

プロテアソーム阻害剤 epoxomicin に対する耐性株の樹立と いくつかのプロテアソーム依存性増殖制御分子の変動 —— ヒト扁平上皮癌細胞株 A431 を用いた研究 ——

葛 生 洋 房

東京慈恵会医科大学大学生化学講座 1

(受付 平成 16 年 4 月 7 日)

PROTEASOME-INHIBITOR-RESISTANT VARIANT OF HUMAN SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINE A431 —— ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION ——

Hirofusa KUZUU

Department of Biochemistry (I), The Jikei University School of Medicine

We established a variant of the human squamous cell carcinoma cell line 431 which is 6.1 to 14.5 times more resistant to epoxomicin than is the parental A431P cell line. The resistant cell line showed increased expression of the b-subunit molecules of 20S proteasome with approximately 2.5 times greater activity. In variant cells, cyclin B and P34^{cdc2} were overexpressed, whereas P21^{WAF1} was expressed at a similar level to that in A431P. Variant cells showed increased expression of both mRNA and protein of epidermal growth factor receptor (EGFR) and decreased expression of mRNA, with slight accumulation of the protein c-Cbl, which is a negative regulator of EGFR possessing ubiquitin ligase activity to desensitize EGF signaling. Levels of UbcH7, which acts with c-Cbl, were lower than in A431P. These phenomena can contribute to the prevention of c-Cbl-mediated down-regulation of EGFR in variant cells, enabling them to survive. Bcl-2, a key factor in apoptosis, was present mainly in a phosphorylated form resistant to proteasomal degradation. These phenomena are also advantageous for resistant cells proliferating in the presence of an inhibitor under severe conditions. Resistant cells showed resistance to the 5 proteasome inhibitors tested as well as to epoxomicin.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2004 ; 119 : 287-96)

Key words: proteasome inhibitor, epoxomicin resistance, human squamous cell carcinoma, phosphorylated Bcl-2

I. 緒 言

ユビキチン/プロテアソームシステムは ATP 依存性の蛋白質分解システムであり, 細胞の増殖, 成長, 分化そして死, すなわちアポトーシスにかかわる多くの細胞内シグナルのコントロールに関与している. そしてこの蛋白質分解の中心をなす

のが 26S プロテアソームという巨大酵素複合体である¹⁾²⁾. 多くの生命現象の制御に關与するこのプロテアソームの阻害は, 細胞の死, すなわちアポトーシスを誘導することが知られている. 近年, この多機能性酵素複合体「プロテアソーム」の阻害剤を抗癌剤として利用しようとの試みがなされており³⁾⁻⁶⁾, これまでの検討では, プロテアソーム

阻害剤は、臨床的にも抗癌剤として期待されている。とくに、プロテアソーム阻害剤の1つである PS-341 は、すでに多発性骨髄腫を含む複数の悪性腫瘍について、臨床での治験が進行中である³⁾⁻⁸⁾。しかしながら、実際にプロテアソーム阻害剤を臨床例で使用するための基礎的データの蓄積は非常に少ない。実際の癌治療においては、すでに判明している全身性副作用に加え、癌細胞に対して当初有効であった多くの抗癌剤が耐性を示している様に、不適切あるいは不完全な癌治療後にプロテアソーム阻害剤に対する耐性を獲得した癌細胞が再び現れる可能性もまったく否定できない現状を考え、臨床の間ではこの薬剤も慎重に投与する必要がある。以上のことから我々は、プロテアソームの非可逆性阻害剤である epoxomicin (EXM)⁹⁾ に耐性を示すヒト扁平上皮癌細胞 (A431EXM) を樹立し、癌化学療法施行時臨床の場で治療により発現する可能性の強い耐性細胞を克服するため、そしてセカンドラインの治療戦略をも考慮するために、そのいくつかの特徴について検討を加えた。本研究を基にした報告はすでに他で共同発表したが、本稿ではいくつかの新知見を加え本細胞株の興味ある性格を報告する。

II. 試薬と方法

1. 試薬

EXM, N-benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Leu-CHO (MG132), N-acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO (ALLN), N-benzyloxycarbonyl-Ile-Glu(OBu^t)-Ala-Leu-CHO (PSI), および lactacystin は、ペプチド研究所 (大阪) より購入した。4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylacetyl-Leu-Leu-Leu-vinylsulfone (NLVS), N-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methyl-coumarine (suc-LLVY-AMC), acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-a-(4-methyl-coumaryl-7-amide) (Ac-DEVD-MCA) は Calbiochem (San Diego, CA, USA) より購入した。

2. 細胞と培養

ヒト扁平上皮癌細胞, A431 (以下 A431P) は厚生労働省ガン研究資源バンク (JCRB) より取り寄せ、5% の非働化牛胎仔血清を加えた Dulbecco's modified minimum essential medium で通常の

条件で培養した。

3. EXM 耐性株の樹立

EXM 耐性 A431 株は、A431 細胞を EXM に持続的に曝露することによって樹立した。最初の耐性誘導は、2 カ月間継続的に A431 細胞を EXM (6.25 nM) に曝露した。生存した細胞は、さらに 4 週間ごとに漸次 EXM の濃度を上昇させ、最終濃度 12 nM まで曝露した。12 nM EXM の曝露に対し生存し続けた耐性 A431 細胞を A431EXM とした。A431EXM は 96 穴プレート上で限界希釈法によりクローニングした。毒性試験の後、これらの細胞株を A431EXM-1, A431EXM-2 と名付け、この 2 種類のクローンは 12 nM の EXM の存在下で維持した。

4. 毒性試験

各種プロテアソーム阻害剤に対しての交差耐性を確認するため、細胞は 17 時間 EXM 無添加環境で培養後、種々濃度のプロテアソーム阻害剤を添加し、72 時間の培養後、MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 法により生存率を測定した¹⁰⁾。コントロールは溶剤のジメチルスルホキシド (DMSO) を同濃度で用いた。得られた結果は以下の式により生存率を算出した: 細胞生存率 (%) = 100 × (薬剤処理細胞 570 nm における吸光度) / (DMSO 処理細胞 570 nm における吸光度)

5. 耐性細胞株の生化学的特徴

1) SDS-PAGE と Western Blot 法

耐性細胞株と親細胞は冷 PBS で洗浄後、10 mM Tris HCl, pH 7.4, 1% TritonX 100, プロテアーゼインヒビターカクテルで細胞抽出液を作成し、sodium dodecylsulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、ニトロセルロース膜に転写した。Bovine serum albumin (BSA) でニトロセルロース膜をブロック後、それぞれの一次抗体と反応させ、アルカリフォスファターゼもしくはペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体で発色可視化した。使用した一次抗体を以下に示す。抗ユビキチン鎖 (FK 2, MBL, Nagoya, Japan), 抗 20S プロテアソームシリンダー粒子, P32 と P27 (Progen Biotechnik, Heidelberg, Germany), 抗 P21^{WAF1}, 抗サイクリン B, 抗 P34^{cdc2} (cyclin-dependent kinase 1, CDK1), 抗

Bcl-2, 抗 UbcH7, 抗上皮細胞成長因子受容体 (EGFR), 抗 c-Cbl (Transduction Lab., Lexington, KY, USA), 抗アクチン (C-2, Santa Cruz Biotech. Santa Cruz, CA, USA) に対するマウスモノクローナル抗体である。

2) プロテアソーム活性の測定

プロテアソーム活性測定は, 蛍光プロテアソーム基質 suc-LLVY-AMC を用いて行った. 細胞質抽出液 (蛋白質 50 μ g/20 μ l 中) を, HEPES 50 mM (pH 7.5), ジチオスレイトール 2 mM, 0.035% SDS, 10% グリセロール, および suc-LLVY-AMC 100 μ M を含む 100 μ l の反応液で 37°C, 10 分間反応させ, 遊離した AMC の蛍光を分光蛍光光度計 (RF-5300PC, Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて, 380 nm excitation/460 nm emission で測定した。

3) RT-PCR

RNA は, トリゾール試薬 (GIBCO-BRL, Gaithersburg MD, USA) を用いて抽出した. 一本鎖 cDNA の合成は TrueScript II を用いて 1 μ g の RNA より合成, 反応は 25°C で 10 分間, 55°C で 1 時間行い, 最終 95°C 5 分間加熱して反応を停止した. PCR は, 得られた cDNA 1 μ l の反応混合物と Taq ポリメラーゼ 0.5 unit (Takara, Kyoto, Japan), 200 μ M dNTP, 1 μ M センスプライマーとアンチセンスプライマーを含む 20 μ l 反応液で行った. 反応時間は 94°C 1 分間の変性反応後 98°C 10 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1 分, サイクル数は全て 30 回とした. 内部標準として β -アクチンを用いた. 使用したプライマーを以下に示す。

c-Cbl sense, 5'-CCCTTGGAAGAGCTTTC-GAC-3'; c-Cbl antisense, 5'-CCCCTGACC-CAGACGAGTA-3' (311 bp as PCR product), EGFR sense, 5'-ATGCGACCCCTCCGGGACGG-CC-3'; EGFR antisense, 5'-CCCGGGGGCC-TGTGCAGCCTG-3' (733 bp as PCR product), Cyclin B sense, 5'-TTAATGCTGAAAAT-AAGGCG-3'; Cyclin B antisense, 5'-CAATT-ATTCTGCATGAACCG-3' (680 bp as PCR product), CDK 1 sense, 5'-GGTTCCTAGTA-CTGCAATTCG-3'; CDK 1 antisense, 5'-TTT-GCCAGAAATTCGTTTGG-3' (709 bp as PCR product), β -actin sense, 5'-AACACCCCAGC-

CATGTAC-3'; β -actin antisense, 5'-ATGT-CACGCACGATTTCC-3' (254 bp as PCR product).

III. 結 果

1. EXM 耐性株の樹立

EXM 耐性細胞株は, A431 親細胞 (P) に比較し形態的に差は認められなかった (Fig. 1A). 2 種の安定したクローン (A431EXM-1; IC₅₀=14 nM, A431EXM-2; IC₅₀=29 nM) が樹立され, それぞれ A431P に比べ 6.1~14.5 倍の EXM 耐性を示した. いずれも細胞数倍化時間は A431P とほぼ同様であった (data not shown).

2. 毒性試験

今回, 6 種のプロテアソーム阻害剤を使用した, EXM 耐性細胞株は, 感受性がそれぞれ異なるものの, すべてのプロテアソーム阻害剤に対して A431P と比し IC₅₀ からみて高い生存率を示した (Table 1, Fig. 1B).

3. 耐性細胞株の生化学的特徴

20S プロテアソーム活性に関与する β サブユニットの主要分子 P32 および P27 の蛋白発現は, いずれの耐性細胞株においても A431P 細胞に比較し増加していた (Fig. 2A). この増加は suc-

Table 1. Cytotoxic activity of various proteasome inhibitors on A431P and resistant variant

Agents	IC ₅₀ (nM) ²⁾	
	A431P	A431EXM-2
EXM ¹⁾	2.3	29
PSI	0.043	0.46
MG132	38	245
ALLN	2,100	3,200
NLSV	2,300	4,100
Lactacystin	3,500	15,000

A431P and the resistant variant (A431EXM-2) cells (1×10^4) were cultured with the test materials and DMSO as the control. After a 72-h incubation, the cell viability was determined by the MTT assay.

Results are the means of triplicate independent experiments.

¹⁾ Abbreviations are shown in the Materials and methods.

²⁾ IC₅₀; 50% inhibitory concentration of the test materials.

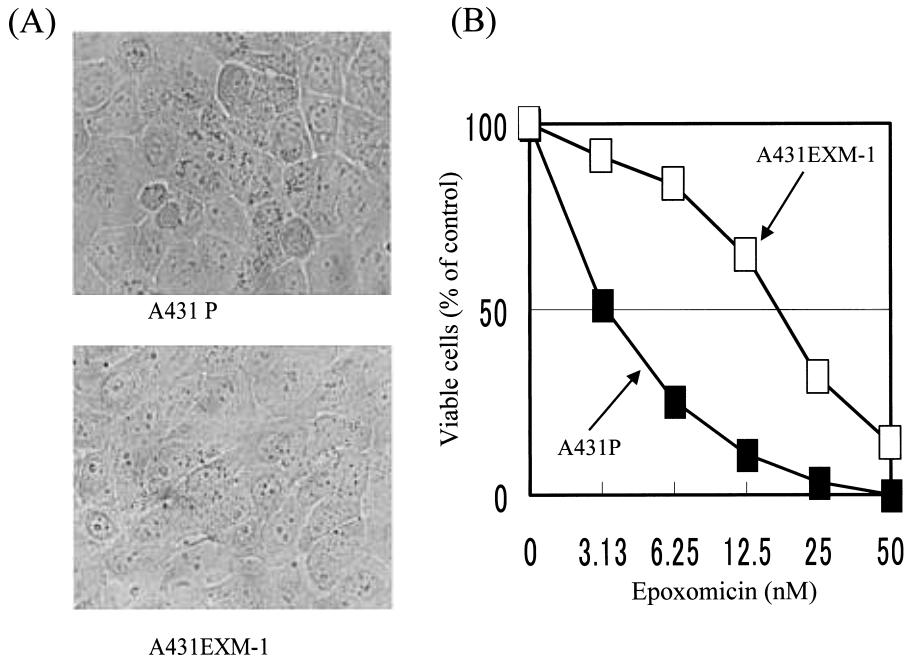


Fig. 1. (A) Morphology of A431 parental (P) and its epoxomicin (EXM)-resistant variant (EXM-1). (B) EXM-resistance of A431P and A431EXM-1 cells. Both cells (10^4) were treated with EXM as described in the text for continuous 72 h. MTT assays were carried out as described in Materials and Methods. The data are the means of triplicate independent experiments.

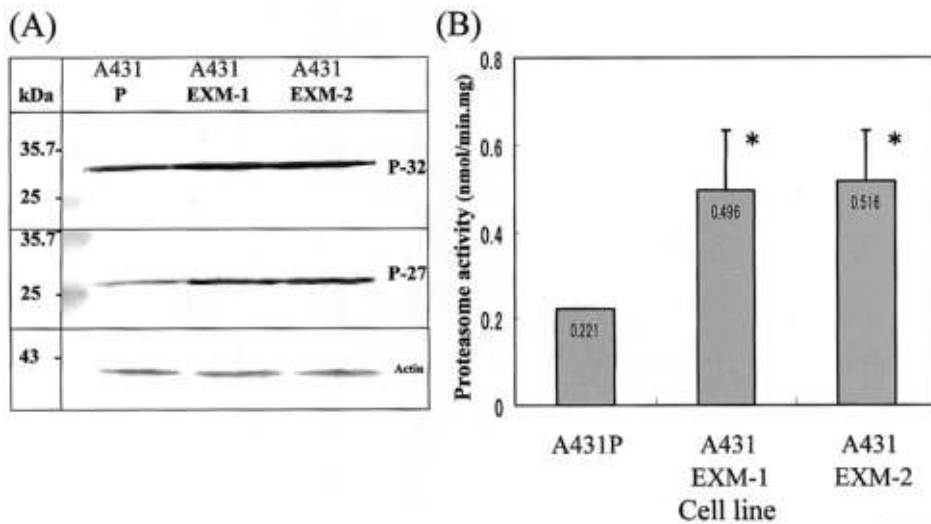


Fig. 2. Increased proteasomal activity
 (A) Cell lysates from A431P and its resistant cells were prepared by the method in Materials and Methods. After SDS-PAGE/Western blotting, the filters were probed with anti-P32 and -P27, recognizing β -subunit molecules of cylinder particles in the 20S proteasome. Actin was used as a loading control. kDa., kilodalton.
 (B) The enzyme assay in the lysates was performed using fluorogenic substrate, suc-LLVY-AMC as described in the text. Results represent the mean \pm SD of duplicate determinations of 2 independent experiments. Statistical significance: * $p < 0.05$, relative to A431P samples based on the Student's t -test.

LLVY-AMC 分解により測定したプロテアソーム活性が、耐性株で 2.2~2.3 倍に上昇していることから裏付けられた (Fig. 2B).

Fig. 3 は、細胞内でプロテアソーム依存性に発現制御され、おもに細胞増殖に關与するいくつかの代表的分子の耐性細胞内発現を示す。P53 の下流にあり細胞増殖抑制に働きの、プロテアソームにより分解制御されるサイクリン依存性キナーゼインヒビター P21^{WAF1} の蛋白レベルは、ほとんど変動もなく A431P と同程度であった。EXM 耐性細胞株では、EGFR の過剰発現が mRNA, 蛋白レベルとも観察され、これに伴い EGFR の消長においてユビキチンリガーゼ (E3) として働く c-Cbl の蛋白レベルも上昇した (Fig. 3A)。しかし興味あることに、c-Cbl の mRNA は A431P での発現に比し、極端に減少していた (Fig. 3B)。EXM 耐性細胞株では、また G₂/M 期通過に必須のサイクリン B と CDK1 の mRNA, 蛋白レベルの両方とも A431P に比較して過剰に発現していた (Fig. 3C, D)。EXM 耐性細胞株は 62 kDa のサイクリン B バンドを高発現している一方、EXM 感受性の親細胞である A431P 細胞を EXM で 7 時間一過性に処理した場合には、分子量のやや大きい 64 kDa サイクリン B バンドの蓄積を顕著に認めた。この 64 kDa バンドは、無処理 A431P 細胞においてはごくわずかな量のみであった (Fig. 3C arrow-head)。

アポトーシス制御の主要分子の一つである Bcl-2 は EXM 耐性細胞で増加し、異なる電気泳動移動度を有する 2 つのバンドとして認められた。ひとつは Bcl-2 と一致する分子量およそ 26 kDa のバンドであり、もう一つはやや分子量の大

細胞株では、また G₂/M 期通過に必須のサイクリン B と CDK1 の mRNA, 蛋白レベルの両方とも A431P に比較して過剰に発現していた (Fig. 3C, D)。EXM 耐性細胞株は 62 kDa のサイクリン B バンドを高発現している一方、EXM 感受性の親細胞である A431P 細胞を EXM で 7 時間一過性に処理した場合には、分子量のやや大きい 64 kDa サイクリン B バンドの蓄積を顕著に認めた。この 64 kDa バンドは、無処理 A431P 細胞においてはごくわずかな量のみであった (Fig. 3C arrow-head)。

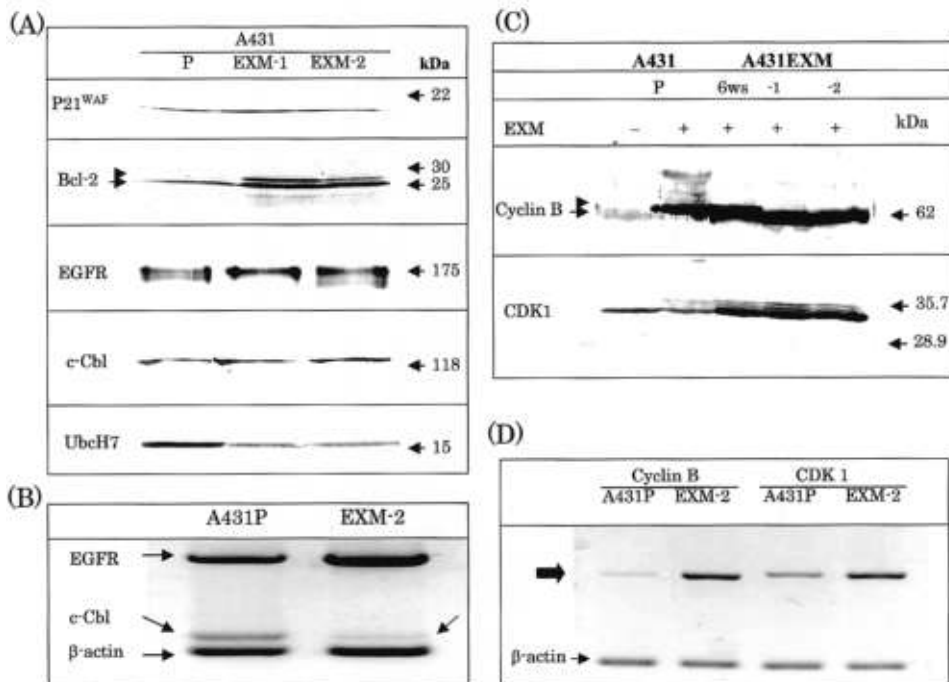


Fig. 3. Expression of several proteins regulated by ubiquitin-proteasome system.

(A) Both cells were cultured, harvested and lysed. SDS-PAGE/Western blot analyses were carried out using the respective antibodies. In Bcl-2, the arrowhead indicates the slow migrating Bcl-2 bands. (B and D) RT-PCR analyses of EGFR, c-Cbl, cyclin B and CDK1 mRNAs expression. Total RNA purified was reverse-transcribed as in the Materials and Methods. β-Actin fragment was used as an internal control. The size of the products was determined by the mobility of DNA marker. (C) Protein expression of cyclin B and CDK1. Each cell lysate was fractionated, blotted electrophoretically and probed with the respective antibodies. In the cyclin B analysis, the arrowhead indicates the slow migrating, probable ubiquitinated cyclin B bands. kDa., kilodalton.

きい 28 kDa バンドである (Fig. 3A). 28 kDa のバンドは, コントロールの親細胞においても検出されたが, その検出量はきわめて少なかった. また, 耐性細胞株における, ユビキチン結合酵素 UbcH7 蛋白産生は親細胞のものと比較し極端に少なかった (Fig. 3A).

IV. 考 察

我々が樹立した EXM 耐性細胞株は, 26S プロテアソームの活性ユニット分子種の高発現と活性の亢進が検出された. またすでに報告したように¹¹⁾, EXM 存在下にもかかわらずプロテアソーム阻害剤処理により SDS-PAGE 解析で通常の耐性でない細胞では認められる高分子領域のユビキチン化蛋白蓄積¹²⁾が両耐性株 (A431EXM-1, -2) ではほとんど認められず, 無処理 A431P と同様の所見を示した. これは両耐性株のプロテアソーム構成サブユニット分子の質的, 量的な変動の結果にもとづく活性亢進が充分裏づけられている. このようなプロテアソーム構成成分のサブユニット分子の量的変化についての報告は, パーキンソン病でプロテアソーム 20S サブユニット構成成分の一部の分子変化が認められたとすでに報告があり¹³⁾, 今後さらにプロテアソームサブユニットの変化が疾患別に疾患との関連の上で解析されるものと考ええる.

プロテアソーム活性が亢進した結果, 耐性を獲得したと考えられる今回の樹立耐性細胞株ではプロテアソーム依存性分解の基質として知られている増殖に関与する各種代表的な分子種の挙動を知ることが, 臨床で遭遇する可能性のある耐性細胞の性格を特定し, その耐性の克服の手掛かりを知る上で興味がある. P21^{WAF1} は P53 の下流にあり, 増殖抑制に働き, サイクリン依存性蛋白質リン酸化酵素抑制蛋白質であり, P53 とともにプロテアソームの基質として知られている¹²⁾. プロテアソームで分解される腫瘍増殖抑制分子群の P53, P27, そして P21^{WAF1} は, プロテアソーム阻害剤処理により通常細胞内濃度を増加させるが⁵⁾¹⁴⁾⁻¹⁷⁾, EXM 耐性株の P21^{WAF1} ではこの所見はなく, 蛋白発現レベルは親細胞とほぼ同じであった. この点, A431 は P53 機能が欠損していると報告されていることから¹⁸⁾, P53 欠損細胞である A431 細

胞株ではその下流で発現する P21^{WAF1} の発現にも欠損, あるいは低下があるのではないかと疑問もある. しかし, すでに報告したように¹¹⁾ 耐性株作成過程において開始 6 週時に得られた EXM 存在環境で増殖を続ける細胞に認められた P21^{WAF1} の一過性の発現亢進からも理解できるように, 分子発現に目立った異常はないと判断できた. またプロテアソーム阻害剤は P53 非依存性にも細胞死を誘導し, またプロテアソーム阻害による P21^{WAF1} 分子の蓄積も必ずしも P53 依存性でないことが報告されている³⁾. M 期サイクリンとして知られるサイクリン B とその標的分子 CDK1 は, ともに耐性細胞において高発現している. プロテアソーム阻害剤は細胞回転の G₂/M 期のブロックを来し増殖を止めることが知られている³⁾⁶⁾. サイクリン B は細胞周期上 G₂/M 期を回転するための必須分子であり, この分子の完全欠失あるいは機能欠損蛋白発現で M 期離脱が障害され細胞はアポトーシスに進む¹⁹⁾⁻²²⁾. サイクリン B と CDK1 複合体の分解は G₂/M 通過のための必須の出来事であり, プロテアソーム活性の亢進した耐性株細胞ではサイクリン B 分子のターンオーバーも亢進している可能性が十分推測されることから, 細胞回転のより円滑な維持には多くのサイクリン B 発現が必須のことと充分推測できる. これは耐性株がプロテアソーム阻害剤存在の過酷な環境下でも十分な増殖性格を維持していることを示している.

アポトーシスの鍵を握る因子の 1 つである Bcl-2 は, 耐性株細胞では A431P 細胞に比較し分子量のやや大きいバンドを主成分として認められた. Bcl-2 はプロテアソームにより分解制御されることが良く知られている²³⁾. 最近抗癌剤投与などストレス存在下細胞では Bcl-2 がリン酸化することでプロテアソーム依存の分解に抵抗し安定性を増し, 抗アポトーシス機能を維持することが報告されている²⁴⁾⁻³⁰⁾. EXM 耐性株に認められるやや高分子で電気泳動上移動度の遅いバンドはリン酸化 Bcl-2 と考えられる⁶⁾²³⁾³¹⁾. これはすでに我々の報告の様に¹¹⁾, λ -protein phosphatase 処理実験でこの画分が消失する事実から確実と思われる. 今回リン酸化 Bcl-2 がプロテアソームによる分解に抵抗することは直接観察してはいないの

で結論は得られていない。しかし耐性株で得られた Bcl-2 の変動から、これも EXM 存在という環境下での細胞の生存のための当然の形質転換と理解できる。

A431P は受容体型チロシンキナーゼの EGFR が強発現した細胞として知られている¹⁸⁾。しかも A431P 由来の 2 つの耐性株では、A431P に比較し EGFR の mRNA、蛋白とも発現がさらに亢進していた。EGFR の機能発現抑制に観察されるレセプターのユビキチン化は、レセプターの細胞内移行すなわちエンドサイトーシスと分解すなわちダウンレギュレーションに不可欠である。EGFR に対するユビキチンリガーゼ (E3) 酵素活性をもつ c-Cbl 蛋白は、ユビキチン活性化酵素 (E1) と結合酵素 (E2) を介してレセプターのユビキチン化とダウンレギュレーションを直接的に支配する負の調節因子である。c-Cbl 分子の関与するレセプター細胞内輸送は、EGFR へのユビキチン分子の共有結合が必須であり、最終的にはユビキチン化レセプターはライソゾームへ移送され分解される。一般的に c-Cbl 発現と、EGFR 発現との間には密接な相互関係が認められている。たとえば、EGF 刺激下 c-Cbl 蛋白の高発現細胞では、リガンド誘導性 EGFR のダウンレギュレーションが亢進することが知られている^{32)–35)}。逆に EGF 刺激による EGFR の高自己リン酸化は、c-Cbl 低発現細胞で強く認められている³⁴⁾³⁵⁾。今回我々も、EGFR 高発現の EXM 耐性細胞では、親細胞と比較して c-Cbl mRNA の極端な低下という同様の結果を得ている。さらに、c-Cbl 活性低下や抑制による EGFR の細胞内移行と分解の低下の結果、EGFR の細胞膜上での蓄積を助長したことも示唆された。それではなぜ c-Cbl mRNA の極端な減少にもかかわらず EGFR ダウンレギュレーションに促進的に働く c-Cbl 蛋白量がむしろ増加傾向を示したのだろうか。c-Cbl 蛋白依存性のユビキチン化を中心とする一連の EGFR 分解過程は、通常分子量 85 kDa の Cbl 関連蛋白 (CIN85) と c-Cbl と EGFR を主とする複合体として移送され、いずれの分子もライソゾームで分解される³⁷⁾。この過程で、リガンド刺激後 EGFR のユビキチン化にあわせて c-Cbl も自己ユビキチン化する。これら反応の結果、細胞内輸送され、分解

のためライソゾームに移送されたこれら蛋白群のうち、EGFR は完全に分解される一方、c-Cbl は脱ユビキチンされ、大部分が細胞質内で再利用されることが知られている³⁶⁾³⁷⁾。このことは、耐性細胞株において、c-Cbl mRNA が極端に低下していたにもかかわらず c-Cbl 蛋白の集積がみられたことの原因の 1 つであると考えられる。EGF/EGFR を介するシグナル伝達ではリガンドである EGF の結合による EGFR のリン酸化と続いておこるユビキチン化が、EGFR のエンドサイトーシスとダウンレギュレーションのために必須の分子修飾であり、E3 の c-Cbl とともに E2 分子群の 1 つとしてこれに深くかかわる^{32)33)38)–40)} ユビキチン結合酵素 H7 (UbcH7) は対照 A431P に比較すると耐性細胞では減少しており、この一連の反応を抑制へと傾けている。以上をまとめると、EXM 耐性細胞で認められた EGFR の増加とその適度の持続は、プロテアソーム阻害剤存在下という過酷な環境下では大切な増殖刺激維持への 1 つの表現型と考えられる。しかし EGFR の過剰発現あるいは EGF 過刺激細胞のように増殖優勢に傾いた状況下では、このシグナル伝達経路を円滑にすすめるため常に負の制御に働く c-Cbl の過剰発現を伴うのが一般であり³⁴⁾³⁶⁾、我々の樹立した耐性株でも EGFR 増加に対応してたしかに c-Cbl 蛋白の軽度の増加を示し、この細胞の強い増殖能維持には都合の悪い負の制御の可能性を認める。しかし、上述のように興味あることに同時にこの一連のプロセスに深く相互作用し共同して働く E2-UbcH7-の極端な低下が認められており、ユビキチン化反応過程全般を抑えることで過酷な環境下での過度の増殖抑制を来たさない様に c-Cbl 機能を適度に制御している可能性も強く示唆された。本細胞における EGFR リン酸化の程度、そして c-Cbl, UbcH7 発現変化の EGFR ダウンレギュレーションへの直接の影響や変動データは今回得ていないので明確には述べられないが、この細胞が示すこれら一連の分子群の変化はいずれも活性化 EGFR の過度のダウンレギュレーションを抑制するための EXM 存在下での細胞の獲得した増殖抑制あるいは遅延からの防御機能の結果なのかも知れない。しかしこれに関して我々は EXM 耐性細胞が細胞内に蓄積するはずのマル

チユビキチン化蛋白がきわめて少ない事実を報告しており¹¹⁾, この結果と合わせて考えるとむしろユビキチン/プロテアソームシステムのうち E2, E3 以外のユビキチン化反応過程すなわち E1 あるいは脱ユビキチン化各反応に関与する分子群も変化している可能性も否定できない。

我々が樹立したプロテアソーム阻害剤-EXM-耐性細胞はプロテアソーム阻害剤耐性株として普遍的な性格をもち, 特殊な選ばれた性格のみを獲得した特殊細胞ではないことが EXM を含む 6 種のプロテアソーム阻害物質に対する耐性度の検討で推測できた。すなわち耐性細胞に対する増殖抑制効果を発揮する各阻害剤の IC₅₀ でみた濃度は様々だが, いずれに対しても耐性株は A431P 細胞に比較して高い生存率を示した。これは我々が樹立した EXM 耐性細胞の性格が特別なものではなく他のプロテアソーム阻害剤にも共通に耐性を発揮する基本的な性質を有していることを物語っており, 臨床の場でも容易にしかも十分起こりうる耐性獲得の過程と考えられた。

プロテアソーム阻害剤 PS-341 はすでに臨床治療が進んでいるが, 多くの抗癌剤が標的細胞にみられるいろいろの耐性機構の発現により有効性を低下させているのと同様な危惧が予想される。今後この 2 つの細胞株を用い, 臨床応用の結果起こる可能性の充分あるプロテアソーム阻害剤耐性の克服のための有効な方策の検索, 再発時のセカンドライン化学療法確立のための有効併用剤の特定等, 臨床応用に貢献できる研究を進展させる予定である。また本細胞株は, 未知分野の多いユビキチン/プロテアソームシステムの機能解明という基礎研究にも有用な材料として提供できる細胞株と考える。

V. 結 語

1. われわれは EXM に対する耐性 A431 亜株 A431EXM-1, A431EXM-2 を樹立した。
2. 本細胞株では, 26S プロテアソーム活性が亢進していた。
3. プロテアソーム阻害剤存在下で, プロテアソームにより分解抑制されかつ細胞増殖にかかわる代表分子種は増殖維持のための発現変化をきたしていることが示唆された。

4. 今後, 本細胞株はプロテアソーム阻害剤耐性克服の研究に有用であると考ええる。

稿を終えるにあたりご指導を賜りました, 東京慈恵会医科大学学生化学講座, 大川 清教授, ならびにお世話になった教職員の方々に深謝いたします。

文 献

- 1) Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425-79.
- 2) Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 1015-68.
- 3) Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective anti-tumor agents. *Cancer Res* 1999; 59: 2615-22.
- 4) Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 3071-6.
- 5) Adams J. Preclinical and clinical evaluation of proteasome inhibitor PS-341 for the treatment of cancer. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6: 493-500.
- 6) Ling Y-H, Liebes L, Ng B, Buckley M, Elliot PJ, Adams J, et al. PS-431, a novel proteasome inhibitor, induces Bcl-2 phosphorylation and cleavage in association with G2-M phase arrest and apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 841-9.
- 7) Le Blance R, Catley LP, Hideshima T, Lentzsch S, Mitsiades CS, Mitsiades N, et al. Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth *in vivo* and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 2002; 62: 4996-5000.
- 8) Orłowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, Stahl S, et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4420-7.
- 9) Meng L, Mohan R, Kwok BH, Eloffson M, Sin N, Crews CM. Epoxomicin, a potent and

- selective proteasome inhibitor, exhibits *in vivo* antiinflammatory activity. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 10403-8.
- 10) Asakura T, Ohkawa K, Takahashi N, Takada K, Inoue T, Yokoyama S. Glutathione-doxorubicin conjugate express potent cytotoxicity by suppression of glutathione S-transferase activity: comparison between doxorubicin-sensitive and -resistant rat hepatoma cell. Br J Cancer 1997; 76: 1333-7.
 - 11) Ohkawa K, Asakura T, Aoki K, Shibata S, Minami J, Fujiwara C, et al. Establishment and some characteristics of epoxomicin (a proteasome inhibitor) resistant variants of the human squamous cell carcinoma cell line, A431. Int J Oncol 2004; 24: 425-33.
 - 12) Ishibashi Y, Takada K, Joh K, Okhkawa K, Aoki T, Matsuda M. Ubiquitin immunoreactivity in human malignant tumors. Br J Cancer 1991; 63: 320-2.
 - 13) McNaught KSTP, Belizaire R, Jenner PC, Olanow W, Isacson O. Selective loss of 20S proteasome α -subunits in the substantia nigra pars compacta in Parkinson's disease. Neurosci Lett 2002; 326: 155-8.
 - 14) Mitsiades N, Mitsiades CS, Paulaki V, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 14374-9.
 - 15) Dietrich C, Bartsch T, Schanz F, Oesch F, Wieser RJ. P53-dependent cell cycle arrest induced by N-acetyl-L-leuciny-L-leuciny-L-norleucinal in platelet-derived growth factor-stimulated human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 10815-9.
 - 16) Lopes UG, Erhardt P, Yao R, Cooper GM. P53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. J Biol Chem 1997; 272: 12893-6.
 - 17) Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J, Smitherman M, Robherts JM, Clurman BE. Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. Mol Cell 2000; 5: 403-10.
 - 18) Park DJ, Nakamura H, Chumakov AM, Said JW, Miller CW, Chen DL, et al. Transactivational and DNA binding abilities of endogenous p53 in p53 mutant cell lines. Oncogene 1994; 9: 1899-906.
 - 19) Minshull J, Blow JJ, Hunt T. Translation of cyclin mRNA is necessary for extract of activated Xenopus eggs to enter mitosis. Cell 1989; 56: 947-56.
 - 20) Murray AW, Solomon MJ, Kirschner MW. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. Nature 1989; 339: 280-6.
 - 21) King RW, Deshaies RJ, Peters J-M, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. Science 1996; 274: 1652-9.
 - 22) Murray AW, Kirschner MW. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. Nature 1989; 339: 275-80.
 - 23) Brichesse L, Barboule N, Heliez C, Valette A. Bcl-2 phosphorylation and proteasome-dependent degradation inhibited by paclitaxel treatment: consequences on sensitivity of isolated mitochondria to bid. Exp Cell Res 2002; 278: 101-11.
 - 24) Halder S, Jena N, Croce CM. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 4507-11.
 - 25) Ling Y-H, Tornos C, Perez-Soler R. Phosphorylation of Bcl-2 is a marker of M phase events and not a determinant of apoptosis. J Biol Chem 1998; 273: 18984-91.
 - 26) Scatena CD, Stewart ZA, Mays D, Tang LJ, Keefer CJ, Leach SD, et al. Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and taxol-induced growth arrest. J Biol Chem 1998; 273: 30777-84.
 - 27) Srivastava RK, Srivastava AR, Korsmeyer SJ, Nesterova M, Cho-Chung YS, Longo DL. Involvement of microtubules in the regulation of Bcl-2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. Mol Cell Biol 1996; 18: 3509-17.
 - 28) Srivastava RK, Mi Q-S, Hardwick M, Longo DL. Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 3775-80.
 - 29) Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G₂/M. Mol Cell Biol 1999; 19: 8469-78.
 - 30) Mai H, May WS, Gao F, Jin Z, Deng X. A functional role for nicotine in Bcl-2 phosphorylation and suppression of apoptosis. J Biol

- Chem 1999; 19: 1886-91.
- 31) Vantieghem A, Xu Y, Assefa Z, Piettes J, Vandenheede JR, Merlevede W, et al. Phosphorylation of Bcl-2 in G₂/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 37718-31.
 - 32) Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, et al. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 1999; 4: 1029-40.
 - 33) Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Yarden Y. The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1999; 274: 22151-4.
 - 34) Ueno H, Sasaki K, Miyagawa K, Honda H, Mitani K, Yazaki Y, et al. Antisense repression of proto-oncogene c-Cbl enhance activation of the JAK-STAT pathway but the ras pathway in epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 1997; 272: 8739-43.
 - 35) Miyake S, Lupper ML Jr, Druker B, Band H. The tyrosine kinase regulator Cbl enhances the ubiquitination and degradation of the platelet-derived growth factor receptor α . *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7927-32.
 - 36) Ettenberg SA, Magnifico A, Cuello M, Nau MM, Rubinstein YR, Yarden Y, et al. Cbl-dependent coordinated degradation of the epidermal growth factor receptor signaling complex. *J Biol Chem* 2001; 276: 27677-84.
 - 37) Haglund K, Shimokawa N, Szymkiewicz I, Dikic I. Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation EGF receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12191-6.
 - 38) Joazeiro CA, Wing SS, Huang H-K, Levenson JD, Hunter T, Liu Y-C. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 1999; 286: 309-12.
 - 39) Yokouchi M, Kondo T, Houghton A, Bartkiewicz M, Horne WC, Zhang H, et al. Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and UbcH7. *J Biol Chem* 1999; 274: 31707-12.
 - 40) Thien CBF, Walker F, Langdon WY. RING finger mutations that abolish c-Cbl-directed polyubiquitination and down-regulation of the EGF receptor are insufficient for cell transformation. *Mol Cell* 2001; 7: 355-65.