

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17652

研究課題名(和文)ボルテゾミブを用いた、Rhoを介した肺血管透過性亢進のメカニズムと治療法の解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of Rho-mediated pulmonary vascular permeability enhancement using bortezomib.

研究代表者

柏田 建 (Kashiwada, Takeru)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50754991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：選択的 26S プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブ(BTZ)は、多発性骨髄腫およびマンツル細胞リンパ腫において臨床的に有用である。この研究で、我々はBTZが内皮細胞の透過性亢進を増加する機序を研究した。BTZは血管内皮細胞のRhoタンパク質を増加させ、Rho-ROCK経路を介してストレスファイバーの形成を生じ、Rho依存的に血管透過性を亢進した。また、BTZによるストレスファイバー形成が、炎症と相乗的な作用を持つことを見出した。このことから、BTZは内皮細胞にRhoを蓄積し、炎症によるRho活性化を増強して、血管透過性を亢進させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本検討は、ボルテゾミブによる肺障害発症機序の分子メカニズムを検討した初めての報告である。我々は、ボルテゾミブが内皮細胞中にRhoの蓄積を来し、Rho依存的透過性亢進を惹起し、肺障害を来すことを見出した。この結果は、Rho依存的な透過性亢進が薬剤性肺障害を含む間質性肺炎の発症機序となりえる可能性を示唆する。プロテアソーム阻害剤の機能や、肺炎を含む内皮細胞炎症の病態解明において、新たな視点をもたらすと考える。

研究成果の概要(英文)：Bortezomib (BTZ), a selective 26S proteasome inhibitor, has clinical utility in multiple myeloma and mantle cell lymphoma. Prior to approval of treatment, several pulmonary complications were reported with BTZ, including capillary leak syndrome of the vascular hyperpermeability type, the frequency of which has decreased markedly in recent years with the use of steroids. In this study, we investigated the mechanism by which BTZ increases endothelial cell permeability. BTZ increased Rho protein in vascular endothelial cells, resulting in stress fiber formation via the Rho/ROCK pathway and enhanced vascular permeability in a Rho-dependent manner. We also found that stress fiber formation by BTZ has additive effects with inflammatory cytokines. This suggests that BTZ may accumulate Rho in endothelial cells, amplifying the active GTP-bound state of RhoA due to inflammation and increasing vascular permeability.

研究分野：呼吸器疾患

キーワード：薬剤性肺障害 ボルテゾミブ Rho

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ボルテゾミブは可逆的プロテアソーム阻害剤に分類される抗腫瘍薬である。プロテアソームの26Sキモトリプシン様活性を選択的に阻害し、悪性細胞に機能異常とアポトーシスを引き起こす。多発性骨髄腫治療の第一選択薬として、レナリドミド、デキサメタゾンとの併用療法で使用されている。

ボルテゾミブの有害事象として、血小板数減少、末梢神経障害等が知られているが、そのほかにも、肺障害が特徴的な副作用として報告されている。近年では肺障害の頻度少ないが、ボルテゾミブの治療承認以前は、個人輸入等での使用で、死亡例を含む多数の肺合併症が発生し、問題となっていた。

近年、肺障害頻度が減少した原因は不明であるが、既報では抗癌剤としてステロイドを併用された患者では、肺障害の発症率が減少したことが示されている。このことは、治療承認後の、ステロイド併用によるボルテゾミブ投与が、肺障害の減少に寄与している可能性を示唆している。また、ボルテゾミブ誘発肺炎は、従来の薬剤性間質性肺炎とは異なる発症パターンを示すことが知られる。発熱や全身性の炎症を伴う肺の病変が観察される。また、毛細血管漏出症候群 (CLS) 様、低酸素血症が見られる。

血管透過性は、内皮細胞の細胞間接着によって制御されている。炎症時に肺血管の透過性が亢進し、ARDS、肺水腫、CLSなどの重篤な病態に至ることはよく知られている。炎症性メディエーターは、低分子GTPaseであるRhoを介して作用する。活性化したRho-GTPはミオシン軽鎖をリン酸化し、細胞質内に収縮性のアクチン細胞骨格であるストレスファイバーを形成し、結果として内皮細胞の接着を破壊して透過性を増大させる。

### 2. 研究の目的

本研究では、ボルテゾミブが「血管透過性亢進型」の肺障害を引き起こす分子機序を解明し、治療法の開発を目指すものである。

そのため、申請者は、「ボルテゾミブは、内皮細胞のRho蛋白質の蓄積により、炎症性メディエーターによるRhoシグナルを増強し、血管透過性亢進による肺障害を起こす」という仮説を検証する。

### 3. 研究の方法

ボルテゾミブが炎症と相乗的に「血管透過性亢進型」肺障害を引き起こす分子機序を解明するため、

- (1) . ボルテゾミブによる内皮細胞の接着、透過性へ及ぼす影響を解析する。
  - ・培養内皮細胞をボルテゾミブで処理し、透過性アッセイを用いて透過性が亢進するか解析する
  - ・培養内皮細胞をボルテゾミブで処理し、内皮細胞にRho依存的なストレスファイバーが形成され、内皮細胞間接着が破綻することを、免疫染色やライブイメージング法で解析する
- (2) . ボルテゾミブによるRhoシグナルの変化と、透過性との関連を解析する
  - ・培養内皮細胞をボルテゾミブで処理し、内皮細胞のRho蛋白質が変動するかを、ウェスタンブロットング法で解析する。
  - ・培養内皮細胞をボルテゾミブで処理し、内皮細胞中のRhoGTPの変動を、pull-downアッセイ法で解析する
- (3) . ボルテゾミブが炎症性メディエーターによる内皮細胞接着の破壊および血管透過性の亢進に与える効果を検討する
  - ・培養内皮細胞にボルテゾミブと炎症性メディエーターを処理し、上記方法を行いその相乗効果を解析する

#### 4. 研究成果

下記の結果を得た。

- (1) 内皮細胞の Rho 蛋白が、ボルテゾミブ刺激により増加した。(図 1 a,b)

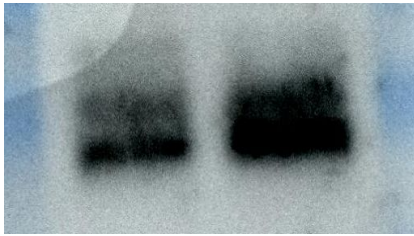


図 1a

内皮細胞での RhoA 蛋白

左 コントロール 右 Bortezomib 処理

ボルテゾミブ処理により RhoA 蛋白の増加を認める

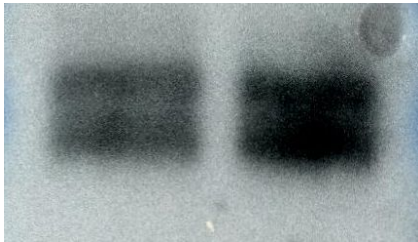


図 1b

内皮細胞での RhoC 蛋白

左 コントロール 右 Bortezomib 処理

ボルテゾミブ処理により RhoC 蛋白の増加を認める

- (2) ボルテゾミブ投与により内皮細胞のストレスファイバーが濃度、時間依存的に増加した。(図 2)

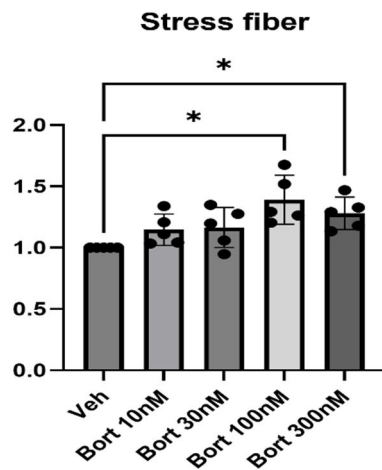


図 2 :

ボルテゾミブ投与によりストレスファイバー形成が誘導された

- (3) ボルテゾミブは内皮細胞において、Rho 依存的に内皮細胞間接着の破綻をきたした。(図 3)

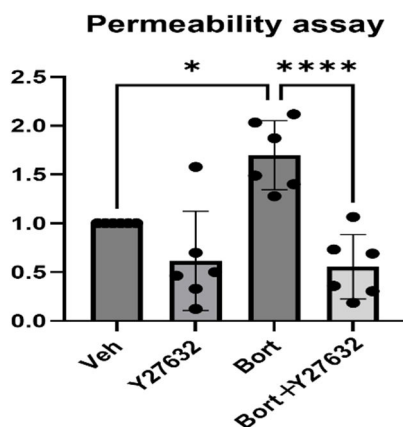


図 3 :

ボルテゾミブ投与内皮細胞の透過性が亢進した。  
ボルテゾミブによる透過性亢進作用は、Rho 阻害剤 (Y27632) によって、阻害された

(4) ボルテゾミブの内皮細胞ストレスファイバー形成は、炎症性メディエータと相乗的な効果がある。

上記を見出した。

ボルテゾミブがプロテアソーム阻害作用を介し、内皮細胞に Rho 蛋白質を蓄積させることが、炎症時の Rho 活性化をより強い反応とすることが、肺障害の原因となることが示唆された。

それらの結果を、日本呼吸器学会総会に発表し、論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 10.二島 駿一、柏田 建ら(2/7名)
2. 発表標題 プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブによるcapillary leak syndrome発症機序の解析
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二島 駿一
2. 発表標題 プロテアソーム阻害剤 ボルテゾミブによる capillary leak syndromeの発症機 序
3. 学会等名 日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------