

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18436

研究課題名(和文) 悪性末梢神経鞘腫に対する新規治療薬(デブシペプチド類縁体)の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic agents for malignant peripheral nerve sheath tumor

研究代表者

西條 憲 (Saijo, Ken)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70636729

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)：悪性末梢神経鞘腫(MPNST)は軟部肉腫の一疾患であり、有効な治療薬がなく予後不良で、新規治療薬の開発が待望されている。申請者は、デブシペプチド類化合物がHDAC/PI3K 2重阻害という新しい作用機序でがん細胞の増殖を抑制することを見出してきたが、既報告からMPNSTを含む軟部肉腫に対する効果が期待された。本研究では、MPNST細胞株を用い、デブシペプチド類化合物の効果を評価した。MPNST細胞は増殖速度が遅くマウスモデルによる実験系の確立が困難であったため、線維肉腫細胞を用いて実験を行い、抗腫瘍効果とその効果にHDAC/PI3K 2重阻害という作用機序が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) is a histologic subtype of soft tissue sarcoma. Patients with advanced soft tissue sarcoma including MPNST have poor prognosis and no effective therapeutic drugs, so that development of novel therapeutic drugs is awaited. We have found that depsipeptide analogs inhibit cancer cell proliferation with a mechanism of dual inhibition of HDAC and PI3K, both of which are regarded as molecular targets for soft tissue sarcoma therapy. In this study, the effects of depsipeptide analogs were evaluated using MPNST cell lines and a fibrosarcoma cell line. Because the proliferation rate of MPNST cells was slow and it was difficult to establish an experimental system by a mouse model, experiments were carried out using a fibrosarcoma cell line. We showed antitumor effect and the mechanism of action of HDAC/PI3K dual inhibition of the depsipeptide analog in fibrosarcoma tumor tissue.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：悪性末梢神経鞘腫 軟部肉腫 HDAC PI3K

1. 研究開始当初の背景

(1) 軟部肉腫の発生頻度は、人口 10 万人あたり約 2 人とされ、上皮由来の癌腫と比較し希少である。軟部肉腫は、組織学的、分子生物学的に多様な性質をもった腫瘍の疾患群であるが、その希少性と多様性から、体系的な治療法が確立されていない。Ewing 肉腫や横紋筋肉腫など化学療法高感受性の腫瘍を除いた進行軟部肉腫に対する薬物療法では、ADM (ドキシソルピシン) と IFM (イフォマイド) が key drug とされている。つまり、多様な疾患の集団に対して一様な治療を施している状態にあり、報告されている治療効果も乏しい。当然ながら、個々の疾患において、腫瘍発生の分子メカニズムは異なっていると考えられ、それに応じた治療薬、治療法の開発が望まれる。

(2) 悪性末梢神経鞘腫 (malignant peripheral nerve sheath tumor : MPNST) も軟部肉腫の一疾患であり、5 年生存率が 20 - 50% と予後不良な疾患である。MPNST の約半数は NF1 遺伝子の欠損により生じる神経線維腫症 1 型に発生することが報告されている。さらに散発性 MPNST においても NF1 の欠損がみられる。NF1 は RAS 遺伝子の negative regulator として働いているため、MPNST の腫瘍細胞においては NF1 の欠損により、RAS シグナル伝達経路の活性化が生じ、そして、その下流の PI3K-AKT-mTOR 経路の活性化が生じ、PI3K 阻害剤や mTOR 阻害剤の殺細胞効果が認められていることから、PI3K-AKT-mTOR 経路が有効な治療標的と考えられている。また、エピジェネティクスな異常を是正するヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylase : HDAC) 阻害剤の MPNST に対する in vivo での抗腫瘍効果が報告されている。

(3) 申請者は、HDAC 阻害剤であるデブシペプチドおよびその類縁体が PI3K の直接阻害活性を有することを新たに見いだした。つまり HDAC/PI3K 2 重阻害剤のリード化合物を同定した (図 1)。さらに構造活性相関解析から PI3K 阻害活性の強い類縁体 FK-A11 の同定に成功した (図 2)。MPNST を含む軟部肉腫に対する効果が期待される。

図 1 HDAC/PI3K 2 重阻害のコンセプト

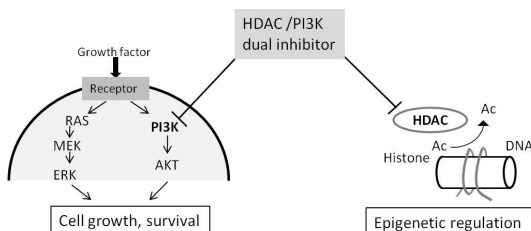
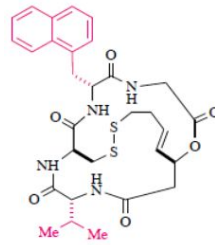


図 2 FK-A11 構造式



FK-A11
C₃₀H₃₆N₄O₆S₂

引用文献

A.Cesne et al. J Clin Oncol 18:2676-84, 2000
 Perry A et al. Am J Pathol 159 : 57 -61, 2001
 Changye Y et al. Mol Cancer Ther 8:1157-68,2009
 Lopez G et al. Cancer Res 71:185-96, 2011
 Saijo K et al. Cancer Sci 103:1994-2001, 2012

2. 研究の目的

本研究では、HDAC/PI3K 2 重阻害作用を有するデブシペプチド類縁体 FK-11 の MPNST、線維肉腫に対する in vitro, in vivo での殺細胞効果と抗腫瘍効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) in vitro 殺細胞効果の評価
 ヒト MPNST 細胞株 (SNF02.2、SNF96.2、S462、SFT9817、FMS-1)、線維肉腫細胞 HT1080 に対する細胞増殖抑制効果を MTT アッセイにて検証する。

(2) in vitro での作用機序の解析
 上記細胞を FK-A11 を含む培養液で培養後、Western blotting によりその作用機序を解析する。PI3K 阻害の指標としてリン酸化 AKT、リン酸化 mTOR の抑制を、HDAC 阻害の指標としてヒストンのアセチル化を解析する。

(3) in vivo 抗腫瘍効果の評価
 ノドマウスの皮下に MPNST 細胞株、線維肉腫細胞株を接種し、腫瘍形成を確認後、試験物 FK-A11 を腹腔内投与する。デブシペプチドの前臨床試験では、マウス体重あたり 1.8mg あるいは 3.2mg の試験物を 4 日ごとに投与して、腫瘍の相対容量を測定しており、それに準じた投与法で FK-A11 を投与する。評価項目は腫瘍体積、マウスの体重とする。

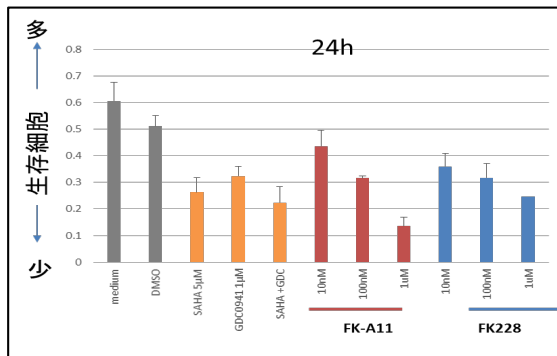
(4) in vivo 作用機序解析 (免疫組織染色)
 試験物を投与後、マウスを sacrifice し、腫瘍を摘出する。切り出し、固定を行い、免疫組織染色解析に用いる。免疫組織染色にはリン酸化 AKT (S473),(T307) とアセチル化ヒストン抗体を使用し、HDAC/PI3K 2 重阻害活性が寄与していることを確認する。

4. 研究成果

(1) in vitro 殺細胞効果の評価

ヒト MPNST 細胞株 (SNF02.2、SNF96.2、S462、SFT9817、FMS-1)、線維肉腫細胞 HT1080 を用いて FK-A11 の殺細胞効果を評価した。SNF02.2 は細胞増殖速度が遅く、評価が困難であった。SNF96.2、S462、SFT9817、FMS-1、HT1080 において FK-A11 は濃度依存的に細胞増殖抑制効果を示した。FK-A11 の 1 μ M での細胞増殖抑制効果は SAHA (HDAC 阻害剤) と GDC0941 (PI3K 阻害剤) の併用よりも優れていた。(図 3)

図 3 S462 細胞での細胞増殖抑制効果



(2) in vitro での作用機序の解析

Western blot 解析によりその作用機序解析を行った。FK-A11 は PI3K 下流の AKT のリン酸化を抑制し、アセチル化ヒストンを増加させた。この結果は、細胞増殖抑制効果がみられる条件下で HDAC/PI3K 2 重阻害が働いていることを示された。

(3) in vivo 抗腫瘍効果の評価

MPNST 細胞株においては、ヌードマウス皮下への腫瘍形成が認められず、実験系の確立が困難であった。腫瘍形成が認められた線維肉腫細胞 HT1080 に対する抗腫瘍効果の検討では、FK-A11 4mg/kg 3日毎3回の投与群で、溶媒のみ投与したコントロール群と比較して有意に腫瘍の増大が抑制された(図 4)。FK-A11 投与中、わずかな体重減少がみられたが、投与終了後速やかに回復した。

(4) in vivo 作用機序解析

FK-A11 投与後の腫瘍を摘出し、免疫組織染色にてリン酸化 S6 の変化 (PI3K 阻害の指標)、アセチル化ヒストンの変化 (HDAC 阻害の指標) を評価した。FK-A11 の投与により、腫瘍組織内で S6 のリン酸化が抑制され、ヒストンのアセチル化が増強していた。つまり HDAC/PI3K 2 重阻害が働いていることが示された(図 5)。

図 4 線維肉腫腫瘍形成マウスモデルにおける腫瘍量 (mm³) の変化

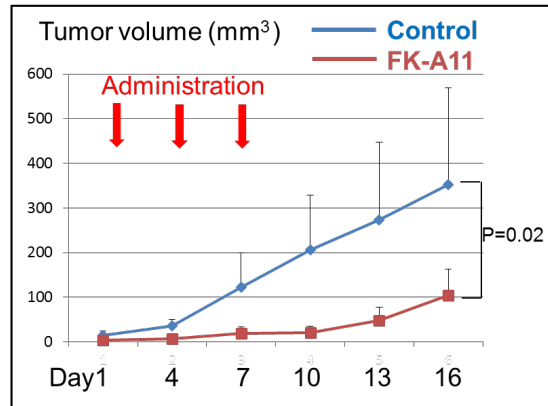
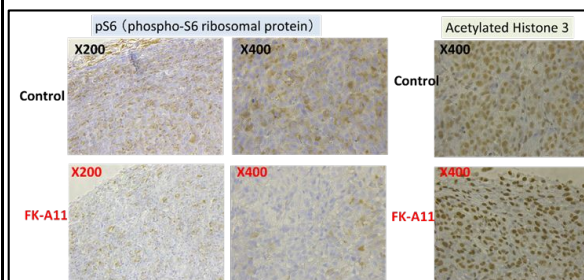


図 5 免疫組織化学による腫瘍組織内での作用機序解析



以上、MPNST 細胞を用いた実験系の確立が困難であったことから、線維肉腫に対する抗腫瘍効果の検証を行い、デプシペプチド類縁体 FK-A11 の抗腫瘍効果が示された。また、体重の変化にみる毒性も許容できるものであった。また、その作用機序として、HDAC/PI3K 2 重阻害が働いていることが腫瘍組織中で示された。

FK-A11 は軟部肉腫に対する新たな作用機序を有する分子標的治療薬剤として有効である可能性が示唆された。バイオマーカー開発研究とともに、治験導入を見据えた非臨床開発研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Saijo K, Imai H, Chikamatsu S, narita K, Katoh T, Ishioka C. Antitumor activity and pharmacologic characterization of the depsipeptide analog as anovel HDAC/PI3K dual inhibitor. Cancer Science 2017 DOI: 10.1111/cas.13255 in press. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

Ken SAIJO, Koichi NARITA, Tadashi KATO, and Chikashi ISHIOKA.

Evaluation of anti-tumor effects of
depsiptide analogs as HDAC/PI3K dual
inhibitors in human soft tissue sarcoma
cells 第75回日本癌学会学術総会 2016年
10月7日 横浜 パシフィコ横浜

西條憲、成田紘一、加藤正、石岡千加史
ヒト軟部肉腫細胞に対する HDAC/PI3K 二
重阻害剤としてのデプシペプチド類化合物
の抗腫瘍効果の検討 第20回日本がん分子
標的治療学会学術集会 2016年5月31日
別府 別府コンベンションセンター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西條 憲 (SAIJO, Ken)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：70636729