

令和元年6月1日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20066

研究課題名(和文) 悪性末梢神経鞘腫瘍におけるHDAC6とNACC1の機能の解析

研究課題名(英文) Functions of HDAC6 and NACC1 in malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines

研究代表者

多田 広志(Tada, Hiroshi)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：50593638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：HDAC6、NACC1ともに悪性末梢神経鞘腫瘍細胞株における発現程度は一定の傾向を示さなかった。HDAC6、NACC1が悪性末梢神経鞘腫瘍で高発現し、これらが治療の標的になるという前提は成り立たなかった。HDAC6、NACC1が骨肉腫細胞株においては結合して細胞運動に関与していることをすでに明らかにしているが、悪性末梢神経鞘腫瘍細胞株においての特別な役割を明らかにすることはできなかった。M期紡錘体形成に特異的に働くモータータンパク質キネシン5の阻害剤は分裂細胞のみに細胞死を誘導する特性を持つことから化学療法薬として期待されている。キネシン5阻害剤に対する耐性獲得機構の一部を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HDAC6とNACC1は悪性末梢神経鞘腫瘍の治療のターゲットとして有用であるという結果を得ることは出来なかったが、微小管阻害薬やkinesin-5阻害薬が骨軟部腫瘍に有効である可能性を明らかにした。今後、軟部腫瘍で保険適応のある新規微小管阻害薬エリブリンでの検証や、HDAC6阻害薬との相互作用などを明らかにすることで、骨軟部腫瘍の治療に応用可能になることを期待したい。

研究成果の概要(英文)：Overexpression of HDAC6 and NACC1 was not observe in malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines. It was considered that HDAC6 and NACC1 is not good target of therapy. In our research, HDAC6 and NACC1 is interacted and accelerated migration and invasion in osteosarcoma cell lines. However, we could not reveal that special role in malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines. Kinesin-5 is an attractive target for cancer chemotherapeutics, and several chemicals that interfere with its activity, and hopefully would impede proliferation of tumor cells. We identified novel mechanisms responsible for resistance to Kinesin-5 inhibitor using human osteosarcoma cell lines.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：悪性末梢神経鞘腫瘍 NACC1 HDAC6

## 1. 研究開始当初の背景

悪性末梢神経鞘腫瘍は稀な悪性腫瘍で、神経線維腫症 型の患者で発症することが多い。また、神経線維腫症 型患者では若年で悪性末梢神経鞘腫瘍が発症する。神経線維腫症 型の患者には良性の神経線維腫が全身に多発するが、急激に大きくなってきた場合、本疾患の発症を疑う。通常軟部肉腫は広範切除によって根治可能である。しかし、悪性末梢神経鞘腫瘍では、重要な神経に発症した場合、広範切除によってその神経の機能を犠牲にしなければならないため、手術自体も不可能な場合がある。また、化学療法や放射線療法も効果に乏しく、5年生存率は50%と非常に悪い。すなわち、手術・化学療法・放射線療法のどれも満足する結果が得られない悪性腫瘍であり、効果的な治療法の開発が切望されている。神経線維腫の発症には NF1 遺伝子の変異が原因と考えられているが、悪性化の機序は分かっておらず、その解明も望まれているところである。

我々はヒストン脱アセチル化酵素(Histone deacetylases, HDACs)に着目した。DNAを折り畳んで核内に収納しているヒストンは脱アセチル化されることで折り畳みを解除し、遺伝子発現の起点となる。HDACsは細胞の機能維持に非常に重要なタンパクである。HDACsは通常核内で機能するが、subtypeの1つであるHDAC6(Histone deacetylase 6)は例外的に核外にも存在する。HDAC6は安定化状態にあるアセチル化チューブリンを脱アセチル化し、動的状態にすることで細胞周期に関わることが知られている。多発性骨髄腫では選択的HDAC6阻害剤であるricoinostatが既存薬との併用で効果があるとするフェーズ1/2試験の結果が報告されている。

これまで我々はがんの発生や転移に関与する多能性維持転写因子NACC1(Nucleus Accumbens-Associated 1)の研究を進めてきた。その結果、NACC1はHDAC6との間に相互作用があること、細胞骨格と細胞の動きに関与していることが明らかになった。NACC1はその名称(Nucleus-Accumbens-Associated 1)の通り前脳の側坐核に強く発現しているタンパク質であり、コカイン誘導性の行動感作やパーキンソン病に関与することが報告されている。また、NACC1はがん細胞において強発現し、転移や予後に関与していることも報告されている。

HDAC6、NACC1ともに神経細胞とがん細胞で重要な役割を果たしていることがそれぞれ報告されており、我々のこれまでの研究はその両者が相互作用していることを明らかにしている。そこで、神経の悪性腫瘍である悪性末梢神経鞘腫瘍では、HDAC6とNACC1が悪性化や腫瘍増殖能・転移能に関連していると考えた。その機能を解明することや、HDAC6選択的阻害剤の悪性末梢神経鞘腫瘍に対する直接的効果や従来の化学療法との相乗効果を探ることで、悪性末梢神経鞘腫瘍の治療法の開発につなげる成果を出すことが出来ると考えた。

## 2. 研究の目的

神経の悪性腫瘍である悪性末梢神経鞘腫瘍では、HDAC6とNACC1が悪性化や腫瘍増殖能・転移能に関連していると考えた。悪性末梢神経鞘腫瘍におけるHDAC6とNACC1の機能を解明することや、HDAC6選択的阻害剤の悪性末梢神経鞘腫瘍に対する直接的効果や従来の化学療法との相乗効果を探ることで、悪性末梢神経鞘腫瘍の治療法の開発につなげる成果を出すことを研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

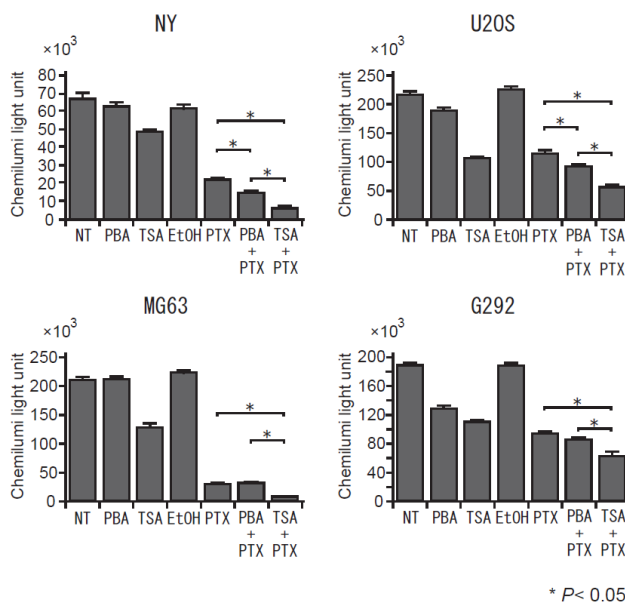
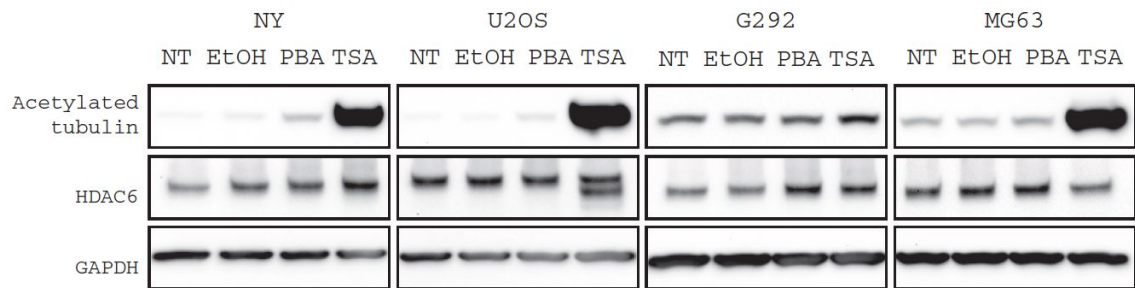
*In vitro* studyとして悪性末梢神経鞘腫瘍培養細胞のNACC1やHDAC6の発現をWestern blottingやQuantitative RT-PCRを用いて調べる。NACC1やHDAC6のknock downや細胞内導入を行い、免疫染色をする。共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、チューブリンやアセチル化チューブリン、アクチンといった細胞内骨格とその形態に与える影響を観察する。続いてCell viability assay、wound healing assayやMatrigel cell invasion assayを行い、細胞増殖能や細胞運動能に与える影響を検討する。臨床検体を用いてHDAC6やNACC1の免疫染色を行い、その発現と予後の関連を検討する。神経線維腫の検体とも比較し、悪性化との関連を検討する。*In vivo* studyとして悪性末梢神経鞘腫瘍のモデルマウスを用いてHDAC6選択的阻害剤の投与やNACC1、HDAC6の遺伝子制御によって腫瘍に対する効果を確認する。

## 4. 研究成果

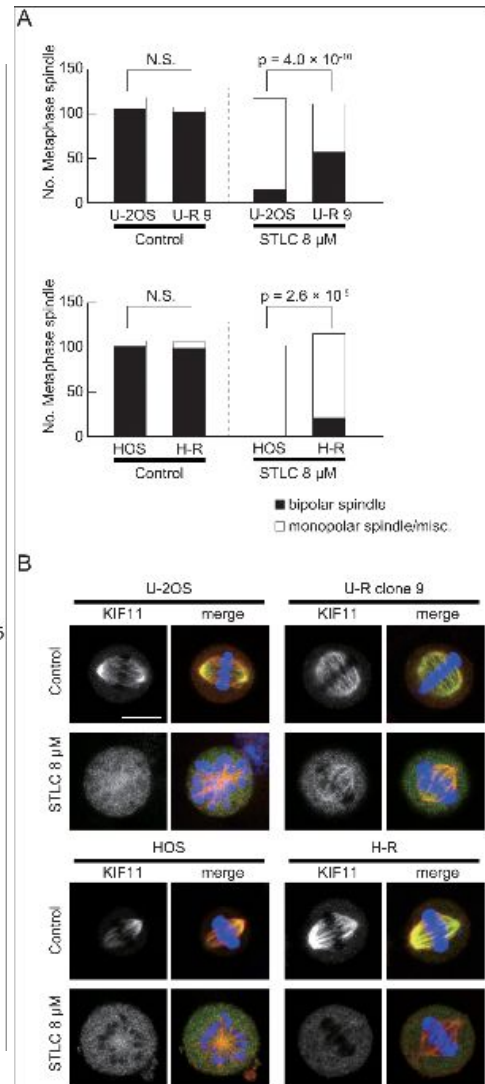
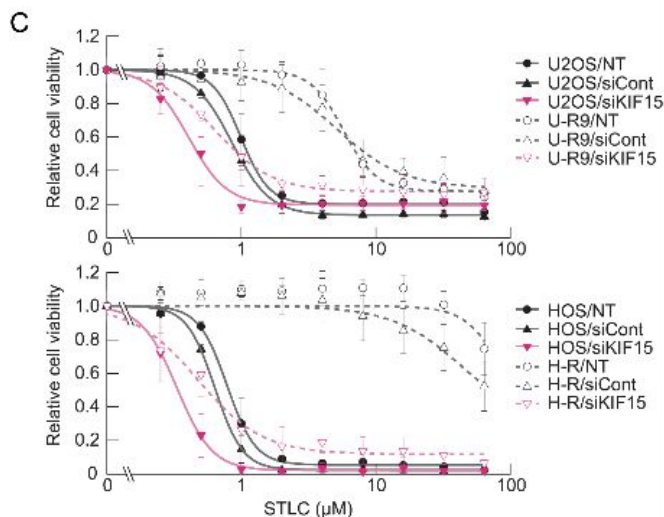
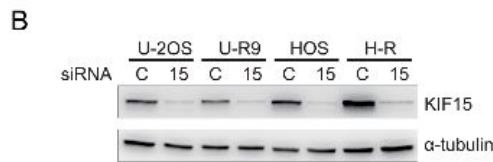
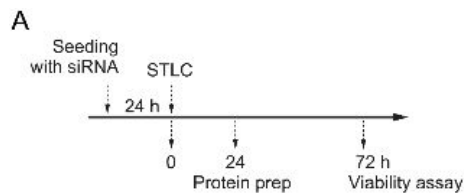
HDAC6、NACC1ともに悪性末梢神経鞘腫瘍細胞株における発現程度は一定の傾向を示さなかった。HDAC6、NACC1が悪性末梢神経鞘腫瘍で高発現し、これらが治療の標的になるという前提は成り立たなかった。また、HDAC6、NACC1が骨肉腫細胞株においては結合して細胞運動に関与していることをすでに明らかにしているが、悪性末梢神経鞘腫瘍細胞株における特別な役割を明らかにすることはできなかった。

骨肉腫細胞株でも同様に発現程度は一定の傾向を示さなかったが、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の投与で細胞の増殖能、浸潤能を抑制できること、細胞骨格や細胞運動に関わる微小管阻害剤であるパクリタキセルとの殺細胞相乗効果があることを明らかにしており、本研究の研究結果の一部を含む内容を、「ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と微小管阻害薬の骨肉腫細胞株における殺細胞相乗効果の検討」として、第32回日本整形外科学会基礎学術集会(201

7年10月26日・27日)にて口演発表した。ヒストン脱アセチル化阻害剤は多発性骨髄腫にてすでに治療に応用されている薬剤であるが、他の癌種での応用は未だされていない。また、パクリタキセルは現在のところ軟部腫瘍には保険適応がないが、同じ微小管阻害剤であるエリブリンは軟部腫瘍に対する適応があるため、悪性末梢神経鞘腫瘍細胞株でも同様の結果が得られれば、臨床でのさらなる活用につながる成果となると思われた。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤とエリブリンの組み合わせで悪性末梢神経鞘腫瘍細胞株に対する効果を探るなど、今後の研究につなげることが望まれる。



M期紡錘体形成に特異的に働くモータータンパク質キネシン5の阻害剤は分裂細胞のみに細胞死を誘導する特性を持つことから腫瘍に対する化学療法薬として期待されている。キネシン5はHDAC6と同様、細胞分裂に関わるモータータンパク質であることから、関連する研究として、キネシン5阻害剤に対する耐性獲得機構を解明する研究に対して研究協力した。骨肉腫由来培養細胞株を用いてキネシン5阻害剤の1つであるS-トリチルL-システイン(STLC)に対する耐性細胞を複数取得した。耐性細胞のキネシン5および関連分子であるキネシン12の全長シーケンスを行い、変異の有無を解析した。キネシン5およびキネシン12のノックダウン、および過剰発現を行い、STLC感受性に対する影響を解析した。免疫染色によって、M期のキネシン5(野生型、変異型)の局在を確認した。耐性細胞ではキネシン5の新規C端欠失型変異(S1017fs)と変異タンパク質の発現が確認され、キネシン12の有意な発現上昇は観察されなかったがキネシン12のノックダウンにより耐性が減弱した。細胞が獲得するキネシン5阻害剤耐性には、多くの場合キネシン12が不可欠であるというこれまでの仮説が裏付けられた。この研究結果は「Involvement of C-terminal truncation mutation of kinesin-5 in resistance to kinesin-5 inhibitor.」としてPLoS Oneに掲載された。今後の発展的研究として、HDAC6やNACC1との相互作用もまた、非常に興味深いところである。細胞免疫染色での細胞内分布の観察、共免疫沈降などをおこなうなど、相互作用に対する研究を進めることが望まれる。その上で、阻害剤の同時投与での相乗効果や、耐性獲得防止の効果などを検討することなど、今後新たな研究への応用が期待される。



ただ、ここ数年の情勢により病院での診療業務量、教育に関する業務量が大幅に増え、研究以外の業務に対するエフォートが大幅に増加した。加えて骨腫瘍ガイドライン策定委員としての活動が加わったため、本研究期間内に十分な研究時間を確保することが出来なかった。分子生物学的研究は細胞培養や抗体反応を用いた研究手法など、まとまった作業時間が必要であり、現在の診療業務と並行した研究活動では、研究時間の確保の見込みが今後もない。そのため、非常に残念であるが、研究費の残額は返還し、本研究は終了することにした。医師も時間外労働規制の対象となり、その基準も年々厳格化される見込みであることから、診療業務に対するエフォートが大幅に減らない限り、まとまった時間を要する分子生物学的研究を診療業務と並行しておこなうことは、現実的には不可能であることが今回の経験で分かった。研究開始前にはここまで時間の確保が厳しくなるとは予想しておらず、結果が期待される本研究を終了することは非常に惜まれるが、研究を途中で終えることに対する反省により、自身の今後の研究活動のありかたの修正の必要性を考えさせられることとなった。今後は、ワーキングタイム内の短い空き時間や診療業務における病院間の移動時間などを有効に利用したり、研究分担者と効率的に分担したりすることで研究活動を継続することを模索している。ビッグデータや画像、AI を用いた研究は比較的自由的な時間配分で、作業を分担してできるため、現在は医用画像を用いた研究を新たに計画している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Involvement of C-terminal truncation mutation of kinesin-5 in resistance to kinesin-5 inhibitor.

Saeki E, Yasuhira S, Shibazaki M, Tada H, Doita M, Masuda T, Maesawa C.

PLoS One. 2019 Feb 20;14(2):e0212821.

doi: 10.1371/journal.pone.0212821. eCollection 2019.

( 査読あり )

〔学会発表〕(計 1 件)

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と微小管阻害薬の骨肉腫細胞株における殺細胞相乗効果の検討

多田広志 三又義訓 佐伯絵里 西田淳 土井田稔  
第 32 回 日本整形外科学会基礎学術集会 (2017 年)  
(口演)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：前沢 千早

ローマ字氏名：Maesawa Chihaya

研究協力者氏名：土井田 稔

ローマ字氏名：Doita Minoru

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。