

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19735

研究課題名(和文)血管肉腫に対するPI3K経路阻害剤とエピジェネティクス制御化合物の併用効果の検討

研究課題名(英文)The effect of PI3K pathway inhibitor and chemical epigenetics in angiosarcoma cells

研究代表者

和田 誠 (Wada, Makoto)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・学内講師

研究者番号：90733080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では皮膚血管肉腫細胞株に対するPI3K経路阻害剤とエピジェネティクス制御化合物の併用効果について解析を行った。皮膚血管肉腫細胞株に対しエピジェネティクス制御化合物のうち、ヒストン脱アセチル化阻害剤が増殖抑制効果を示し、細胞周期停止を誘導することが明らかになった。細胞周期停止に関わる分子の解析を行い、ヒストン脱アセチル化阻害剤はサイクリンD1を下方制御することでG1期細胞周期停止を誘導し、p21を上方制御することでG2/M期細胞周期停止を誘導することを見いだした。血管肉腫細胞株に対しヒストン脱アセチル化阻害剤とPI3K阻害剤の併用による増殖抑制は相加効果を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the growth inhibition of PI3K inhibitor and epigenetics compounds in angiosarcoma cells. Histone deacetylase(HDAC) inhibitors suppressed the growth of angiosarcoma cells. HDAC inhibitors induced the cell-cycle arrest at G1 phase with the downregulated expression of cyclinD1 in ISO-1 cells, and induced the cell-cycle arrest in G2/M phase with the upregulated expression of p21 in ISO-HAS cells. The combination of PI3K inhibitor and HDAC inhibitor additively suppressed the growth of angiosarcoma cells

研究分野：皮膚腫瘍学

キーワード：血管肉腫 PI3K阻害剤 HDAC阻害剤

1. 研究開始当初の背景

皮膚血管肉腫は高齢者の頭部に好発する極めて予後の悪い皮膚悪性腫瘍である。皮膚血管肉腫に対する治療法には放射線療法と化学療法の組み合わせを用いるが、高齢者に対しては副作用を生じやすく治療を中断せざるを得ないことも少なくない。

血管肉腫は血管内皮由来と考えられており、血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) を標的とした分子標的薬による治療法が試みられ、一定の病勢制御が得られたが、奏効割合は高くなかった (Lancet Oncol. 2010; 11: 983-91)。

血管肉腫に生じる遺伝子異常としてがん抑制遺伝子 TP53, がん遺伝子 KRAS, 細胞膜受容体 VEGF 受容体の遺伝子変異が報告され、細胞内シグナル伝達経路では PI3K/AKT/mTOR 経路の活性化が増殖に強く関与していることも判明した (Am J Pathol. 2000; 157: 1937-45.)。我々はこれまでに血管肉腫細胞株に対して PI3K 阻害剤や mTOR 阻害剤が増殖を抑制することを見出し、PI3K/AKT/mTOR 経路のうち PDK1 が重要な役割を果たしている一方で、AKT は増殖に関与しないことを報告した (J Dermatol Sci. 2015; 78: 44-50.) 増殖抑制に関与するメカニズムとして細胞周期調節に重要な働きをする cyclinD の発現量を下方制御し、G1 細胞周期停止を誘導することが分かった。血管肉腫の発生に関連するがん遺伝子、がん抑制遺伝子の異常が報告され、がん遺伝子異常に起因する分子に対する分子標的薬の開発が進む一方で、血管肉腫の発生に関してエピゲノムが関与する報告は乏しい。そこで、血管肉腫細胞株に対するエピジェネティクス制御化合物の増殖抑制効果を検討し、PI3K/PDK1/mTOR 経路を治療標的とした分子標的薬とエピジェネティクス制御化合物を併用し、PI3K/PDK1/mTOR 経路阻害剤の効果を増強させるエピジェネティクス制御化合物の同定を目的とする研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究ではエピジェネティクス制御化合物による抗腫瘍効果を検討し、PI3K/PDK1/mTOR 経路を標的とする分子標的薬とエピジェネティクス制御化合物を併用することで腫瘍細胞の増殖抑制効果を検討し、そのメカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

平成 28 年度は血管肉腫細胞株 (ISOS-1, ISO-HAS) に対してエピジェネティクス制御化合物の増殖抑制効果を検討し、作用メカニズムをフローサイトメトリー解析、ウエスタンブロッティング法を用いて明らかにする。平成 29 年度はエピジェネティクス制御化合物と PI3K/PDK1/mTOR 経路阻害剤を併用し、増殖抑制効果を検討する。またその作用メカニズムをフローサイトメトリー解析、ウエスタンブロッティング法を用いて明らか

にする。

4. 研究成果

エピジェネティクス制御化合物による増殖抑制効果の検討

皮膚血管肉腫細胞株 (ISOS-1, ISO-HAS) に対して 80 種類のエピジェネティクス制御化合物による増殖抑制効果を検査し、WST-8 アッセイを用いてスクリーニングを行い、増殖抑制効果を示す 3 種類の HDAC 阻害剤 (Romidepsin, Panobinostat, Dacinostat) を見いだした。

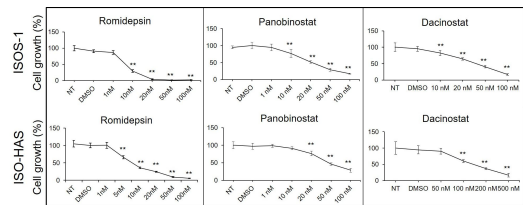


Figure 1. HDAC 阻害剤による増殖抑制効果

細胞周期解析

皮膚血管肉腫細胞株に対し増殖抑制効果を示す 3 種類の HDAC 阻害剤 (Romidepsin, Panobinostat, Dacinostat) の細胞周期解析を行った。HDAC 阻害剤は濃度依存性に ISOS-1 細胞に対し G1 期細胞周期停止を誘導し、ISO-HAS 細胞に対しては G2/M 期細胞周期停止を誘導した (Figure 2A)。また、ISO-HAS 細胞に対し 3 種類の HDAC 阻害剤 (Romidepsin, Panobinostat, Dacinostat) は濃度依存性に sub-G1 を誘導し、アポトーシスが生じている可能性が示唆された。一方 ISOS-1 細胞に対しては 3 種類の HDAC 阻害剤は sub-G1 の増加を誘導しなかった。

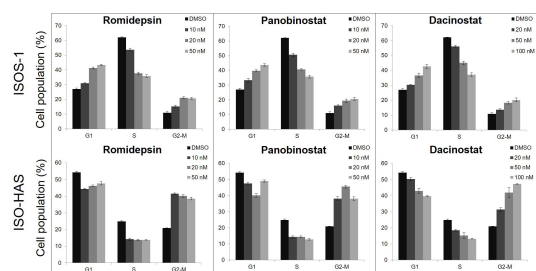


Figure 2A. 細胞周期解析

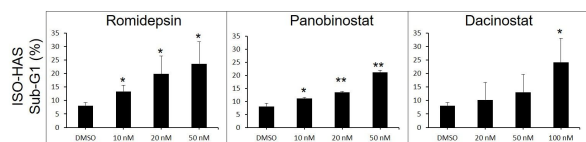


Figure 2B. アポトーシス誘導解析

細胞周期停止に関わる分子の同定

3種類のHDAC阻害剤の細胞周期停止が同じであったので、Romidepsinを選択し細胞周期停止に関わる分子の同定をウエスタンブロッティングで行った。ISOS-1細胞に対しRomidepsinはcyclinD1の発現量を低下させ、ISO-HAS細胞に対してはp21の発現量を増加させた(Figure 3A, 3B)。さらに、RT-PCR法を用いて検討したところ、RomidepsinはISOS-1細胞のcyclinDのmRNAを低下させ、ISO-HAS細胞に対してp21のmRNAを上昇させた(Figure 3C, 3D)。

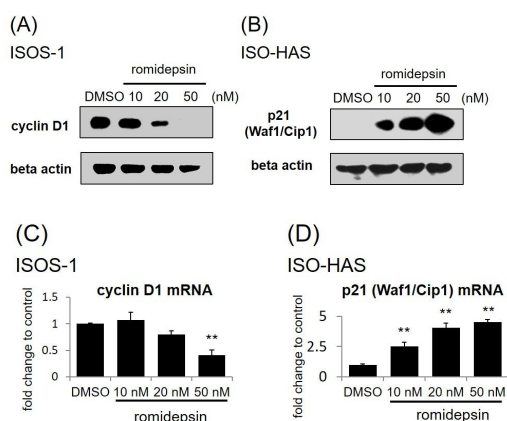


Figure 3. (A)(B) ウエスタンブロッティング、(C)(D)RT-PCR

PI3K阻害剤とHDAC阻害剤の併用効果の検討

ISOS-1に対し、PI3K阻害剤であるLY294002とHDAC阻害剤であるRomidepsinを併用し増殖抑制効果をWST-8アッセイで評価した。LY294002とRomidepsinは相加効果を示しISOS-1の増殖を抑制した。

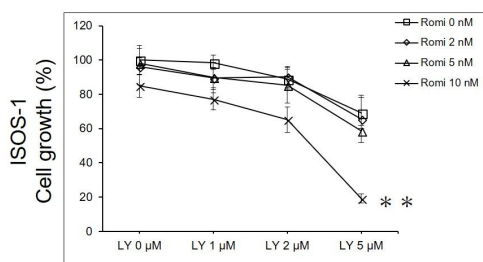


Figure 4. PI3K阻害剤とHDAC阻害剤による併用効果の検討 LY:LY294002, Romi:Romidepsin

以上の結果から、HDAC阻害剤は血管肉腫の細胞によってcyclinD1を下方制御することでG1期細胞周期停止を誘導し、p21を上方制御することでG2/M期細胞周期停止を誘導することが判明した。HDAC阻害剤とPI3K阻害剤の併用は相加効果を示しISOS-1細胞の増殖を抑制した。

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)
1. Wada M, Horinaka M, Yasuda S, Masuzawa M, Sakai T, Katoh N. PDK1 is a potential therapeutic target against angiosarcoma cells. J Dermatol Sci. 2015; 78: 44-50. 査読有

- 〔学会発表〕(計 1件)
- Kanemaru M, Wada M, Arita T, Asai J, Katoh N. Histone deacetylase inhibitors suppress the growth of angiosarcoma cells. The 42nd Annual Meeting of the Japanese society for Investigative Dermatology, Dec15-17, 2017 Kochi, Japan.
- 〔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
和田 誠 (WADA, Makoto)
京都府立医科大学・医学研究科・学内講師
研究者番号: 90733080

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()