

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	病態制御科学領域 内分泌代謝内科学教育研究分野 氏名 杉山 綾
(論文題目) Inhibition of heat shock protein 90 decreases ACTH production and cell proliferation in AtT-20 cells (AtT-20 細胞における Hsp90 阻害による ACTH 産生及び細胞増殖の抑制作用)	
(内容の要約) <b>【目的】</b> 下垂体 adrenocorticotrophic hormone(ACTH)産生腫瘍によって引き起こされるクッシング病治療の第一選択は腫瘍摘除である。完全摘除ができなかった場合、再手術や放射線治療、薬物治療などの追加治療が必要とされるが、現時点では有効な治療法は確立されていない。 本研究では、下垂体 ACTH 産生 AtT-20 細胞において heat shock protein 90(Hsp90)阻害剤による ACTH 産生能や細胞増殖への影響を調べた。さらに AtT-20 移植マウスを用いて、 <i>in vivo</i> での効果を検討した。 <b>【対象と方法】</b> マウス下垂体 ACTH 産生 AtT-20 細胞を DMEM 培地で継代培養した。同細胞に 17-AAG または CCT018159 を添加し、proopiomelanocortin (POMC) mRNA および pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG1) mRNA の発現を定量 PCR 法にて検討した。また培養液中 ACTH 濃度を ELISA 法にて測定した。両薬剤による cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein(CREB) 及び extracellular signal-related kinases (ERK)、Akt のリン酸化を Western blot 法にて評価した。続いて、WST-8 法により細胞増殖の変化を、DNA fragmentation の検出によりアポトーシスを検討した。更に、FACS 解析により細胞周期について検討した。統計学的処理は ANOVA を用い、引き続き Fisher's PLSD post-hoc test を行なった。P < 0.05 をもって有意とした。 また、AtT-20 細胞をヌードマウスに皮下移植し、CCT018159 投与群と溶媒投与のみのコントロール群に分類し、皮下注射した。マウスの体重を測定し、薬剤投与 2 週間後に腫瘍摘出、体幹採血を行った。腫瘍細胞の POMC mRNA 及び PTTG1 mRNA 発現を定量 PCR 法にて検討した。血中 ACTH 及びコルチコステロン濃度を ELISA 法にて測定した。統計学的処理は unpaired Student's <i>t</i> test を用いた。P < 0.05 をもって有意とした。 <b>【結果】</b> AtT-20 細胞において、Hsp90 阻害剤である 17-AAG 及び CCT018159 投与により、POMC mRNA 及び PTTG1 mRNA 発現は低下した。また培養液中 ACTH も低下した。Western blot では、両薬剤投与により CREB 及び ERK のリン酸化は抑制され、一方で Akt のリン酸化は促進された。また、両薬剤ともに細胞増殖の抑制効果、DNA fragmentation の増加効果がみられた。FACS では、両薬剤ともに G2/M 期の細胞数の割合が増加した。また、17-AAG では S 期の細胞数の割合が減少した。 <i>In vivo</i> の検討では、AtT-20 移植マウスにおいて、CCT018159 投与によりマウスの体重減少は抑制され、腫瘍重量は有意に低下した。また、腫瘍細胞の PTTG1 mRNA 及び POMC mRNA、血中 ACTH 及びコルチコステロン値も CCT018159 投与群で有意に低下した。	

### 【考察】

Hsp90 阻害剤は乳がんや食道癌、メラノーマなどに対する効果が期待され、現在臨床研究が行われている(1,2)。本研究では、17-AAG と CCT018159 は AtT-20 細胞において POMC mRNA と培養液中 ACTH 濃度を減少させた。この結果により、Hsp90 阻害剤は ACTH の合成・分泌を抑制させる効果を持つことが考えられた。また、細胞増殖の抑制及びアポトーシスの誘導がみられ、FACS では G2/M 期の細胞増加を認めた。G2 期の細胞増加は DNA 障害に関係することが知られており、Hsp90 阻害剤は細胞周期の進行を停止させることにより細胞増殖を抑制すると考えられた。加えて、両薬剤は AtT-20 細胞において PTTG1 mRNA 発現も抑制させた。PTTG1 は細胞周期の進行を促進させる作用を持っており(3)、AtT-20 細胞において Hsp90 阻害剤による細胞増殖抑制に PTTG1 が関与していることが示唆された。

*In vivo* の検討では、水溶性を特徴とする CCT018159 を用いた(4)。CCT018159 群ではマウスの体重減少の抑制、腫瘍重量の低下、腫瘍中の POMC mRNA 及び PTTG1 mRNA 発現の低下、血中 ACTH 濃度及びコルチコステロン値の低下を認めた。CCT018159 は *in vivo* においても抗腫瘍効果や ACTH 合成抑制効果を持つと考えられた。

以上より、Hsp90 阻害剤は *in vitro* 及び *in vivo* において、ACTH 合成抑制及び ACTH 産生腫瘍細胞の増殖抑制効果を持つことが示された。

### 【参考文献】

- 1) Born EJ et al. Targeting HSP90 and monoclonal protein trafficking modulates the unfolded protein response, chaperone regulation and apoptosis in myeloma cells. *Blood Cancer J* 2013; 3:e167
- 2) Ui T et al. The HSP90 inhibitor 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-AAG) synergizes with cisplatin and induces apoptosis in cisplatin-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell lines via the Akt/XIAP pathway. *Oncol Rep* 2014; 31:619–624
- 3) Hernandez A et al. HDAC and Hsp90 inhibitors down-regulate PTTG1/securin but do not induce aneuploidy. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48:194–201
- 4) Sharp SY et al. In vitro biological characterization of a novel, synthetic diarylpyrazole resorcinol class of heat shock protein 90 inhibitors. *Cancer Res* 2007; 67:2206–2216