

論 文 内 容 要 旨

題目 Activating transcription factor 4, an ER stress mediator, is required for, but excessive ER stress suppresses osteoblastogenesis by bortezomib

(小胞体ストレスメディエーターである ATF4 はボルテゾミブによる骨芽細胞分化に必須であるが、過剰な小胞体ストレスは骨芽細胞分化を抑制する)

著者 Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Shinsuke Kido, Ayako Nakano, Masahiro Hiasa, Asuka Oda, Hiroe Amou, Keiichiro Watanabe, Takeshi Harada, Shiro Fujii, Kyoko Takeuchi, Kumiko Kagawa, Shuji Ozaki, Toshio Matsumoto, Masahiro Abe

平成 25 年発行 International Journal of Hematology に発表予定

内容要旨

新規抗骨髄腫治療薬であるプロテアソーム阻害薬ボルテゾミブ(Bor)は、小胞体ストレスを惹起し、抗腫瘍作用とともに骨芽細胞分化をもたらすことが注目されている。Activating transcription factor 4 (ATF4)は、ATF/CREB ファミリーに属する塩基性ロイシンジッパー型転写因子で、小胞体ストレスによりその翻訳が亢進し、プロテアソームで分解される。ATF4 は、骨芽細胞の初期分化を惹起する Runx2 と協調的に作用し骨芽細胞の成熟を促進する骨芽細胞分化に必須の因子である。プロテアソーム阻害薬は小胞体ストレスを惹起することから、Bor の骨芽細胞分化誘導に ATF4 の関与が示唆されるが、Bor による骨芽細胞分化誘導の機序は不明なままである。そこで、申請者は Bor により誘導される小胞体ストレスの骨芽細胞分化に及ぼす影響を明らかにするために、ATF4 の役割に着目し以下の検討を行った。

Bor は、骨髄間質細胞や MC3T3-E1 前骨芽細胞株の ATF4 蛋白量を用量依存的に増加させた。この Bor による ATF4 蛋白量の増加が蛋白翻訳の抑制薬である cycloheximide の添加によりほぼ消失したことより、この ATF4 蛋白量の増加はプロテアソーム阻害により分解が抑制された ATF4 の細胞内蓄積ではなく、

## 様式(8)

小胞体ストレスによる ATF4 の蛋白翻訳の誘導によると考えられた。ATF4 の標的遺伝子で骨芽細胞分化の後期に発現する、オステオカルシンのプロモーター活性は、Bor の添加により MC3T3-E1 細胞において増強した。オステオカルシンは Runx2 の標的遺伝子でもあるため Runx2 ノックダウン下での Bor の影響をさらに検討した。Runx2 のノックダウン下でも Bor はオステオカルシンのプロモーター活性を増強したが、ATF4 siRNA の添加によりその大部分が抑制された。また、低用量の Bor による石灰化結節の形成促進活性は、ATF4 siRNA の添加により抑制された。これらの結果より、ATF4 の Bor による骨芽細胞分化誘導における重要な役割が示された。

しかしながら、Bor は、低用量(1-10 nM)では MC3T3-E1 細胞による石灰化結節の形成を促進したが、高用量(20nM 以上)ではその効果が消失しており、さらに骨芽細胞分化マーカーのオステリックスやオステオカルシンの発現を抑制していた。さらに、Bor は用量依存性に eIF2 $\alpha$  のリン酸化を増加し、20 nM 以上の高用量では CHOP の発現とともに MC3T3-E1 の細胞死がみられ、ATF4-CHOP 経路によるアポトーシスが誘導されていると考えられた。このように、Bor は高用量では ATF4 の発現を増加させるものの骨芽細胞分化を障害するため、Bor の骨芽細胞分化誘導効果を最大限に引き出すためには、現在のボラス投与に代わる投与方法の最適化の検討が必要と思われる。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 <b>1177</b> 号	氏名	中村 信元
審査委員	主査 親泊 政一教授 副査 佐々木 卓也教授 副査 西岡 安彦教授		

**題目** Activating transcription factor 4, an ER stress mediator, is required for, but excessive ER stress suppresses osteoblastogenesis by bortezomib  
 (小胞体ストレスメディエーターである activating transcription factor 4はボルテゾミブによる骨芽細胞分化に必須であるが、ボルテゾミブによる過剰な小胞体ストレスは骨芽細胞分化を抑制する)

**著者** Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Shinsuke Kido, Ayako Nakano, Masahiro Hiasa, Asuka Oda, Hiroe Amou, Keiichiro Watanabe, Takeshi Harada, Shiro Fujii, Kyoko Takeuchi, Kumiko Kagawa, Shuji Ozaki, Toshio Matsumoto, Masahiro Abe

平成 25 年発行 International Journal of Hematology に掲載予定  
 (主任教授 松本俊夫)

**要旨** 小胞体ストレスは基質産生を活発に行う骨芽細胞で惹起されており、骨芽細胞分化において重要な役割を果たしている。プロテアソーム阻害薬の骨形成作用が報告されているが、プロテアソーム阻害薬で惹起された小胞体ストレスが、骨芽細胞分化に及ぼす影響は明らかではない。そこで、申請者はボルテゾミブによる小胞体ストレスが、骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した。得られた結果は以下に要約される。

1. ボルテゾミブを MC3T3-E1 マウス前骨芽細胞株、間質細胞株、ヒト骨髄間質細胞に添加すると、用量および時間依存性に activating transcription factor 4 (ATF4) の蛋白質レベルが増加した。この ATF4 蛋白質量の増加は、シクロヘキシミドの添加によりほぼ完全に抑制された。このことより、ボルテゾミブによる小胞体ストレスの誘導が、ATF4 の翻訳を促進することが考えられた。
2. オステオカルシンのプロモーターを導入した MC3T3-E1 細胞では、ボルテゾミブはオステオカルシンのプロモーター活性を増強した。*Runx2* siRNA 併用下では、ボルテゾミブによるオステオカルシンのプロモーター活性の増強は、*Atf4* siRNA で大部分が抑制された。さらに、*Atf4* siRNA はボルテゾミブによる石灰化結節形成の促進を抑制した。
3. ボルテゾミブは 10nM 以下では、MC3T3-E1 細胞の石灰化結節形成を促進したが、20nM 以上ではこれを強力に抑制した。
4. ボルテゾミブ 20nM 以上では、MC3T3-E1 細胞の  $\beta$ -カテニン、オステリックスの蛋白質発現が抑制されるとともに、CHOP の発現が誘導され、MC3T3-E1 細胞に細胞死が誘導された。

以上より、低用量のボルテゾミブは骨芽細胞分化の促進を惹起させるものの、高用量のボルテゾミブは過剰な小胞体ストレスを惹起し、骨芽細胞分化に必須の蛋白質の発現を抑制し、骨芽細胞にアポトーシスを誘導した。したがって、ボルテゾミブの骨芽細胞分化促進作用というユニークな治療効果を最大限に引き出すためには、その投与方法の最適化の検討が必要であると考えられた。

本研究はボルテゾミブの用量により、骨芽細胞分化に与える影響が大きく異なることを明らかにした。骨髄腫におけるボルテゾミブの投与の最適化により、骨形成作用を有効に引き出すうるボルテゾミブの至適投与方法を示唆したもので、学位授与に値する者と判定した。