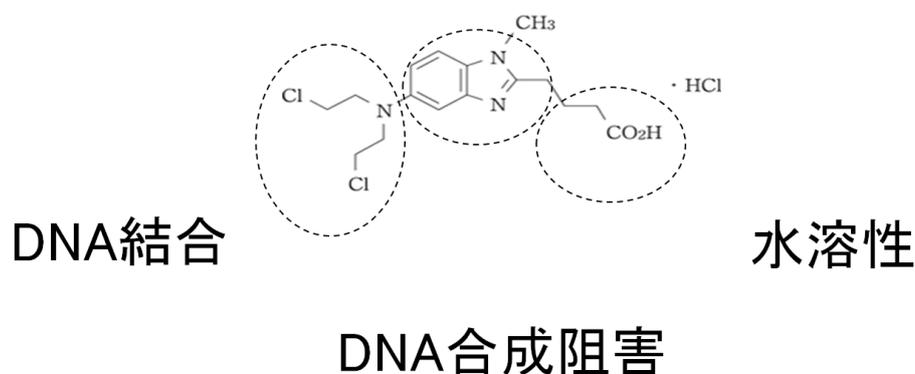


図 1

ベンダムスチンの作用機序と作用の特徴についてまとめると、

- ① DNA アルキル化作用を持ち、DNA 傷害が一般的なアルキル化剤より広範囲かつ長時間持続する (3)。
- ② ベンダムスチンによって核酸の細胞内蓄積が見られることから、代謝拮抗作用があると推測されている。
- ③ 一般的なアルキル化剤が主に DNA 修復によるエネルギー枯渇を介したネクロシスを誘導するのに対し、ベンダムスチンは Plk-1、Aurora-A、Cyclin B1 の抑制を介して分裂期細胞死 (mitotic catastrophe) を誘導する (4)。
- ④ ベンダムスチンは、感受性を示す細胞の種類 (抗腫瘍スペクトル) が各種抗腫瘍薬と異なり、一般的なアルキル化剤との交叉耐性が臨床的に少ない (4)。
- ⑤ 薬剤暴露前後の遺伝子発現パターンが一般的なアルキル化剤とベンダムスチンでは異なり、ベンダムスチンは DNA 傷害応答、DNA 代謝、細胞増殖、分裂期チェックポイント、細胞制御に関連する遺伝子の発現を有意に強く誘導する。
- ⑤ ベンダムスチンは早期に S 期停止・G2/M 期停止・アポトーシスを誘導する (4、5)。
- ⑥ ベンダムスチンは短時間の暴露で十分な殺細胞効果を示す。  
という報告がある。

これまで明らかになったベンダムスチンの作用機序からは、広範囲かつ長時間持続する DNA 傷害の誘導・他のアルキル化剤との交叉耐性の欠如・単剤での優れた臨床成績といったベンダムスチンの特徴を完全に説明可能できない (1、2)。ベンダムスチンの優れた作用を説明可能な作用機序の解明は重要な課題である。

腫瘍の診断および治療において、腫瘍細胞集団が均一な集団ではないことが問題である。血液腫瘍の根治的治療には Total cell kill の考え方から、不均一な細胞集団それぞれにより強く殺細胞効果を及ぼすことが必要であり、そのために、抗癌剤併用療法により優れた組み合わせを検討し、併用効果の作用機序について明らかにすることが重要である。現在、実臨床ではベンダムスチンと抗体薬との併用療法しか行われていない。今後、ベンダムスチンを含む多剤併用療法が行われることで、単剤投与以上の治療成績向上が期待されることから、ベンダムスチンとすぐれた併用効果が得られる薬剤選択と、併用効果における理論的裏付けの検討は重要な課題である。

## 2. 研究の目的

ベンダムスチンの特徴は大きく①アルキル化剤として非常に速やかな効果発現、②アルキル化剤とは異なる作用、の 2 つに分けられ、これらの特徴を説明

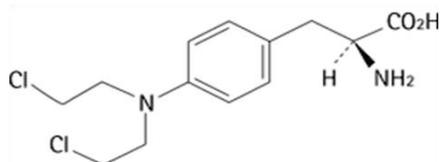
可能なベンダムスチンの抗腫瘍メカニズムを明らかにする。また、ベンダムスチンの作用について得られた知見をもとに、ベンダムスチンと優れた併用効果を示す薬剤を検討し、その併用効果の機序を明らかにする。実験には、造血器腫瘍細胞とくに抗癌剤治療に難治再発性であるマントル細胞性リンパ腫細胞を用いる。

#### ①アルキル化剤として非常に速やかな効果発現（核酸輸送体を介したベンダムスチンの細胞内輸送）

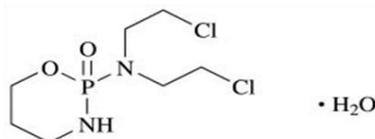
アルキル化剤は反応性の高い薬剤であるため、薬剤としての安定性を向上させるとともに、細胞内により多く取り込ませる工夫をすることで細胞内濃度を高める方向で歴史的に改良されてきた。一般的にアルキル化剤は単純拡散で細胞内へと移行するが、メルファランはnitrogen mustard groupにフェニルアラニンを結合させることでアミノ酸輸送体を介してより高い取り込みを狙ったものである。シクロフォスファミドは単純拡散で細胞内に移行した後にはじめて活性体に変換されて毒性を発揮することで細胞外分解による薬剤喪失を回避したものである。ベンダムスチンの代謝産物はその水酸化物が主であり、ベンダムスチン自体がその細胞毒性の大部分を担っている。ベンダムスチンは一般的なアルキル化剤と比較して、より早くS期停止・G2/M期停止などの細胞周期変化を来し、早期にアポトーシスを誘導して細胞死を誘導することが知られている。そのため、ベンダムスチンはアルキル化剤として、より早く細胞内に輸送されることで強い作用を来すと考えられる。ベンダムスチンの特徴的な構造であるbenzimidazole ringは核酸類似構造であり、核酸輸送体を介した細胞内能動輸送によってベンダムスチンの速やかな細胞内輸送に関与していると想定される。

DNA傷害応答蛋白活性化、殺細胞効果などの変化をベンダムスチンと一般的なアルキル化剤と比較検討することで、ベンダムスチンが早く効果発現を示すことを確認し、細胞内取り込みから細胞死に至るどの過程でベンダムスチンが早く作用するかを検討・確認する。その上で、ベンダムスチンが核酸輸送体を利用して細胞内に輸送されるかを検討する。

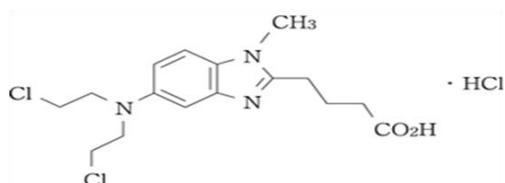
## メルファラン



## シクロフォスファミド



## ベンダムスチン



## イフォスファミド

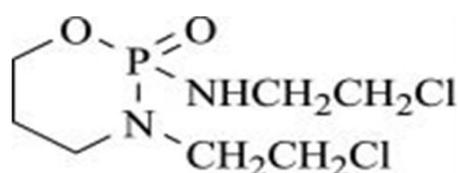


図 2

②アルキル化剤とは異なる作用（ベンダムスチンによるヒストンアセチル化作用）

alkane carboxylic acid はベンダムスチンに水溶性を付加するとされている。しかし、benzimidazole ring・alkane carboxylic acid といった構造は、近年有力な分子標的と目されているヒストンアセチル化を制御するヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の阻害に必要な分子構造としても知られている。ベンダムスチンは、Plk-1、Aurora-A、Cyclin B1 を抑制し、S 期停止、G2/M 期停止を他のアルキル化剤より早期に強く誘導するという報告がされており、HDAC 阻害剤はこれらの分裂期蛋白の阻害を作用機序の一つとしていることから、ベンダムスチンの作用メカニズムとして HDAC 阻害作用を有することは細胞周期停止の特徴を矛盾なく説明可能である。alkane carboxylic acid は他のアルキル化剤と共通の構造であるが、benzimidazole ring を有することで HDAC 阻害作用をより高めていると考えられる。

各種抗腫瘍薬とベンダムスチンがヒストン修飾とくにヒストンアセチル化および HDAC 発現に与える影響について検討し、ベンダムスチンの作用機序にヒストンアセチル化・HDAC 阻害が関連する可能性について検討する。

③ベンダムスチンと抗腫瘍薬の相互作用についての検討

核酸輸送体を介した薬剤輸送は核酸類似体の殺細胞効果に大きく影響するため、ベンダムスチンが核酸輸送体を介して取り込まれるとすると、核酸類似体の殺細胞効果に影響を与えることが考えられる。

核酸類似体とベンダムスチンの併用による殺細胞効果に対する影響について検討し、核酸類似体とベンダムスチンの併用治療の可能性について検討する。

一般的に癌細胞は HDAC の発現が高く、ヒストンアセチル化レベルが低く抑えられている (6)。HDAC 阻害によってヒストンアセチル化が誘導されると、DNA とヒストンの結合がゆるみ、癌細胞の維持増殖に有利な転写抑制状態が解除される (6)。DNA を標的とする抗腫瘍薬との併用効果においては、DNA への接近が容易になることでより強い殺細胞効果への補助になると考えられる (7)。また、HDAC は DNA 修復に必要であり (8)、その阻害によって DNA 傷害が持続することでも DNA を標的とする抗腫瘍薬の作用を増強すると考えられる。これらのことから、HDAC 阻害が DNA を標的とする抗腫瘍薬の作用を高めることで、薬剤耐性の克服に役立つ可能性が考えられる。逆に、DNA を標的とする抗腫瘍薬がヒストン修飾に与える影響についての研究は少ない。

ベンダムスチンがヒストンアセチル化・HDAC に与える影響についての知見をもとに、近年、有望な治療選択と目されている HDAC 阻害剤とベンダムスチンの併用がヒストンアセチル化および殺細胞効果に与える効果について検討する。

## 実験材料および方法

### 試薬

ベンダムスチン (BDM)、デキサメサゾン、フルダラビンの活性代謝物である 9- $\beta$ -D-arabinosyl-2-fluoroadenine (F-Ara-A)、S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBTI) は Sigma より購入した。クロラムブシル (CB) は LKT Laboratories より購入した。シクロフォスファミドの活性代謝物である 4-hydroxy cyclophosphamide (4-OHCY) およびシクロフォスファミド (CY) は塩野義製薬、シタラビン (Ara-C) は日本新薬、ドキシソルビシンは明治製薬、メソトレキセートは日本レダリー、Dilazep は興和創薬からの分与である。各試薬は DMSO あるいは 0.9%生理食塩液に溶解し、使用するまで-20°Cで保存した。

### 細胞および細胞培養

マントル細胞性リンパ腫細胞株 HBL-2、バーキットリンパ腫細胞株 Namalwa、BJAB、骨髄腫細胞株 U266、RPMI 8226、T 細胞性急性リンパ性白血病細胞株 Jurkat、KOPT-5、急性骨髄性白血病細胞株 HL-60、K562、THP-1 はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。マントル細胞性リンパ腫細胞株 SMCH-16、Granta519、NCEB-1 は埼玉医科大学・中村裕一、森茂久両博士より分与を受けた。各細胞は、10% bovine serum albumin (Sigma) を含む RPMI1640 培地 (Sigma) を用いて継体培養した。

### ウエスタンブロット

細胞をリン酸緩衝液で洗浄し、プロテアーゼ阻害剤を含んだ低張性細胞溶解バッファー (50mM Tris-HCl pH8.0、120mM NaCl<sub>2</sub>、0.5% Nonidet P-40、100 mM sodium fluoride、200  $\mu$ M sodium orthovanadate) に溶解し、15000 rpm で 10 分間遠心した後に、タンパク質を含む上清を単離した。タンパク量は Bio-Rad protein assay kit を用いて定量し、サンプル当たり 30  $\mu$ g のタンパク質を含むように調整した。これを SDS-polyacrylamide gel で電気泳動し、Immobilon-P 膜 (Millipore) に転写した。膜は 10% non-fat dry milk と 1% bovine albumin を含む Tris-buffered saline+0.05% Tween-20 (TBS-T) でブロッキングした。その後、Canget signal Sol1 (東洋紡) で希釈した一次抗体を 1 時間作用させた。次に、Canget signal solution2 (東洋紡) で希釈した horseradish peroxidase ラベルされた抗ウサギあるいは抗マウス二次抗体を室温で一時間反応させ、ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech) で蛍光発光させ、シグナルを検出した。用いた抗体を下記に示す。HDAC1 (Upstate Biotechnology)、HDAC2 (Cell Signaling Technology)、HDAC3 (Upstate

Biotechnology)、SIRT1 (Cell Signaling Technology)、SIRT7 (Cell Signaling Technology)、ENT1 (Santa Cruz Biotechnology)、ENT2 (Santa Cruz Biotechnology)、pChk1 (Cell Signaling Technology)、pChk2 (Cell Signaling Technology)、H3K18Ac (Cell Signaling Technology)、H4K12Ac (Cell Signaling Technology)、H4K5Ac (Cell Signaling Technology)、GAPDH (Santa Cruz Biotechnology)、H3 (Cell Signaling Technology)、H1 (Santa Cruz Biotechnology)。

### 核蛋白抽出

Nuclear extraction kit (Promega) を用いて、製品のプロトコールに従って核蛋白、細胞膜・細胞質蛋白の分離を行った。

### MTT 細胞増殖アッセイ

細胞を  $1 \times 10^4$ /well に調整し、96 穴平底マイクロプレートに加え、様々な希釈濃度になるように抗腫瘍薬を添加または非添加下で、37 度 48-72 時間培養した。3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT 試薬) (和光純薬)  $10 \mu\text{l}$ /well を添加し、最終濃度を  $1 \mu\text{g/ml}$  とし、37 度でさらに 1-2 時間培養した後、マイクロプレートリーダーを用いて波長 450nm の吸光度を測定した。抗腫瘍薬非添加下で培養した細胞の吸光度に対する比率を算出し、各薬剤の dose response curve を作成した。抗腫瘍薬を添加しないコントロールの細胞死滅率を 0 % とし、50 % の細胞が死滅する濃度を IC50、80 % の細胞が死滅する濃度を IC80 とした。

### アポトーシスアッセイ

細胞をリン酸緩衝液で洗浄後、Annexin V/PE Apoptosis Detection Kit (MBL) を用いて染色した。フローサイトメーターを用いて、アネキシン V 陽性細胞の割合からアポトーシスの評価を行った。

### 細胞周期解析

細胞をリン酸緩衝液で洗浄後、Vindelov 溶液 (0.04 mg/ml propidium iodide、5 mM Tris-HCl、5 mM NaCl、0.005 % Nonidet P-40) で染色し、BD LSR II (Becton Dickinson) を用いて解析した。細胞周期 sub-G1、G0/G1、S、G2/M 期各細胞の割合は ModFitLT2.0 (Becton-Dickinson) を用いて解析した。

### 定量 RT-PCR

細胞をリン酸緩衝液で洗浄し、RNeasy Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、

ReverTra Ace (東洋紡) を用いて製品のプロトコールに従って逆転写を行い、cDNA を得た。TaqMan Gene Expression Assay System (SLC29A1/ENT1 (Hs01085704)、GAPDH (Hs01922876))、TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いてサンプルを調整し、StepOnePlus (Applied Biosystems) を用いて定量 RT-PCR を行った。

#### shRNA 発現レンチウイルスベクターによるタンパク発現抑制

HDAC3 に対する shRNA レンチウイルスベクターは GFP を共発現する pLL3.7 ベクターを用いた。shRNA レンチウイルスベクターをウイルスパッケージングプラスミド (Invitrogen) とともに LipofectAMINE2000 transfection reagent (Invitrogen) を用いて、293FT 細胞へ導入し、感染性のレンチウイルスを培養上清へ産生させた。この上清を超遠心分離してレンチウイルスを濃縮した。培地で  $2 \times 10^5$  /ml に調整した細胞に得られたレンチウイルスと終濃度  $5 \mu\text{g/ml}$  の硫酸プロタミンを添加し、24 時間培養することで、レンチウイルスを細胞に感染させた。ノックダウン細胞の分離は共発現する GFP をマーカーにして FACS Aria II (Becton Dickinson) を用いて行った。

#### shRNA 発現レンチウイルスベクターの設計

shRNA の配列は標的とする分子の配列の中から、ウェブサイトに公開されている検索ソフトウェアを用いて候補配列をそれぞれ 3-4 種類ずつデザインして用いた。ヘアピン構造をとるように shRNA 配列を含むオリゴの相補鎖を化学合成し (Takara)、2 本鎖にアニーリング、末端のリン酸化後、ベクターにライゲーションした。

#### 動物実験

$5 \times 10^6$  個の HBL-2 細胞を含む IMDM 培地 0.5 ml とマトリゲル (Becton Dickinson) 0.5 ml とを混合し、マウスの右側腹部の皮下に注射した。腫瘍を触知した時点を第 0 日目とし、経時的に腫瘍径をカリパーで計測した。腫瘍体積は  $\frac{4}{3}\pi \times (\text{短径}/2)^2 \times (\text{長径}/2)$  の数式で計算した。ロミデプシンは 0.1 mg/kg を第 0、2、5、7、9 日目に尾静脈から静注した (9)。シクロフォスファミドは 50 mg/kg を第 2、5、7、9 日目に腹腔内注射した (10)。腫瘍細胞移植に用いた NOD/SCID マウスは日本 SLC より購入した。すべての動物実験は、「研究動物を扱うための自治医科大学ガイドライン」に沿って行った。

### 抗腫瘍薬相互作用解析

細胞培養液に様々な濃度の抗腫瘍薬を2種類ずつ組み合わせて加え、各時間培養した後に、MTT細胞増殖アッセイを行った。得られた結果はSteel and Peckham法(11)あるいはChou-Talalay法(12)によって解析した。Chou-Talalay法による解析にはCompusyn 1.0 (ComboSyn Incorporated)を用いた。

### 統計学的分析

測定値の統計解析はStudentのT検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

## 結果

### ① ベンダムスチンの作用についての予備的検討

#### 1) ベンダムスチンの各種血液腫瘍細胞株に対する感受性 (図3)

MTT 細胞増殖アッセイによってさまざまな造血器腫瘍細胞株のベンダムスチンに対する感受性を測定した。ベンダムスチンはリンパ系腫瘍細胞株に比較的高い殺細胞効果を示し、骨髄腫細胞株・骨髄系腫瘍細胞株には比較的低い殺細胞効果を示した。とくに、ベンダムスチンが臨床的に適応となっているマン托ル細胞性リンパ腫細胞株の一部 (HBL-2、SMCH-16) に非常に高い殺細胞効果を示した。このことから、MTT 細胞増殖アッセイによるベンダムスチンの感受性は臨床患者におけるベンダムスチンの有効性とおおむね相関が見られると考えられ (13)、実験には、主にベンダムスチンに高感受性であるバーキットリンパ腫細胞株 Namalwa、マン托ル細胞性リンパ腫細胞株 HBL-2、低感受性であるマン托ル細胞性リンパ腫細胞株 Granta 519、NCEB-1 を用いた。

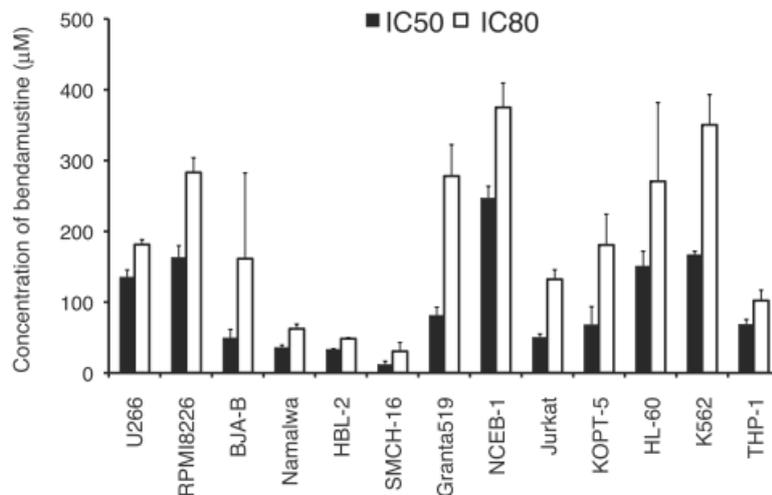


図3 ベンダムスチンの各種血液腫瘍細胞株に対する感受性

各種血液腫瘍細胞株に 0-400  $\mu\text{M}$  の希釈勾配になるようにベンダムスチンを加えて 72 時間培養し、MTT 細胞増殖アッセイを用いて IC50、IC80 濃度を決定した。

2) ベンダムスチンがマントル細胞性リンパ腫細胞株に与える細胞周期変化 (図 4)

ベンダムスチンが細胞周期に与える影響について検討した。ベンダムスチンを加えて早期の 12 時間後には S 期細胞の有意な増加が見られた。24 時間後以降にはアポトーシスを意味する SubG1 期細胞の有意な増加が見られた。ベンダムスチンは、加えて 12 時間という早期にすでに DNA 傷害を誘導し、24 時間後に細胞死を誘導していることが明らかになった。

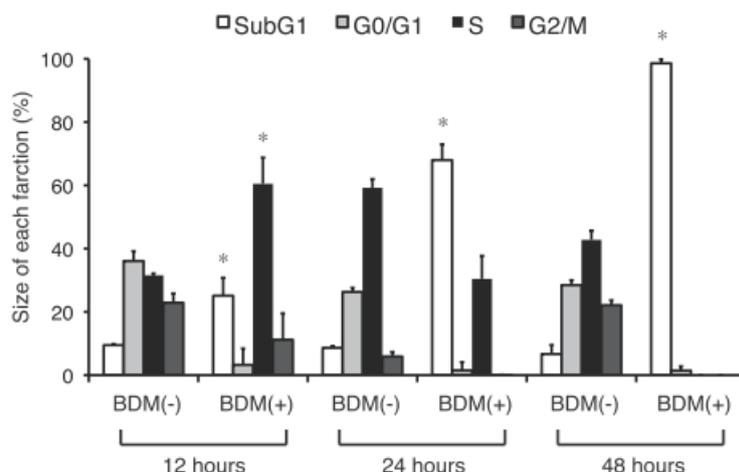


図 4 ベンダムスチンがマントル細胞性リンパ腫細胞株に与える細胞周期変化  
HBL-2 に 50  $\mu$ M のベンダムスチンを加えて各時間培養し、propidium iodide による核染色の後、フローサイトメーターで細胞周期解析を行った。

3) シクロフォスファミド、クロラムブシルがマントル細胞性リンパ腫細胞株に与える細胞周期変化 (図 5)

ベンダムスチンと同じナイトロジェンマスタードグループのアルキル化剤であるシクロフォスファミド、クロラムブシルが細胞周期に与える影響について検討した。薬剤を加えて 12 時間後、24 時間後では明らかな細胞周期変化は見られなかった。アポトーシスを意味する SubG1 期細胞の有意な増加も見られなかった。ベンダムスチンはアルキル化剤の中でも早く細胞周期変化・アポトーシスを誘導する薬剤であることが明らかになった。

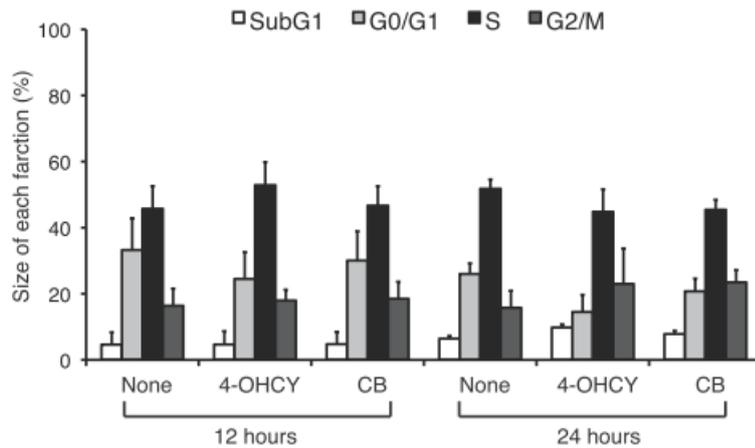


図5 シクロfosファミド、クロラムブシルがマンツル細胞性リンパ腫細胞株に与える細胞周期変化

HBL-2に1  $\mu\text{M}$ の4-OHCYあるいは4  $\mu\text{M}$ のクロラムブシルを加えて各時間培養し、propidium iodideによる核染色の後、フローサイトメーターで細胞周期解析を行った。

4) シクロfosファミドとベンダムスチンによるアポトーシス誘導 (図6)

シクロfosファミドとベンダムスチンの誘導するアポトーシスについてAnnexin V染色を用いて確認した。ベンダムスチンはシクロfosファミドよりも早期にアポトーシスを誘導することを確認した。

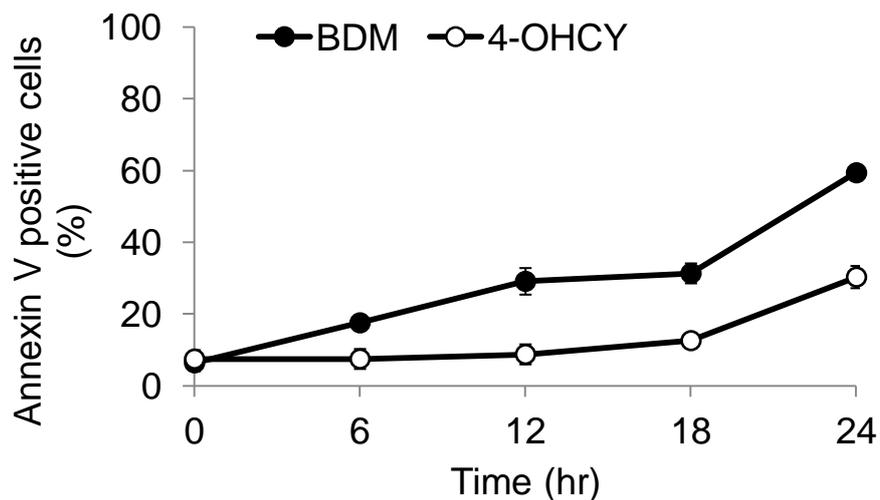


図6 シクロfosファミドとベンダムスチンによるアポトーシス誘導

HBL-2に4-OHCY 1  $\mu\text{M}$ 、ベンダムスチン 50  $\mu\text{M}$ を加えて各時間培養し、Annexin V染色によるアポトーシスアッセイを行った。

5) ベンダムスチンとシクロフォスファミドによるチェックポイントキナーゼ誘導 (図 7、8)

ベンダムスチンとシクロフォスファミドのチェックポイントキナーゼ活性化について比較検討した。HBL-2、Namalwa ともにベンダムスチンによるチェックポイントキナーゼ活性化のピークは Chk1 で 12-15 時間前後、Chk2 で少し遅れて 15-18 時間前後であった。一方、シクロフォスファミドによるチェックポイントキナーゼ活性化のピークはより遅く、HBL-2、Namalwa ともに Chk1、Chk2 で 48 時間後であった。早期の Chk1、Chk2 の誘導は HBL-2、Namalwa ともにベンダムスチンで強く誘導された。ベンダムスチンはシクロフォスファミドと比較してより早期に DNA 傷害を誘導することが明らかとなった。

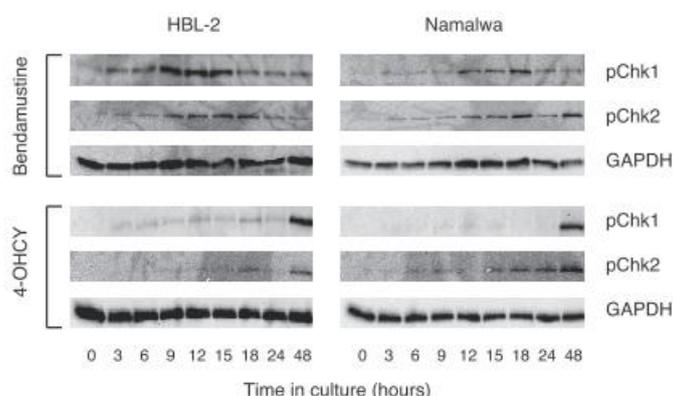


図 7 ベンダムスチンとシクロフォスファミドによるチェックポイントキナーゼ誘導

HBL-2、Namalwa に 50  $\mu$ M のベンダムスチンあるいは 1  $\mu$ M の 4-OHCY を加えて各時間培養し、ウェスタンブロッティング法によって Chk1、Chk2 のリン酸化を確認した。内在性コントロールとして GAPDH を用いた。

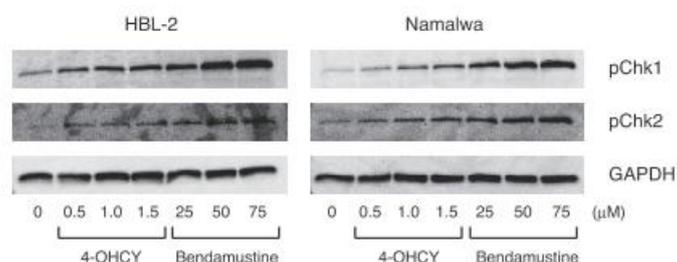


図 8 ベンダムスチンとシクロフォスファミドによるチェックポイントキナーゼ誘導

HBL-2、Namalwa に各濃度のベンダムスチンあるいは 4-OHCY を加えて 12 時間培養し、ウェスタンブロッティング法によって Chk1、Chk2 のリン酸化を確認した。内在性コントロールとして GAPDH を用いた。

6) 各種抗腫瘍薬とベンダムスチンのチェックポイントキナーゼ誘導 (図9)

ベンダムスチンと各種抗腫瘍薬のチェックポイントキナーゼ活性化について比較検討した。HBL2、Namalwaともにベンダムスチンは早期に強く Chk1、Chk2 のリン酸化を誘導した。ベンダムスチンは各種抗腫瘍薬の中でも最も早く DNA 傷害を誘導する薬剤であることが明らかになった。

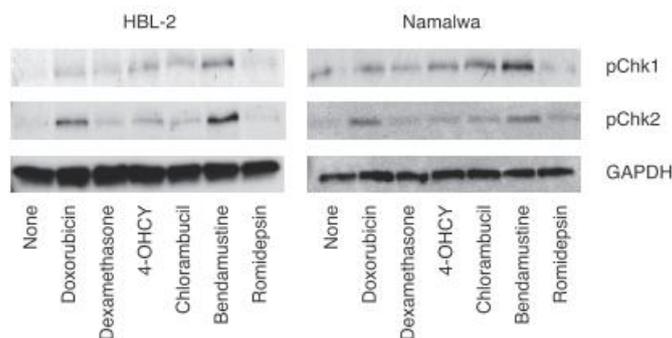


図9 各種抗腫瘍薬とベンダムスチンのチェックポイントキナーゼ誘導

HBL-2、Namalwa に IC50 濃度の各種抗腫瘍薬を加えて (ドキソルビシン 20 nM、デキサメサゾン 100 nM、4-OHCY 1  $\mu$ M、クロラムブシル 4  $\mu$ M、ベンダムスチン 50  $\mu$ M、ロミデプシン 2 nM) 6 時間培養し、ウェスタンブロッティング法によって Chk1、Chk2 のリン酸化を確認した。内在性コントロールとして GAPDH を用いた。

7) ベンダムスチンとシクロfosファミドの暴露時間と殺細胞効果 (図10)

ベンダムスチンとシクロfosファミドが十分な殺細胞効果を発揮するのに必要な暴露時間について検討した。ベンダムスチンは3時間の暴露で十分な殺細胞効果を発揮した。シクロfosファミドは十分な殺細胞効果を発揮するのに12時間以上の暴露を必要とした。ベンダムスチンがシクロfosファミドより短時間の暴露で速やかに、殺細胞効果を発揮すると考えられた。

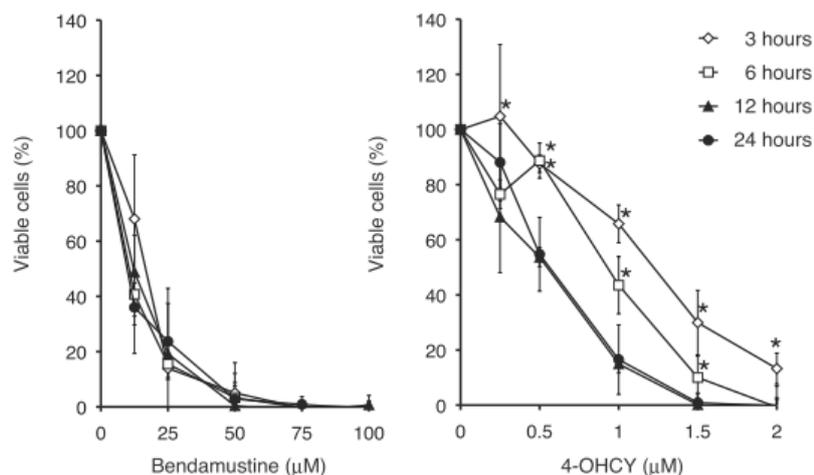


図 10 ベンダムスチンとシクロフォスファミドの暴露時間と殺細胞効果

HBL-2 に各濃度のベンダムスチンあるいは 4-OHCY を加えて各時間培養し、細胞を PBS (-) で 2 回洗浄した。再度培養液に懸濁し、合計培養時間 72 時間後に MTT 細胞増殖アッセイを行った。

## ② ベンダムスチンの核酸輸送体を介した細胞内輸送

### 1) 核酸輸送体阻害剤がベンダムスチン、核酸類似体、シクロフォスファミドの殺細胞効果に与える影響 (図 11)

ベンダムスチンは短時間の暴露で細胞周期変化・アポトーシスを早期に誘導し、細胞死に至らしめることが明らかになった。短時間の暴露で十分な作用を示すことから、細胞内輸送の早さにベンダムスチンの特徴が有ると考えられる。

ベンダムスチンの早い殺細胞効果が核酸輸送体を利用した早い取り込みによるものかを検討した。核酸輸送体阻害剤 Dilazep あるいは NBTI 濃度依存的なベンダムスチンの殺細胞効果減弱が HBL-2、Namalwa ともに見られた。シクロフォスファミドの殺細胞効果は Dilazep、NBTI の濃度に関係なく一定であった。陽性コントロールとして用いた核酸類似体であるシタラビン、フルダラビンはいずれも核酸輸送体阻害剤の濃度依存的に殺細胞効果が減少した。ベンダムスチンが核酸類似体同様に核酸輸送体によって細胞内輸送されていることが示唆された。

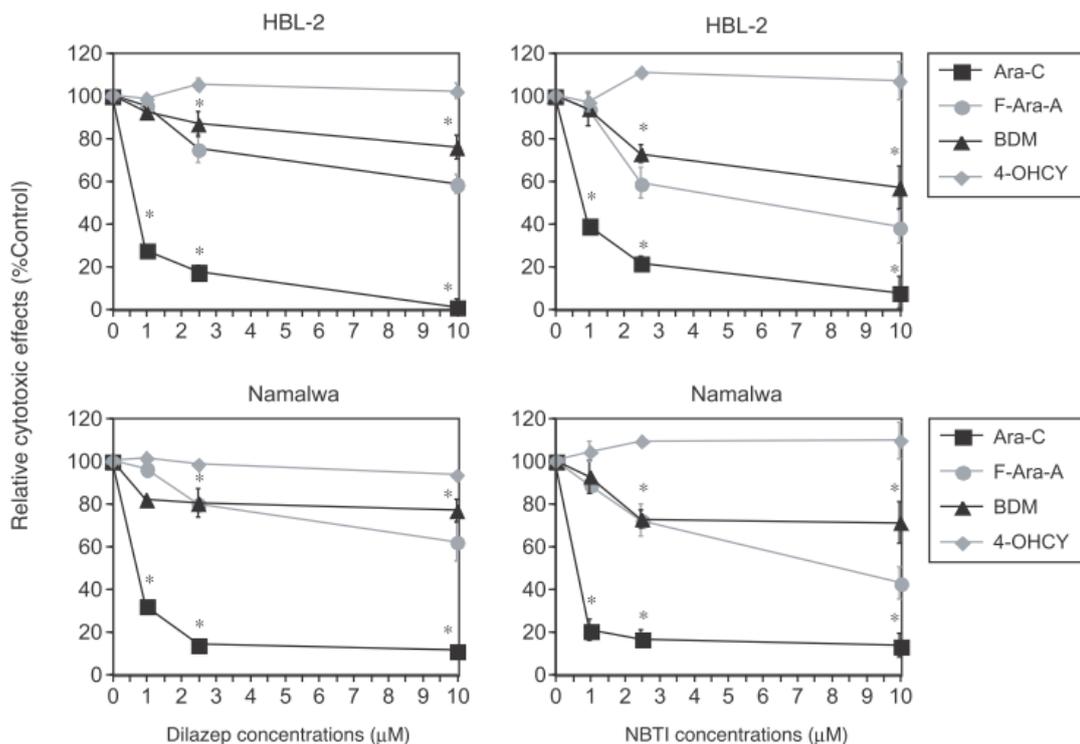


図 11 核酸輸送体阻害剤がベンダムスチン、核酸類似体、シクロフォスファミドの殺細胞効果に与える影響

HBL-2、Namalwa に 50  $\mu\text{M}$  のベンダムスチン、1  $\mu\text{M}$  のシクロフォスファミド、10  $\mu\text{M}$  のシタラビン、5  $\mu\text{M}$  のフルダラビンと、各濃度の ENT 阻害剤 Dilazep あるいは NBTI を加えて 72 時間培養した。MTT 細胞増殖アッセイを行い、Dilazep あるいは NBTI を加えていないときの殺細胞効果を 100 % としたときの相対的殺細胞効果を計算した。

### ③ ベンダムスチンによる HDAC 阻害・ヒストンアセチル化作用

#### 1) 各種抗腫瘍薬によるヒストンアセチル化誘導 (図 12)

HBL-2 細胞を用いて、各種抗腫瘍薬がヒストンアセチル化に与える影響を検討した。ベンダムスチンは強いヒストンアセチル化を誘導し、シクロフォスファミド、クロラムブシルもヒストンのアセチル化を誘導した。とくに、転写活性化・DNA 修復との関連が深いヒストン H3K18 のアセチル化を強く誘導した。ヒストンを脱アセチル化に大きく関わっている HDAC1 の発現は変化を認めなかった。

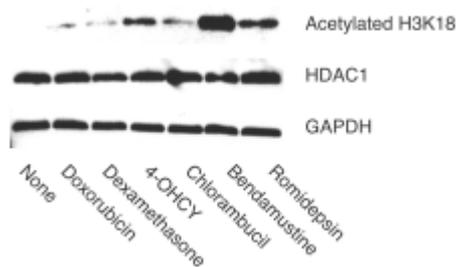


図12 各種抗腫瘍薬によるヒストンアセチル化誘導

HBL-2 細胞に IC50 濃度の各種抗腫瘍薬 (ドキソルビシン 20 nM、デキサメサゾン 100 nM、4-ヒドロキシシクロフォスファミド 1  $\mu$ M、クロラムブシル 4  $\mu$ M、ベンダムスチン 50  $\mu$ M、ロミデプシン 2 nM) を加えて 24 時間培養した。ウェスタンブロット法を用いてアセチル化ヒストン H3K18、HDAC1 の発現を確認した。内在性コントロールとして GAPDH を用いた。

2) ベンダムスチンとシクロフォスファミドのアセチル化ヒストン誘導 (図13)

alkane carboxylic acid を有するアルキル化剤が時間依存的にヒストンアセチル化を誘導することを確認した。ベンダムスチンとシクロフォスファミドのヒストンアセチル化誘導を比較すると、前者は 18 時間前後と早いピークを迎えるのに対し、後者は 48 時間前後と遅いピークを迎えた。アルキル化剤、とくにベンダムスチンが早期に強いヒストンアセチル化を誘導することが明らかになった。

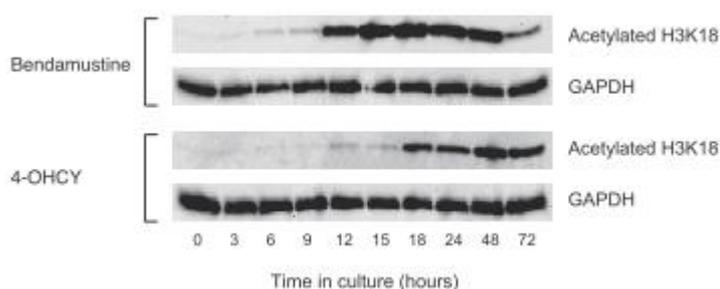


図13 ベンダムスチンとシクロフォスファミドのアセチル化ヒストン誘導

HBL-2 細胞に IC50 濃度のベンダムスチン、シクロフォスファミド (4-ヒドロキシシクロフォスファミド 1  $\mu$ M、ベンダムスチン 50  $\mu$ M) を加え、各時間におけるアセチル化ヒストン H3K18 の発現をウェスタンブロット法で確認した。内在性コントロールとして GAPDH を用いた。

3) マントル細胞性リンパ腫細胞株におけるベンダムスチンによるヒストンアセチル化誘導 (図 14)

マントル細胞性リンパ腫細胞株 HBL-2、SMCH-16、NCEB-1、Granta 519 を用いて、ベンダムスチンによるヒストンアセチル化誘導を検討した。複数の細胞株、HBL-2、SMCH-16、NCEB-1 でベンダムスチンによるヒストンアセチル化が誘導されたが、Granta 519 では誘導されなかった。

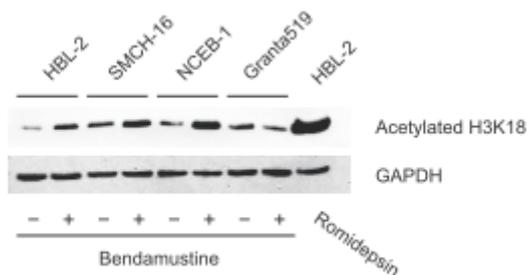


図 14 マントル細胞性リンパ腫細胞株におけるベンダムスチンによるヒストンアセチル化誘導

マントル細胞性リンパ腫細胞株 HBL-2、SMCH-16 (ベンダムスチン高感受性)、NCEB-1、Granta 519 (ベンダムスチン低感受性) に  $50 \mu\text{M}$  のベンダムスチンを加えて12時間培養し、ウェスタンブロット法を用いてアセチル化H3K18の発現を確認した。HBL-2に2 nMのロミデプシンを加えたものを陽性コントロールとした。内在性コントロールとしてGAPDHを用いた。

4) ベンダムスチンとシクロフォスファミドの各種HDAC分解 (図 15)

ヒストンH3K18の脱アセチル化に関連することが知られているヒストン脱アセチル化酵素HDAC1-3、SIRT1、SIRT7の発現がベンダムスチン、シクロフォスファミドによって変化するかを検討した。ベンダムスチン、シクロフォスファミドを加えると、ヒストンH3K18のアセチル化に並行して、SIRT1、SIRT7、HDAC3発現の量・時間依存的な減少が見られ、とくに、HDAC3の分解産物も確認できた。同じクラス1に属するHDAC1、2の発現には変化を認めなかった。

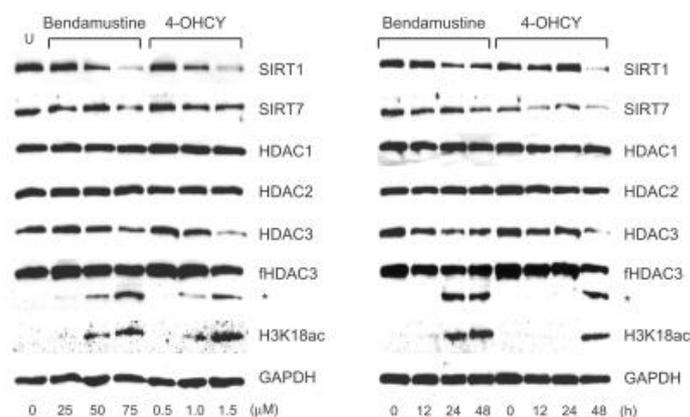


図 15 ベンダムスチンとシクロフォスファミドの各種 HDAC 分解

HBL-2 に 50  $\mu$ M のベンダムスチンあるいは 1  $\mu$ M の 4-OHCY を加えて各時間培養したものと、各濃度のベンダムスチン・4-OHCY を加えて 24 時間培養したもので、SIRT1、SIRT7、HDAC 1、HDAC2、HDAC3、アセチル化ヒストン H3K18 の発現を、ウェスタンブロット法を用いて確認した。HDAC3 抗体で見られた分子量の低いバンドは分解によって断片化した HDAC3 を示す。内性コントロールとして GAPDH を用いた。

4) H3K18 アセチル化・ヒストン H3・HDAC3・SIRT1・SIRT7 の細胞内局在 (図 16、17)

ヒストンは翻訳後に H3K18 を含む複数箇所のアセチル化修飾を受けており、それらが脱アセチル化されることではじめて核内に移動することが知られている (14)。アルキル化剤によるヒストンアセチル化がヒストンの核内輸送を阻害しているかを検討した。ベンダムスチンによって経時的にアセチル化ヒストン H3K18 が上昇すると共に、核内のヒストン H3 は軽度の増加しか認めないが、細胞質内のヒストン H3 が増加した。細胞質画分・核画分それぞれのマーカーである GAPDH、ヒストン H1 から細胞質、核成分のコンタミネーションは軽度であった。ベンダムスチンによってヒストン H3 の核輸送が阻害されることが示唆された。また、HDAC3 は主に核内に局在するのに対し、SIRT1、SIRT7 は核外に局在した。ベンダムスチンの核外ヒストン脱アセチル化には主に SIRT1、SIRT7 が関与している可能性が示唆された。

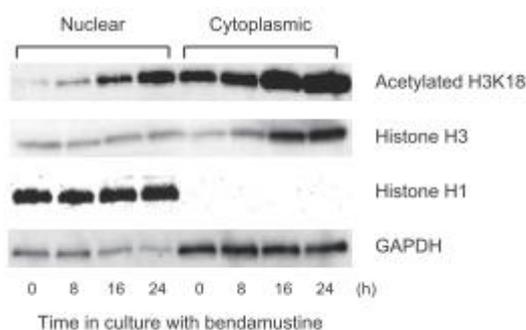


図 16 H3K18 アセチル化・ヒストン H3・HDAC3・SIRT1・SIRT7 の細胞内局在

HBL-2 に 50  $\mu$ M のベンダムスチンを加えて各時間培養し、細胞質画分と核画分を分離してアセチル化ヒストン H3K18、ヒストン H3 の発現を、ウェスタンブロット法を用いて確認した。細胞質画分のマーカー・内在性コントロールとして GAPDH を用い、核画分のマーカー・内在性コントロールとしてヒストン H1 を用いた。

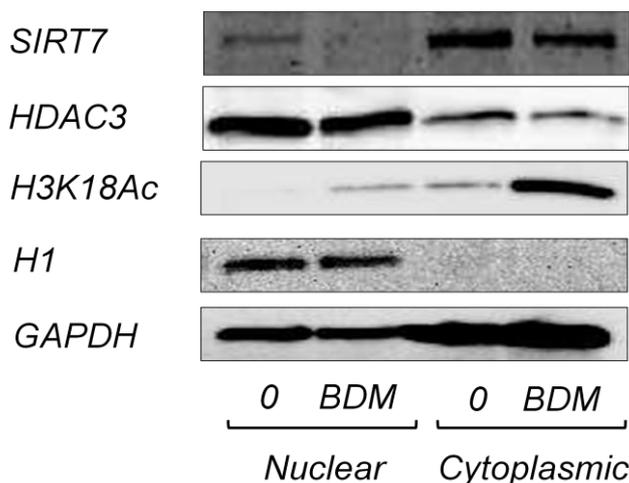


図 17 H3K18 アセチル化・ヒストン H3・HDAC3・SIRT1・SIRT7 の細胞内局在

HBL-2 に 50  $\mu$ M のベンダムスチンを加えて 24 時間培養し、細胞質画分と核画分を分離してアセチル化ヒストン H3K18、HDAC3、SIRT1、SIRT7 の発現を、ウェスタンブロット法を用いて確認した。細胞質画分のマーカー・内在性コントロールとして GAPDH を用い、核画分のマーカー・内在性コントロールとしてヒストン H1 を用いた。

#### ④ベンダムスチンと各種抗腫瘍薬の相互作用

##### 1) リンパ系腫瘍細胞株におけるベンダムスチンと各種抗腫瘍薬の併用効果 (図 18)

ベンダムスチンと各種抗腫瘍薬の併用効果について検討した。ベンダムスチンはシタラビン、シクロフォスファミドと相加から相乗作用、ドキソルビシンと相加作用、メソトレキセートと拮抗作用を示した。同じ核酸代謝の拮抗剤であるシタラビンとメソトレキセートに対して異なる併用効果を認めることから、核酸合成自体に対する作用よりも取り込みにおける相互作用が重要である可能性が示唆された。

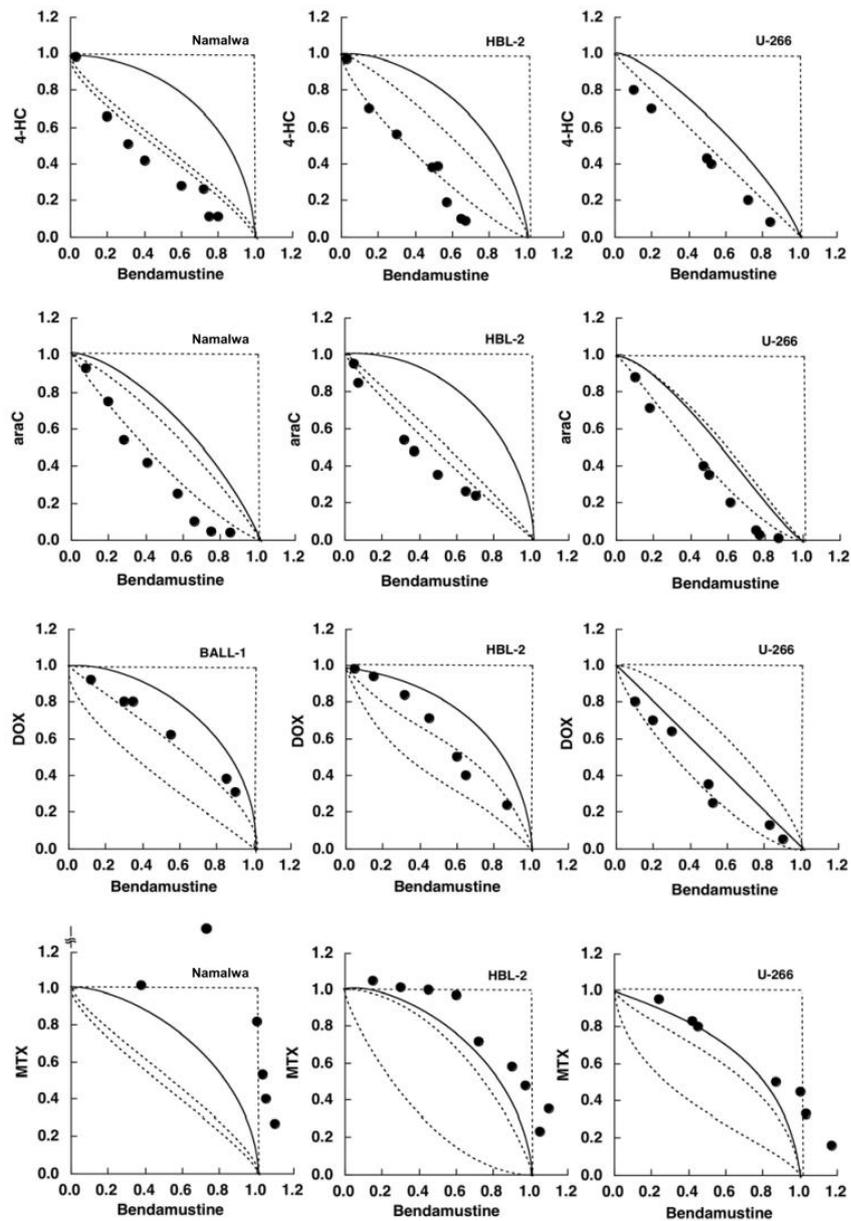


図 18 リンパ系腫瘍細胞株におけるベンダムスチンと各種抗腫瘍薬の併用効果

Namalwa、HBL-2、U266 にベンダムスチンと 4-OHCY、シタラビン、ドキソルビシンあるいはメソトレキサートを加えて 72 時間培養し、MTT 細胞増殖アッセイを行った。薬剤相互作用については、Steel and Peckham 法によって Isobologram を作成して検討した。

2) ベンダムスチンとシクロフォスファミド・シタラビンの相互作用が細胞周期に与える影響 (図 19)

ベンダムスチンとシクロfosファミドあるいはシタラビンとの組み合わせが細胞周期変化に与える影響について検討した。シクロfosファミド、ベンダムスチン共に単独でS期細胞の増加を誘導し、両者を加えることでS期細胞とアポトーシス細胞が増加した。シタラビンは単独でG2/M期細胞を増加させ、ベンダムスチンとシタラビンを共に加えることで、G2/M期細胞の増加が増強し、アポトーシス細胞が増加した。ベンダムスチンとシクロfosファミドは同じ作用が相加的に働き、シタラビンとベンダムスチンは違う作用が相加的に働くことでアポトーシスへの誘導を増強していることが示唆された。

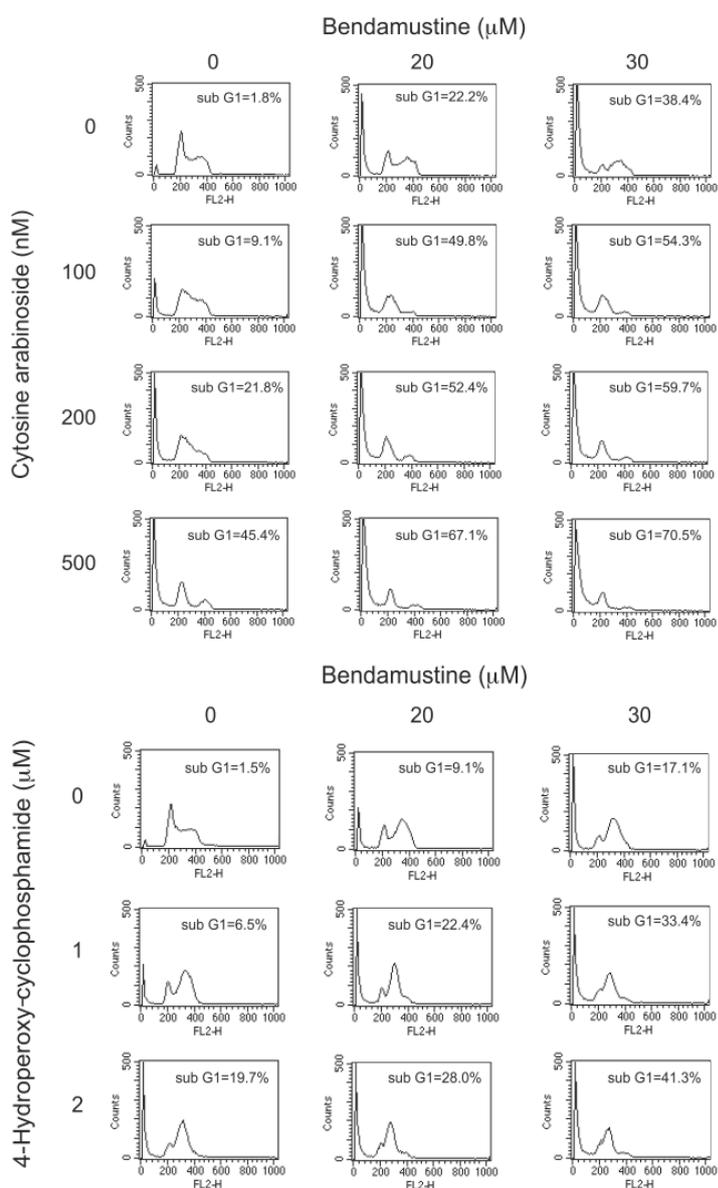


図 19 ベンダムスチンとシクロフォスファミド・シタラビンの相互作用が細胞周期に与える影響

HBL-2 に各濃度のベンダムスチンと各濃度の 4-OHCY あるいはシタラビンを加え、48 時間培養した後、propidium iodide 染色し、フローサイトメーターによって細胞周期解析を行った。

3) シクロフォスファミド、ベンダムスチン、フルダラビンによる核酸輸送体誘導 (図 20)

ベンダムスチンと核酸類似体が相乗効果を示す機序を明らかにするために、ベンダムスチンおよび核酸類似体が核酸輸送体誘導に与える影響を検討した。HBL-2、Namalwa ともにベンダムスチン、フルダラビンが mRNA レベルおよびタンパクレベルにおいて ENT1 の発現を高めることが明らかになった。とくに、ベンダムスチンはフルダラビン以上に ENT1 を強く誘導した。ベンダムスチン、フルダラビンともに ENT2 の発現は誘導しなかった。

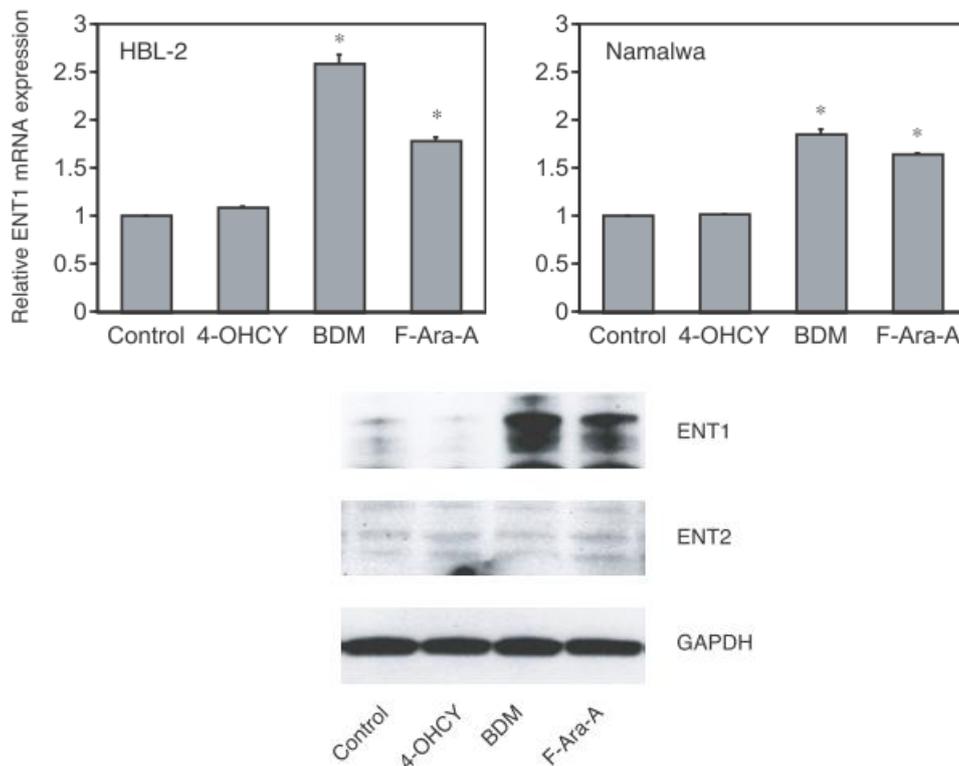


図 20 シクロフォスファミド、ベンダムスチン、フルダラビンによる核酸輸送体誘導

HBL-2、Namalwa に 25  $\mu$ M ベンダムスチン、2  $\mu$ M 4-OHCY あるいは 2.5  $\mu$ M F-Ara-A を加え、48 時間培養した後、定量 RT-PCR 法、ウェスタンブロットティング法によって ENT1 mRNA、ENT1 蛋白の発現を確認した。定量 RTPCR およびウェスタンブロットティング法における内在性コントロールとして GAPDH を用いた。

4) ベンダムスチンによる核酸輸送体誘導とシタラビン・ベンダムスチンの併用効果 (図 21)

ベンダムスチンによる核酸輸送体誘導がベンダムスチンと核酸類似体との併用効果の機序であること確認するために、核酸類似体とベンダムスチンの投与順序が併用効果に影響するかを検討した。シタラビンとベンダムスチンを同時に加えたものと、シタラビンを先に加えて後にベンダムスチンを加えたものは同等の併用効果を示した。ベンダムスチンを先に加えて後にシタラビンを加えると、有意に併用効果の増強が見られた。ベンダムスチンが核酸輸送体を誘導し、核酸類似体の細胞内取り込みを増強していることが示唆された。

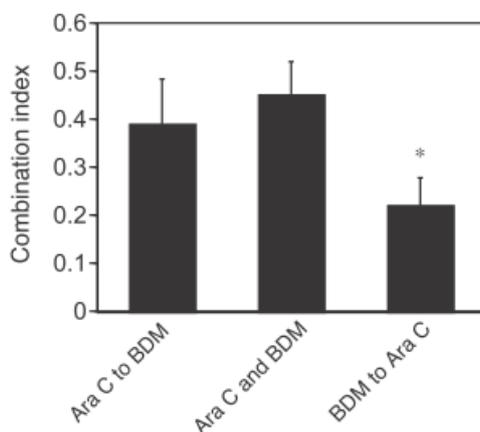


図 21 ベンダムスチンによる核酸輸送体誘導とシタラビン・ベンダムスチンの併用効果

HBL-2 を、①ベンダムスチン(25  $\mu$ M)、シタラビン (0.1  $\mu$ M) を同時に加えて 48 時間培養、②ベンダムスチンを加えて 48 時間培養した後、細胞を PBS (-) で洗浄し、シタラビンを加えてさらに 48 時間培養、③シタラビンを加えて 48 時間培養した後、細胞を PBS (-) で洗浄し、ベンダムスチンを加えてさらに 48 時間培養、の 3 通りの方法で処理した後、MTT 細胞増殖アッセイを行った。相互作用は Chou-Talalay 法によって解析した。

5) ベンダムスチンと HDAC 阻害剤ロミデプシンのヒストンアセチル化誘導における併用効果 (図 22)

ベンダムスチンと HDAC 阻害剤とがヒストンアセチル化において相加的あるいは相乗的に作用するかを検討した。HBL-2、SMCH-16、Granta519 とともにベンダム

スチンは量依存的に HDAC 阻害薬ロミデプシンによるヒストンアセチル化を増強した。また、ベンダムスチン単独でもとくにヒストン H3K18 のアセチル化を誘導した。

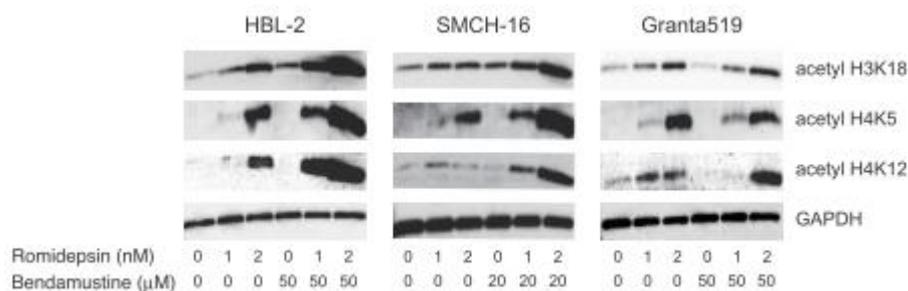


図 22 ベンダムスチンと HDAC 阻害剤ロミデプシンのヒストンアセチル化誘導における併用効果

HBL-2、SMCH-16、Granta 519 に各濃度のベンダムスチン、ロミデプシンを加えて 12 時間後にウェスタンブロッティング法を用いてアセチル化ヒストン H3K18、H4K5、H4K12 を確認した。内在性コントロールとして GAPDH を用いた。

6) ロミデプシンあるいはビンクリスチンとアルキル化剤の殺細胞効果における相互作用 (図 23)

ロミデプシンとアルキル化剤が殺細胞効果において相加作用あるいは相乗作用を示すかを Chou-Talalay 法によって検討した。ロミデプシンとベンダムスチン、シクロフォスファミドは相加から相乗的に作用したが、ビンクリスチンとベンダムスチン、シクロフォスファミドはより拮抗的に作用した。

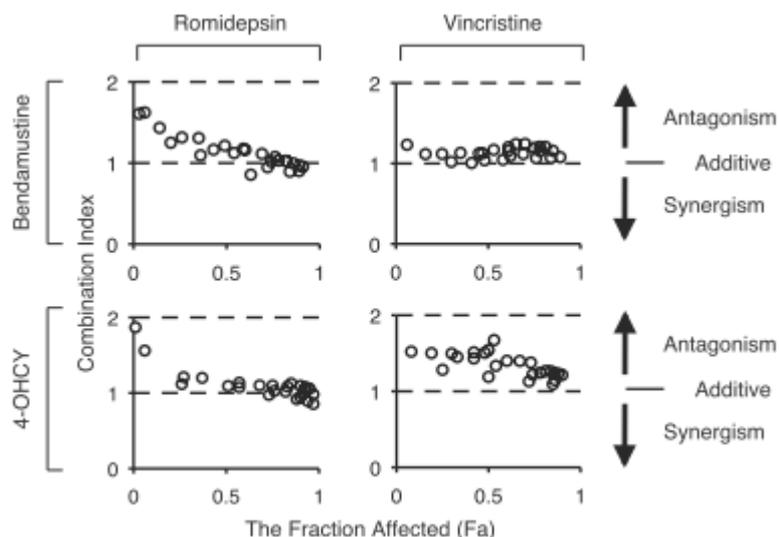


図 23 ロミデプシンあるいはビンクリスチンとアルキル化剤の殺細胞効果における相互作用

HBL-2 に 0/5/10/15/20/25  $\mu\text{M}$  のベンダムスチンあるいは 0/0.4/0.8/1.2/1.6/2.0  $\mu\text{M}$  の 4-OHCY を加えた後、各ベンダムスチン濃度勾配に 0/0.5/1/1.5/2/2.5 nM のロミデプシンあるいは 0.4/0.8/1.2/1.6/2 nM のビンクリスチンを加え、48 時間培養した。MTT 細胞増殖アッセイによって殺細胞効果を測定し、得られた結果を Chou-Talalay 法で解析した。

7) HDAC3 抑制によるベンダムスチン、シクロフォスファミドの殺細胞効果に与える影響 (図 24)

HDAC3 の発現が DNA 傷害薬の殺細胞効果に影響するかを検討するため、ノックダウンによる HDAC3 抑制がベンダムスチン、シクロフォスファミドの殺細胞効果を増強するかを解析した。HDAC3 のノックダウンによって有意にベンダムスチン、シクロフォスファミドの殺細胞効果は増強した。

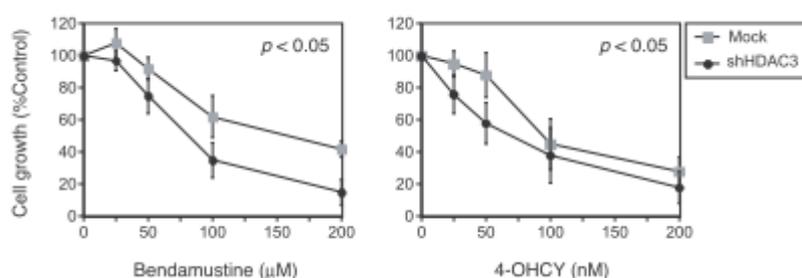


図 24 HDAC3 抑制によるベンダムスチン、シクロフォスファミドの殺細胞効果に与える影響

HBL-2 細胞に pLL3.7 レンチウイルスベクター (GFP 陽性) を用いて shHDAC3 を導入した。shHDAC3 が導入された GFP 陽性細胞をソーティングによって分離し、培養液に懸濁したのち、各濃度のベンダムスチンあるいは 4-OHCY を加えて 48 時間後に MTT 細胞増殖アッセイを行った。

## 考察

今回の研究で、ベンダムスチンによる、①核酸輸送体に対する作用と核酸類似体との併用効果、②HDAC に対する作用と HDAC 阻害剤との併用効果、が明らかになった。

### ①核酸輸送体に対する作用と核酸類似体との併用効果

ベンダムスチンの DNA アルキル化作用については示されており、ベンダムスチンは、他のアルキル化剤より強く DNA アルキル化を起こすとされている。アルキル化剤は一般的に反応性が高い物質であるために DNA に作用する以前に分解されてしまうことから、細胞内薬剤濃度を高めるために前述したとおり様々な工夫がなされてきた。ベンダムスチンも非常に反応性が高い物質であり（半減期 49.1 分）(15)、代謝物を含めてそれ自身が最も細胞毒性が高いため、より早く取り込まれることが強い殺細胞効果に重要と考えられる。今回、ベンダムスチンが核酸類似の構造によって核酸輸送体を介して速やかに細胞内に取り込まれることを明らかにした（図 10、11）。ベンダムスチンが他のアルキル化剤よりも早く細胞内に移行し、高い細胞内濃度を達成することは、より強い DNA 傷害を引き起こす機序を一部説明可能と考えられる。

また、今回ベンダムスチンが核酸輸送体を介して取り込まれるのみでなく、核酸輸送体の発現自体を転写レベルで増強することを明らかにした（図 20）。ベンダムスチンが核酸代謝に関連する遺伝子の発現を誘導するというマイクロアレイ解析の結果を裏付けるものである（4）。ベンダムスチンが核酸輸送体の発現を高める機序は明らかになっていないが、核酸類似体が核酸輸送体を誘導することで自身の細胞内濃度を高めることは知られている（16）。ベンダムスチンは何らかの機序で核酸類似体よりもつよく核酸輸送体を誘導し、自身の細胞内濃度を高めると考えられる。ベンダムスチンを加えると核酸が細胞内に蓄積されるという知見から、ベンダムスチンは DNA アルキル化作用だけでなく、代謝拮抗作用を持つとされているが、ベンダムスチンによる核酸輸送体の誘導による結果である可能性も示唆される。

臨床的には幾つかの臨床治験でベンダムスチンとミトキサントロン、フルダラビン、シタラビン、ビンクリスチン、ステロイドなどとの併用が行われている（17-22）。今回、ベンダムスチンによる核酸輸送体誘導の結果、核酸類似体の細胞毒性を高め、とくにベンダムスチンを先に加えることでより相乗的に作用することが明らかになった。臨床治験においても、ベンダムスチンとシタラビンの併用療法は CLL 治療において非常に優秀な治療成績を上げており（19、20）、ベンダムスチンをシタラビンに先行させて投与することで高い効果を上げている。さらに、ベンダムスチン、シタラビン、メルファラン併用療法も高い

治療成績が報告されている (22)。

以上のように、今回のベンダムスチンと核酸類似体、アルキル化剤との併用効果についての新しい知見は、臨床応用における有効性の裏付けになると考えられる。

## ②HDAC に対する作用と HDAC 阻害剤との併用効果

ヒストン脱アセチル化酵素は配列の相同性により 4 つのクラスに分類されている (23)。今回ベンダムスチンによって分解されることが明らかになった HDAC3 は、同じくクラス I に属する HDAC1、HDAC2 と同様に核内に局在し、多くのヒストンをアセチル化することが知られている (23)。今回、ベンダムスチンによる HDAC1、HDAC2 の分解は見られなかった (図 15)。このことは、1) HDAC1、HDAC2 が SIN3 複合体や NURD 複合体中に存在し、HDAC3 が NCOR や SMRT と複合体を形成することから (23)、ベンダムスチンが作用する複合体に違いがある可能性、2) HDAC1、HDAC2 間には約 80 % の相同性があるが、HDAC3 は約 50 % と配列の相同性がやや低いため (23)、HDAC3 特異的な働きを持つ可能性、3) HDAC1、HDAC2 が主に核に局在し、核内輸送シグナルのみで核外輸送シグナルを持たないのに対し、HDAC3 は核内輸送シグナルと核外輸送シグナルを両方持つことから (23)、核外での作用が重要である可能性、が考えられる。アルキル化剤による HDAC 分解の詳細な機序については今後の課題である。

核内の HDAC 阻害は腫瘍細胞では発現がエピジェネティックに抑制されていた癌抑制遺伝子が発現することや、分裂期蛋白の阻害による細胞周期停止などによって細胞毒性を発揮する (6)。クラス I HDAC 阻害剤ロミデプシンは主に HDAC1、HDAC2 の酵素活性阻害を作用機序としている (24)。これらに加えて HDAC3 が分解されれば、HDAC 阻害作用は増強し、相加的にヒストンアセチル化を増強し、ロミデプシンの作用を増強すると考えられる。さらに、HDAC 阻害は、ヒストンアセチル化によってクロマチンが弛緩し DNA 傷害薬が標的に接近しやすくなることや、DNA 修復蛋白を阻害し DNA 傷害薬による DNA 傷害が修復されにくくすることで、DNA 傷害薬の作用を増強すると考えられる。実際、HDAC3 の抑制によってアルキル化剤の細胞毒性が増強した (図 24)。また、データは示していないが、マウスリンパ腫モデルを用いた実験でもシクロフォスファミドとロミデプシンは殺細胞効果において相加的に作用した。これらより、HDAC 阻害剤をアルキル化剤などの DNA 傷害薬に先行して投与することで、より高い殺細胞効果が得られる可能性がある。

浸透圧負荷やアポトーシスによって HDAC3 が分解されるという報告がある (25、26)。浸透圧負荷による HDAC3 分解は分解産物がよりつよい HDAC 作用を持っており、一部遺伝子のプロモーター領域の脱アセチル化を起こし、転写を促

進する。アポトーシスによる HDAC3 分解は HDAC の核内局在部位が切断されることで HDAC3 の核外移行を生じ、一部遺伝子のプロモーター領域のアセチル化を誘導するが、ヒストン全体のアセチル化は逆に低下した。ベンダムスチンによる HDAC3 分解はヒストン全体のアセチル化を強く誘導し、分解後の HDAC3 の核外移行は見られず、分解して消失した (図 16)。このことから、ベンダムスチンによる HDAC3 分解は浸透圧やアポトーシスによる HDAC3 分解とは機序が異なるものと考えられる。

クラス III に属する HDAC である SIRT1、SIRT7 は主に核に局在することが知られ (27)、ヒストン以外の蛋白の脱アセチル化制御にも重要である。とくに最近、SIRT7 はヒストン H3K18 を基質として特異的に脱アセチル化する HDAC であることが明らかになった (28)。しかし、今回実験に使用した細胞株において HDAC の核内局在を検討したところ、HDAC3 は主に核内に局在するのに対し、SIRT1 および SIRT7 は主に細胞質に局在することが明らかになった (図 17)。SIRT の異常な細胞質内局在については特に腫瘍細胞株での報告があり、腫瘍細胞維持においてこの異常な局在が重要な働きを担っていると考えられる (29)。ベンダムスチンによって分解されるこれらの HDAC の核外での働きについて、核内と細胞質内でのヒストンのアセチル化について検討した結果、HDAC の分解と共にヒストン H3K18 アセチル化が増強し、細胞質内に局在するアセチル化ヒストンが増加した (図 16)。ヒストンは翻訳後に H3K18、H4K5 などがアセチル化され、細胞内への移行にはこれらの脱アセチル化が必要とされることから (14)、核外での SIRT を始めとする HDAC 分解によって H3K18 などの脱アセチル化が阻害され、ヒストンの核内輸送が行われなくなり、DNA 合成抑制・細胞周期停止の原因になる可能性が示唆された。

今回新たに明らかになったベンダムスチンによる HDAC 分解は、核内・核外での作用によって自身のアルキル化作用を増強するのみならず、HDAC 阻害剤との併用効果を増強すると考えられる。

### 引用文献

- (1) Tajeja N, Nagi J. Bendamustine: something old, something new. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010; 66(3): 413-23.
- (2) Leoni LM, Hartley JA. Mechanism of action: the unique pattern of bendamustine-induced cytotoxicity. *Semin Hematol*. 2011; 48 Suppl 1:S12-23.
- (3) Strumberg D, Harstrick A, Doll K, Hoffmann B, Seeber S. Bendamustine hydrochloride activity against doxorubicin-resistant human breast carcinoma cell lines. *Anticancer Drugs*. 1996; 7(4): 415-21.
- (4) Leoni LM, Bailey B, Reifert J, Bendall HH, Zeller RW, Corbeil J, Elliott G, Niemeyer CC. Bendamustine (Treanda) displays a distinct pattern of cytotoxicity and unique mechanistic features compared with other alkylating agents. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(1): 309-17.
- (5) Gaul L, Mandl-Weber S, Baumann P, Emmerich B, Schmidmaier R. Bendamustine induces G2 cell cycle arrest and apoptosis in myeloma cells: the role of ATM-Chk2-Cdc25A and ATM-p53-p21-pathways. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008; 134(2): 245-53.
- (6) Johnstone RW, Licht JD. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell*. 2003; 4(1): 13-8.
- (7) Perego P, Zuco V, Gatti L, Zunino F. Sensitization of tumor cells by targeting histone deacetylases. *Biochem Pharmacol*. 2012; 83(8): 987-94
- (8) Gong F, Miller KM. Mammalian DNA repair: HATs and HDACs make their mark through histone acetylation. *Mutat Res*. 2013; 750(1-2): 23-30.
- (9) Shimizu R, Kikuchi J, Wada T, Ozawa K, Kano Y, Furukawa Y. HDAC inhibitors augment cytotoxic activity of rituximab by upregulating CD20 expression on lymphoma cells. *Leukemia*. 2010; 24: 1760-1768.
- (10) Paoluzzi L, Gonen M, Gardner JR, Mastrella J, Yang D, Holmlund J, Sorensen M, Leopold L, Manova K, Marcucci G, Heaney ML, O'Connor OA. Targeting Bcl-2 family members with the BH3 mimetic AT-101 markedly enhances the therapeutic effects of chemotherapeutic agents in in vitro and in vivo models of B-cell lymphoma. *Blood*. 2008; 111(11): 5350-8.
- (11) Furukawa Y, Vu HA, Akutsu M, Odgerel T, Izumi T, Tsunoda S, Matsuo Y, Kirito K, Sato Y, Mano H, Kano Y. Divergent cytotoxic effects of PKC412 in combination with conventional antileukemic agents in FLT3 mutation-positive versus -negative leukemia cell lines. *Leukemia*. 2007;

21: 1005-1014.

(12) Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984; 22: 27-55.

(13) Strupp C, Knipp S, Hartmann J, Gattermann N, Haas R, Germing U. A pilot study of bendamustine in elderly patients with high-risk MDS and AML. *Leuk Lymphoma.* 2007; 48(6): 1161-6.

(14) Blackwell JS, Wilkinson ST, Mosammaparast N, Pemberton LF. Mutational analysis of H3 and H4 N termini reveals distinct roles in nuclear import. *J Biol Chem.* 2007; 282: 20142-20150.

(15) Rasschaert M, Schrijvers D, Van den Brande J, Dyck J, Bosmans J, Merkle K, Vermorken JB. A phase I study of bendamustine hydrochloride administered day 1+2 every 3 weeks in patients with solid tumours. *Br J Cancer.* 2007; 96(11): 1692-8.

(16) Petersen AJ, Brown RD, Gibson J, Pope B, Luo XF, Schutz L, Wiley JS, Joshua DE. Nucleoside transporters, bcl-2 and apoptosis in CLL cells exposed to nucleoside analogues in vitro. *Eur J Haematol.* 1996; 56(4): 213-20.

(17) Koenigsman M, Knauf W, Herold M, Pasold R, Müller G, Eschenburg H, Kahl C, Lakner V, Assmann M, Jentsch-Ullrich K, Mohren M, Bartsch R, Franke A. Fludarabine and bendamustine in refractory and relapsed indolent lymphoma--a multicenter phase I/II Trial of the east german society of hematology and oncology (OSHO). *Leuk Lymphoma.* 2004; 45(9): 1821-7.

(18) Weide R, Hess G, Köppler H, Heymanns J, Thomalla J, Aldaoud A, Losem C, Schmitz S, Haak U, Huber C, Unterhalt M, Hiddemann W, Dreyling M; German Low Grade Lymphoma Study Group. High anti-lymphoma activity of bendamustine/mitoxantrone/rituximab in rituximab pretreated relapsed or refractory indolent lymphomas and mantle cell lymphomas. A multicenter phase II study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Leuk Lymphoma.* 2007; 48(7): 1299-306.

(19) Visco C, Finotto S, Zambello R, Paolini R, Menin A, Zanotti R, Zaja F, Semenzato G, Pizzolo G, D'Amore ES, Rodeghiero F. Combination of rituximab, bendamustine, and cytarabine for patients with mantle-cell non-Hodgkin lymphoma ineligible for intensive regimens or autologous transplantation. *J Clin Oncol.* 2013; 31(11): 1442-9.

(20) Visco C, Finotto S, Pomponi F, Sartori R, Laveder F, Trentin L, Paolini

- R, Di Bona E, Ruggeri M, Rodeghiero F. The combination of rituximab, bendamustine, and cytarabine for heavily pretreated relapsed/refractory cytogenetically high-risk patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol.* 2013; 88(4): 289–93.
- (21) Herold M, Schulze A, Niederwieser D, Franke A, Fricke HJ, Richter P, Freund M, Ismer B, Dachselt K, Boewer C, Schirmer V, Weniger J, Pasold R, Winkelmann C, Klinkenstein C, Schulze M, Arzberger H, Bremer K, Hahnfeld S, Schwarzer A, Müller C, Müller C; East German Study Group Hematology and Oncology (OSHO). Bendamustine, vincristine and prednisone (BOP) versus cyclophosphamide, vincristine and prednisone (COP) in advanced indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma: results of a randomised phase III trial (OSHO# 19). *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006; 132(2): 105–12.
- (22) Visani G, Malerba L, Stefani PM, Capria S, Galieni P, Gaudio F, Specchia G, Meloni G, Gherlinzoni F, Giardini C, Falcioni S, Cuberli F, Gobbi M, Sarina B, Santoro A, Ferrara F, Rocchi M, Ocio EM, Caballero MD, Isidori A. BeEAM (bendamustine, etoposide, cytarabine, melphalan) before autologous stem cell transplantation is safe and effective for resistant/relapsed lymphoma patients. *Blood.* 2011; 118(12): 3419–25.
- (23) Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett.* 2009; 277(1): 8–21.
- (24) Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee KH, Nishiyama M, Nakajima H, Tanaka A, Komatsu Y, Nishino N, Yoshida M, Horinouchi S. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res.* 2002; 62(17): 4916–21.
- (25) Xia Y, Wang J, Liu TJ, Yung WK, Hunter T, Lu Z. c-Jun downregulation by HDAC3-dependent transcriptional repression promotes osmotic stress-induced cell apoptosis. *Mol Cell.* 2007; 25(2): 219–32.
- (26) Escaffit F, Vaute O, Chevillard-Briet M, Segui B, Takami Y, Nakayama T, Trouche D. Cleavage and cytoplasmic relocalization of histone deacetylase 3 are important for apoptosis progression. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(2): 554–67.
- (27) Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell.* 2005; 16(10): 4623–35.
- (28) Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y, Tasselli L, Kioi M, Moqtaderi Z, Tennen RI, Paredes S, Young NL, Chen K, Struhl K, Garcia BA, Gozani O, Li

W, Chua KF. SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature*. 2012; 487(7405): 114-8.

(29) Byles V, Chmielewski LK, Wang J, Zhu L, Forman LW, Faller DV, Dai Y. Aberrant cytoplasm localization and protein stability of SIRT1 is regulated by PI3K/IGF-1R signaling in human cancer cells. *Int J Biol Sci*. 2010; 6(6): 599-612.