

平成 29 年 9 月 5 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19161

研究課題名(和文)がん代謝とエピゲノムコード是正による血管新生阻害薬の耐性克服

研究課題名(英文) Epigenetic regulation shifted cellular metabolism of cancer cells, which contributed to potentiate drug sensitivity of antiangiogenic agents.

研究代表者

佐藤 洋美 (Sato, Hiromi)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：30506887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の薬剤耐性にはその特異的代謝の関与が示唆されている。本研究では、HDAC阻害剤であるトリコスタチンA(TSA)がエピジェネティック調節によって腎細胞癌(RCC)の偏った代謝を改善できるか、またその代謝シフトがRCCの第一選択薬であるスニチニブ(SU)の薬剤耐性に寄与するかどうか検討した。その結果、TSAはRCCの酸化的リン酸化を増加させ、アミノ酸や核酸の産生を抑制した。電子伝達系の複合体I阻害剤であるメトホルミンは、SUとTSAの増殖に対する併用効果を有意に減弱した。以上より、エピジェネティック調節薬はがん細胞の代謝調節により細胞死を誘導する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Recently, drug resistance of cancer cells is drawn attention to its specific anaerobic metabolism. In this study, we investigated whether trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, can remedy biased metabolism of renal cell carcinoma (RCC) by epigenetic regulation. Moreover, we elucidated that if such a metabolic shift contributes to sensitize drug resistance against sunitinib (SU), a first-line drug for RCC. Hydrophilic metabolites were extracted from TSA treated human RCC cells (786-0) and analyzed by capillary electrophoresis mass spectrometry (CE-MS), while mRNA expressions were analyzed by DNA microarray. As a result, it was suggested that TSA increased oxidative phosphorylation of 786-0 while production of amino acids and nucleic acids were suppressed. A complex one inhibitor, metformin reversed the cytotoxic effect of SU and TSA combination. Taken together, epigenetic agents have a possibility to treat cancer cells via modification of cancer cell metabolism.

研究分野：応用薬理学

キーワード：細胞内代謝 エピジェネティック調節 薬物耐性 腎細胞がん ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 チロシンキナーゼ阻害薬 酸化的リン酸化

1. 研究開始当初の背景

がんの主要な悪性化形質の一つが旺盛な血管新生能力である。血管新生の中心となる VEGF シグナルは血管内皮細胞のみならず、がん細胞自身でも発達しており、細胞内の生存・増殖シグナルを増強させている。またがん細胞は常に低酸素・低栄養にさらされた過酷な生存環境にあるため、その環境で生き抜くための特別な生存シグナルが発達しており、その主要なものが hypoxia inducible factor (HIF) である。さらに HIF が機能し続けるために、あるいは HIF の作用によって、がん細胞が飢餓状態でもエネルギーを産生できるように、糖代謝やグルタミン代謝が特異的に発達していると考えられている。このように生存シグナルの亢進したがん細胞ではアポトーシス抵抗性が高く、臨床試験では抜群の治療効果が期待された sunitinib(SU) も、実臨床での腎細胞がんに対する奏効率は 3 割程度である。SU の耐性を克服するには、HIF 応答シグナルとも密接に関与する代謝異常の是正ががん治療の新しい戦略として期待される。近年、代謝経路の酵素活性のエピゲノム変異が HIF の制御に関わる可能性が問われている。すなわち、エピゲノムの異常を是正することができれば、代謝、飢餓応答といった生存シグナルを一気に動かす可能性がある。活動性が低いがん幹細胞であってもエピゲノム変化によるリモデリングは免れないため、広域かつ根本的にがん細胞の生存能力を絶つ手段となる。このように、エピジェネティック調節薬を「ある形質をまとめてたたくカクテル治療薬」と捉え、この概念を、生存に重要な代謝、および飢餓応答性と組み合わせる効果的に治療標的とするという着想に至った。

2. 研究の目的

(1) Sunitinib(SU) 耐性に寄与するがん代謝異常の同定：従来、オンコメタボリズムの研

究と飢餓応答シグナルの研究は独立して検討されて来たが、代謝経路の酵素活性のエピゲノム変異が飢餓応答で主要な役割を担う HIF の制御に関わる可能性がある。本研究では CE-TOFMS を用いるメタボローム解析によってオンコメタボリズムの異常を同定することを第一の目的とした。

(2) エピジェネティック治療薬との併用による Sunitinib(SU) 感受性の増強効果：がん細胞の特徴的なヒストンコードを調整しうるエピジェネティック調節薬として、本研究では以前の検討で SU の増殖抑制作用を増強することが示唆された HDAC 阻害薬に着目し、sodium butyrate(NaBu)および trichostatin A(TSA)を選出し、SU の作用(増殖抑制、アポトーシス誘導)に与える影響を確認することを第二の目的とした。メタボローム解析ならびに上記(1)で見出されたオンコメタボリズム経路に対する寄与に関する検討では TSA を用いた。

3. 研究の方法

(1) sunitinib (SU) 耐性株の樹立

SU 耐性株は腎細胞がん細胞株 786-0 を SU(10 μ M) に長期曝露(20 継代以上)することで樹立した。耐性化の確認は MTT 法による SU の増殖抑制試験にて確認した。

(2) 細胞内メタボロームの解析

細胞内代謝物の一斉分析はキャピラリー電気泳動接続時間飛行型質量分析装置(CE-TOFMS)により行った。786-0 親株と SU 耐性株の比較、また TSA が親株および SU 耐性株に与える影響を検討した。

(3) エピジェネティック調節薬と sunitinib(SU) の併用効果に関する検討

HDAC 阻害薬である NaBu および TSA と SU を併用した時の増殖抑制作用を確認し、より強力な併用効果が認められた TSA を用いてアポトーシスの機序や代謝経路への影響を確認した。一方、TSA は網羅的に遺伝子発現を調節

する可能性があるため、着目すべき作用点を浮き彫りにする目的で TSA 処理後の親株をトランスクリプトーム解析に供し、遺伝子レベルの変化とメタボロームの変化の共通項目を模索した。

4. 研究成果

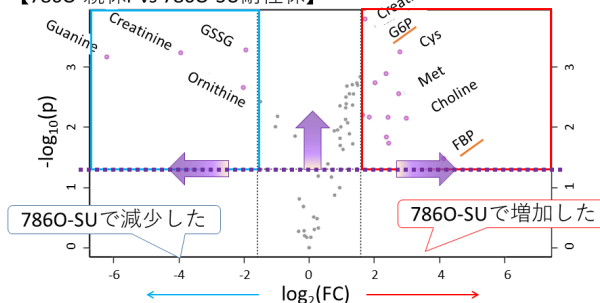
(1)腎細胞がんの SU 抵抗性と耐性株の樹立、細胞内代謝の比較：

786-0 親株および耐性株の SU に対する感受性を比較した。50%増殖抑制濃度である IC₅₀(信頼区間)は、親株 7.4 (7.0~7.7)、SU 耐性株 13.1 (12.5~13.7) μM と約 2 倍の差異であることが確認された。薬剤耐性株として決して大きな差ではないものの、過去の SU 耐性株の報告に類似する傾向ではあるので耐性株の樹立とみなした。両株を播種 24 時間後に回収し、極性代謝物を採取した。このとき 17 個の代謝物について 2 倍以上の変化量が有意差をもって認められた。耐性株では解糖系因子 G6P, FBP、エネルギー供給に関わるクレアチン、メチル化反応でメチル基供与体となるメチオニン、グルタチオン材料となるシステインなどが上昇した一方で、尿素経路因子オルニチン、クレアチン代謝物のクレアチニン、酸化型グルタチオンの減少などがみられた(図 1)。パスウェイ解析の結果、耐性株の傾向として解糖系、糖新生、TCA 回路、脂質代謝などが変化度の高い経路として上位に浮上した。

図1 スニチニブ耐性化により統計的に変化が大きい代謝物

Important features selected by volcano plot with fold change threshold (x) 3 and t-tests threshold (y) 0.05

【7860-親株 vs 7860-SU耐性株】

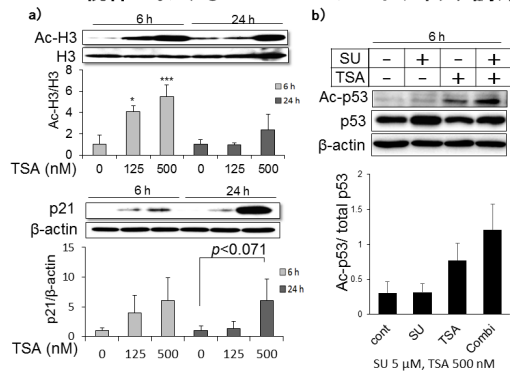


(2)エピジェネティック調節薬, TSA と SU の併用効果に関する検討：

殺細胞作用に対する併用効果

HDAC 阻害薬の NaBu は、SU の増殖抑制作用を強め、この作用には腎細胞がんで亢進が報告される HIF-2 発現を相乗的に抑制することが関与すると示唆された (Sato H *et al*, *Oncol Lett.* 2017)。しかしながら NaBu は濃度域が mM オーダーであり、HDAC 阻害活性以外の機序も考えられることから、以後の検討ではより低い濃度で HDAC 阻害活性の報告されるトリコスタチン A(TSA)を選択した。TSA は 3 種の腎細胞がん株の細胞増殖に対し SU との併用効果を示し、増殖抑制効果のみられた濃度域でアセチル化ヒストン H3 (Ac-H3) の増加、TSA のターゲット遺伝子として知られる p21 や非ヒストンタンパク質で代謝調節に関わる p53 のアセチル化促進などが認められた(図 2)。従って確かにエピジェネティックな機序で増殖抑制作用が誘導されていることが示唆された。

図2 786-0親株におけるTSAのエピジェネティック調節作用



網羅的遺伝子発現への影響(HDAC 阻害薬, トリコスタチン A; TSA による作用)

786-0 細胞を用いて TSA (48h 曝露) により 5 倍以上有意に発現変動がみられた遺伝子 (483 個) の中で KEGG 情報があり (68 個) 細胞内代謝に関わるもの (11 個) に着目した。特にミトコンドリアクレアチンキナーゼ (CKMT1A) では 20 倍の増加がみられた。そのほか脂質代謝、翻訳後修飾、細胞内酸

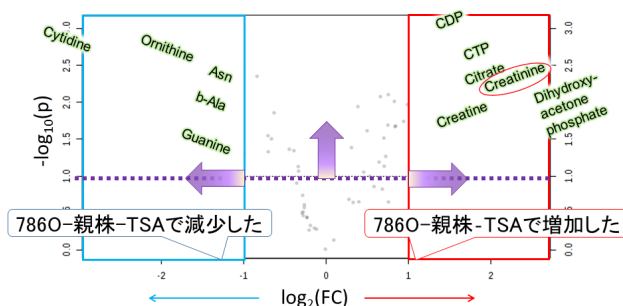
化還元酵素などの発現変動がみられた。

細胞内代謝のシフト

786-0 親株への TSA の作用は、解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸経路 (PPP) などのエネルギー代謝経路産物が上昇する傾向を示した一方で、ヌクレシドやアミノ酸は減少傾向を示した。このことは ATP 等量にしてエネルギー産生が増加しているものの、核酸やアミノ酸合成が抑制されている、すなわち TSA によって細胞増殖は抑制傾向にある現象と一致すると考えられた。次に 786-0 親株と SU 耐性株の間で差異のみられた代謝物への影響を確認した。このうち 786-0 親株において TSA が 2 倍以上有意に変動させたのは唯一クレアチニンであった (図 3)。

図3 TSAにより統計的に変化が大きい代謝物

Important features selected by volcano plot with fold change threshold (x) 2 and t-tests threshold (y) 0.05



遺伝子発現および代謝変化情報の統合

遺伝子および代謝物の網羅的解析で共通に動いたものは脂質代謝や酸化還元反応に関わる酵素を規定するものが多く、TSA はミトコンドリアの酸化的リン酸化を亢進する可能性が示唆された。(図 4)。

図4 TSA処理後のトランスクリプトーム解析とメタボローム解析で共通に変動した経路

1) Membrane proteins and their substrates;

Transcriptome	Metabolome	
	Metabolites	Metabolic Pathway
CKMT1A, LIPG, SLC22A2, ENPP3	Creatine, Creatinine,	Glycerollipid Metabolism, Phospholipid Biosynthesis, Glycerol Phosphate Shuttle

2) Oxidation-reduction enzymes and their substrates;

Transcriptome	Metabolome	
	Metabolites	Metabolic Pathway
AOX1, CYP19A1, AKR1B10, NOS1	Citrate, Asn, Ornithine (substrates of urea cycle)	Arginine and Proline Metabolism, Mitochondrial Electron Transport Chain, Urea Cycle

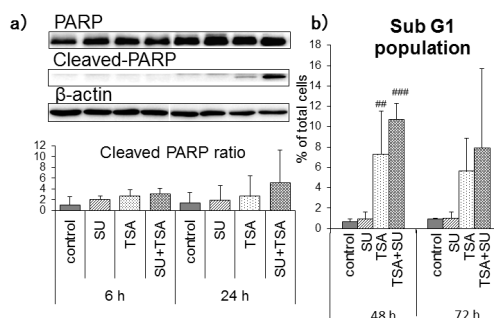
3) Synthesis of ATP, nucleosides, and nucleic acids;

Transcriptome	Metabolome	
	Metabolites	Metabolic Pathway
CKMT1A, AK9, ENPP3	CDP, CTP, Citrate, Guanine, Cytidine	Pyrimidine Metabolism, Purine Metabolism

(3) アポトーシス感受性の増強

SU と TSA の増殖抑制作用が細胞死の向きに進行しているのか確認するためアポトーシスの評価を行った。その結果、実行因子であるカスパーゼ 3 下流で活性化する PARP 断片化 (活性化体) の上昇および DNA 断片化 (sub-G1) の増加は、SU と TSA の併用群で最も高かった (図 5a, b)。

図5 SUとTSAのアポトーシスに対する併用効果



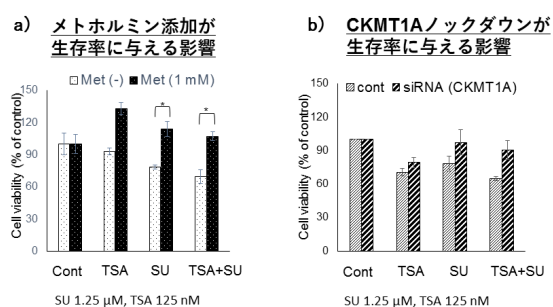
Results shown were from 3 independent experiments. ##P<0.01, ###P<0.001, v.s. control, Tukey-Kramer's test.

p53 のアセチル化 (活性促進) が確認されているため (図 2)、このアポトーシス経路のドライブ因子として p53 下流のミトコンドリアタンパク質の関与が示唆される。実際に SU の感受性が高まる状況においては Bax の発現および活性の上昇を認めている (Uzu M *et al*, *J Pharmacol Sci*. 2016, 2017)。

さらに (2) で見出された代謝や遺伝子発現情報を統合して浮上した経路の寄与を確認した。酸化的リン酸化を担う因子としてミトコンドリア電子伝達系を構成する複合体の阻害剤、メトホルミンを同時添加したところ増殖に対する併用効果が有意に減弱した (図 6a)。一方、TSA により強力に遺伝子発現が増強されたミトコンドリアクレアチンキナーゼ (CKMT1A) は、迅速な ATP 供給に関わるため、代謝への寄与が大きいと考えられた。しかしながら CKMT1A のノックダウン (>70%, siRNA) は、増殖抑制作用の減弱傾向に留ま

った(図 6b)。このことは代謝調節が単一の酵素修飾等で起こっているわけではなく、複数経路、あるいは異なる次元(遺伝子調節やタンパク質発現および活性調節など)で調整されていることを暗示するものと考えられた。

図6 SUとTSAの併用効果に対する代謝調節の寄与



以上の結果から細胞内代謝の変化はがん細胞の生存や薬物抵抗性に関与しており、代謝の是正が薬物感受性の回復に一定程度寄与することが示された。さらにエピジェネティック調節薬がそのような代謝変化をもたらす形質治療薬として活用できる可能性を示した。TSAで確認された酸化的リン酸化を促進する傾向は、がん細胞が酸化ストレスに対抗するために仕向けたミトコンドリアの抑制状態を解除し、分化された正常細胞の形質に近付けるのかもしれない。今後はエピジェネティック調節が変化を与えた経路の詳細を追究し代謝調節機構を明瞭化すること、そしてがん種を超えてエピジェネティック調節薬の応用性を確認していくことが、薬物耐性化を起こしたがんへの克服につながると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者に下線)

[雑誌論文](計 4 件)

- (1) Uzu M, Sato H, Ayaka S, Shibata Y, Ueno K, Hisaka A. Connexin 43 enhances Bax activation via JNK

activation in sunitinib-induced apoptosis in mesothelioma cells. *Journal of Pharmacol. Sci.* 2017, in press.

- (2) Sato H, Uzu M, Kashiba T, Suzuki R, Fujiwara T, Okuzawa H, Ueno K. Sodium butyrate enhances the growth inhibitory effect of sunitinib in human renal cell carcinoma cells. *Oncology Letters*, 2017, in press.

- (3) 佐藤洋美, 倉内祐樹, 大澤匡弘, 村上友康, 糸和彦, 籠田智美, 岩田紗季, 丸山加菜, 和久田浩一, 篠塚和正, 葛巻直子, 成田道子, 池上大悟, 成田年, 黒田正幸, 武城英明, 麻生雅是, 齋藤康, 横手幸太郎, 友田明美: S34 次世代薬理研究者のビジョン: ベンチワークからベッドまで. *薬学雑誌*, 136, 685-714, 2016

- (4) Uzu M, Sato H, Yamada R, Kashiba T, Shibata Y, Yamaura K, Ueno K. Effect of enhanced expression of connexin 43 on sunitinib-induced cytotoxicity in mesothelioma cells. *Journal of Pharmacol. Sci.* 128, 17-26, 2015.

[学会発表](計 7 件)

- (1) 佐藤洋美, 藤原拓也, 畠山浩人, 加柴達朗, 宇津美秋, 上野光一, 樋坂章博. 第90回日本薬理学会年会、ナノシンポジウム、トリコスタチンAはエピジェネティック調節により腎細胞がんの代謝を変化させる. 2017年3月15-17日. 長崎ブリックホール(長崎)
- (2) 佐藤洋美, 加柴達朗, 藤原拓也, 宇津美秋, 樋坂章博. 第10回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、トリコスタチンAによる腎細胞がんの

ニチニブ感受性増強と代謝調節の関
与. 2016年11月6日. 群馬大学病院
(前橋、群馬)

- (3) **佐藤洋美**, 藤原拓也, 宇津美秋. 第75
回日本癌学会学術総会. トリコスタ
チンAによる腎細胞がんの代謝調節
がスニチニブ抵抗性を改善する可能
性. 2016年10月7日. パシフィコ横
浜(神奈川、横浜)
- (4) 加柴達朗、**佐藤洋美**、宇津美秋、柴田
侑裕、藤原拓也、樋坂章博. 第89回
日本薬理学会年会、Cotreatment of
trichostatin A enhances cytotoxic
effects of sunitinib in human renal
cell carcinoma cells. 2016年3月9
日. パシフィコ横浜(神奈川、横浜)
- (5) Uzu M, Kashiba T, **Sato H**. 第75回日
本癌学会学術総会、Combined
treatment of trichostatin A
sensitizes renal cell carcinoma
cells to sunitinib. 2015年10月8
日. 名古屋国際会議場(愛知、名古屋)
- (6) **Sato H**, Kashiba T, Uzu M, Fujiwara T,
Shibata Y, Suzuki R, Yamaura K,
Hisaka A. Combined treatment of
trichostatin A enhances cytotoxic
effects of sunitinib on renal cell
carcinoma cells. 106th AACR Annual
Meeting, 2015 April 22th.
Philadelphia, PA (USA).
- (7) Uzu M, **Sato H**, Kashiba T, Fujiwara T,
Shibata Y, Yamaura K, Hisaka A.
Transfection of connexin 43
enhances sunitinib-induced
apoptosis in malignant
mesothelioma cells possibly via its
interaction with Bax. 106th AACR
Annual Meeting, 2015 April 22th.
Philadelphia, PA (USA).

〔その他〕

ホームページ等

千葉大学大学院薬学研究院 臨床薬理学研
究室ホームページ:

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/cpp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 洋美 (SATO Hiromi)

研究者番号: 30506887

(2) 研究協力者

樋坂 章博 (HISAKA Akihiro)

研究者番号: 80420206