

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10122

研究課題名(和文) 難治小児がんの特異的遺伝子発現とHDAC阻害剤による増殖抑制・分化誘導効果の検討

研究課題名(英文) Study of specific gene expression in intractable childhood cancer and growth suppression and differentiation inducing effect of HDAC inhibitors

研究代表者

家原 知子 (Iehara, Tomoko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20285266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：【緒言】新規 HDAC 阻害剤 YM753 が、横紋筋肉腫、神経芽腫の培養細胞および動物実験モデルで抗腫瘍効果を検討した。【方法】複数の横紋筋肉腫、神経芽腫株を使用した。抗腫瘍効果、機序を検討した。異種移植マウスモデルを作成し、腫瘍サイズと転移の有無を検討した。【結果】本薬剤は細胞死を誘導した。G2/M相停止を示し、apoptosis誘導が確認された。マウスモデルで、腫瘍増殖を抑制した。神経芽腫では、分化も誘導した。【考察】培養実験、動物実験の結果から、横紋筋肉腫、神経芽腫の新規治療薬として有効であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規 HDAC 阻害剤 YM753 が、横紋筋肉腫、神経芽腫に対して、培養細胞および動物実験モデルで抗腫瘍効果を検討した。細胞株およびマウスモデルにおいては、腫瘍増殖を抑制した。神経芽腫では、分化も誘導した。これらの細胞培養実験、動物実験の結果から、横紋筋肉腫、神経芽腫の新規治療薬として有効であると考えられた。現在 phase 1 試験が米国で実施されていることから、小児がん領域での本薬剤の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Introduction: We investigated whether the novel HDAC inhibitor YM753 has an antitumor effect on rhabdomyosarcoma and neuroblastoma in cell lines and in animal models. Methods: The rhabdomyosarcoma and neuroblastoma cell lines were used. The antitumor effect and mechanism were examined. A xenograft mouse model was prepared to examine the antitumor effects. Results: This drug induced cell death in rhabdomyosarcoma and neuroblastoma cell lines. Induction of apoptosis was confirmed, showing G2/M phase arrest. The tumor cells showed G2/M phase arrest, confirming apoptosis induction. In addition, p21 expression induction, histone acetylation, and Cleaved caspase-3 induction were confirmed. In a mouse model, it suppressed tumor growth. In neuroblastoma it also induced differentiation. Discussion: From these results of culture experiments and animal experiments, it was effective as a novel therapeutic agent for rhabdomyosarcoma and neuroblastoma.

研究分野：小児がん

キーワード：小児がん HDAC阻害剤 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は難治性小児がんの代表である、特異的キメラ遺伝子 PAX3-FOXO1 の発現を認める胞巣型横紋筋肉腫 (RMS) や MYCN 遺伝子増幅を呈する神経芽腫 (NB) が極めて予後不良であり転移再発し易いことを報告してきた。これら難治性小児がんに対し、抗腫瘍効果と分化誘導を行うことで再発を抑制する薬剤の開発が強く求められる。一方で、YM753 は p21 活性を介した RB 再活性化を基準として開発された新規 HDAC 阻害剤である。その効果は食道がんや腎がん で確認されつつある。我々の先行実験においても、YM753 は RMS、NB の細胞株において強力な細胞増殖抑制効果を示した。また、細胞周期解析を行うと、G1 細胞周期停止ではなく G2M 細胞周期停止を示していた。この現象は、免疫組織染色において mitotic catastrophe が観察されたことから、YM753 投与により、腫瘍細胞は G2M 細胞周期停止から染色体不安定を生じ、分裂期細胞死を引き起こしたと予想している。以上から、1) 細胞増殖抑制のメカニズムのさらなる解明を行うとともに、動物実験モデルにおける抗腫瘍効果を検討し臨床応用に繋げたいと考えた。

2. 研究の目的

難治性小児がんでは、特異的遺伝子発現が腫瘍の悪性度に深く関わっている。特に横紋筋肉腫における PAX3-FOXO1 キメラ遺伝子や、神経芽腫における MYCN 遺伝子増幅は細胞増殖や分化抑制に強く関わっていることを我々は示してきた。一方で、RB 再活性化を基準として開発された新規 HDAC 阻害剤 YM753 が、細胞増殖抑制を示す結果を我々はすでに得ている。以上のことから、1) 本薬剤の細胞増殖抑制のメカニズムを解明し、培養細胞および動物実験モデルで抗腫瘍効果を検討する。さらに、2) 本薬剤の分化誘導効果についての PAX3-FOXO1 キメラ遺伝子や MYCN 遺伝子発現を介したメカニズムの解明を行い、難治性小児がんへの臨床応用に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

YM753 の培養細胞における増殖抑制のメカニズムの解明

(ア) 培養細胞における増殖抑制、細胞周期抑制の検討

増殖抑制：本研究室で樹立し、所有している多数の RMS 細胞株、NB 細胞株を RPM1 に FCS 添加下で培養し、YM753 を投与し、増殖能を MTS assay 法にて IC50 を測定。細胞周期解析：この増殖曲線を参考にして Cell cycle analysis を解析。RMS 細胞株では PAX3-FOXO1 の有無、NB 細胞株では MYCN 増幅、非増幅の複数の細胞株で同実験を行い確認。特に Cell cycle に関しては、全ての YM753 を投与下の細胞株で G2/M arrest を来しているのかの検証を行う。P21, Cyclin, CDK1 の発現を RT-PCR で確認するとともに、Rb リン酸化は Western blotting 法にて確認。アポトーシス誘導：さらに、アポトーシス誘導能を Annexin V assay にておこなった。さらに、アポトーシス関連遺伝子 Caspase 2,3,9 等の発現を RT-PCR 法を用いて評価した。

(イ) 動物実験モデルでの抗腫瘍効果の検討

RMS 細胞株を用いたマウス xenograft model を作成し生着を確認後、YM753 (3mg/kg を 3 回/週、28 日間経静脈投与) を投与し、前述の Xenogen IVIS imaging System を用いて腫瘍サイズと肺転移数を評価する。PAX3-FOXO1 shRNA を用いた安定 PAX3-FOXO1 ノックダウン RMS 細胞株を用いたマウス xenograft model を作成。同様に YM753 を投与後、Xenogen IVIS imaging System を用いて腫瘍サイズを評価し、腫瘍細胞を摘出、組織学的変化を確認した。NB 細胞株を用いたマウス xenograft model を作成。生着を確認後、YM753 (3mg/kg を 3 回/週、28 日間経静脈投与) を投与し、Xenogen IVIS imaging System を用いて腫瘍サイズ、肺転移数、組織学的変化を確認した。いずれも、腫瘍細胞を摘出し、組織学的変化を確認した。

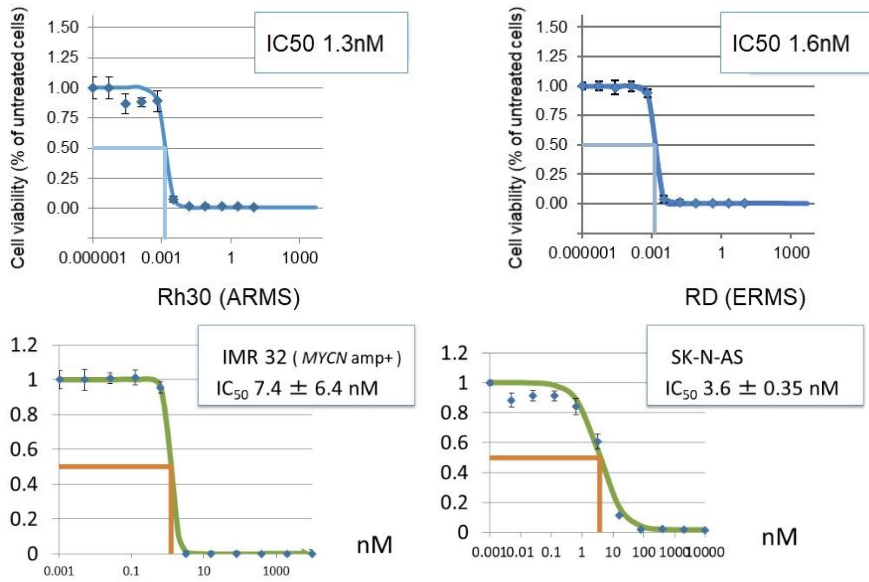
4. 研究成果

YM753 は胎児型および胞巣型 RMS 細胞株ともに奏功し、細胞死を誘導した。全例 G2/M arrest を示し、apoptosis 誘導が確認された。また、p21 の発現誘導、ヒストンのアセチル化、Cleaved caspase-3 の誘導が確認できた。YM753 投与群において phospho-Histone H3 の上昇、Survivin の低下、有糸分裂異常像が観察された。マウスモデルにおいては、YM753 投与群は非投与群に比べて腫瘍サイズ、生存曲線ともに有意差を持って改善した。

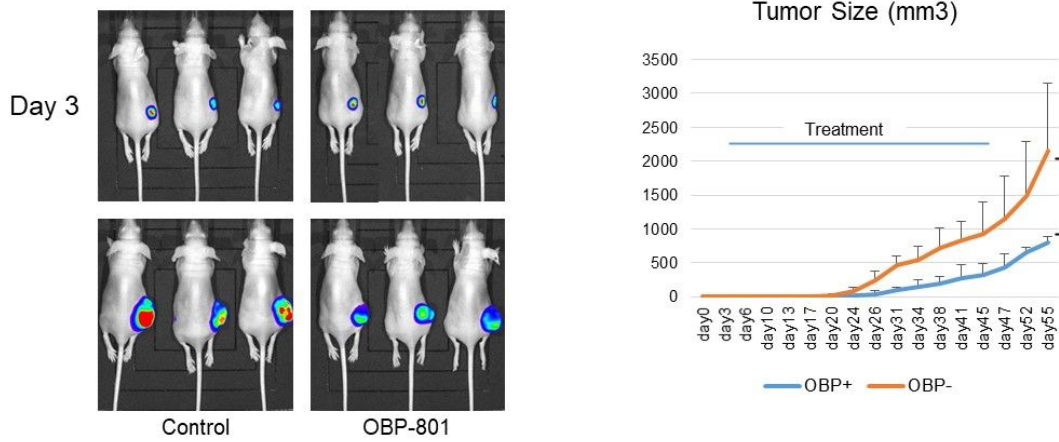
神経芽腫に対しては、細胞周期の G2/M arrest を引き起こし、アポトーシスを誘導した。

MYCN 増幅株・非増幅株どちらでも比較的低濃度で細胞増殖を抑制した。神経芽腫の担癌マウスモデルにて YM753 投与群は非投与群に比べて腫瘍サイズ、生存曲線ともに有意差を持って改善した。

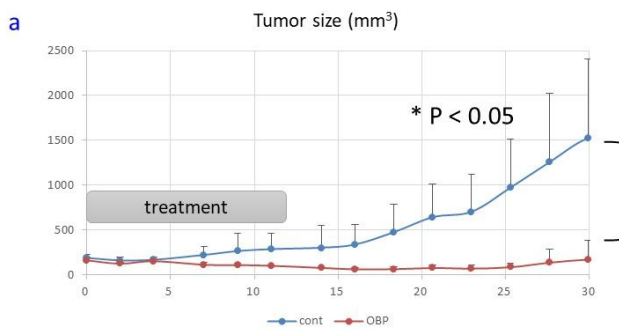
横紋筋肉腫細胞株 (RH30, RD), 神経芽腫細胞株 (IMR32, SK-N-AS)



横紋筋肉腫



神経芽腫



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomoyasu C, Kikuchi K, Kaneda D, Yagyu S, Miyachi M, Tsuchiya K, Iehara T, Sakai T, Hosoi H	4. 巻 41(1)
2. 論文標題 OBP-801, a novel histone deacetylase inhibitor, induces M;phase arrest and apoptosis in rhabdomyosarcoma cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncol Rep	6. 最初と最後の頁 643-649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2018.6813. Epub 2018 Oct 22.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 菊地顕, 友安千紘, 中村加世子, 柳生茂希, 宮地充, 勝見良樹, 土屋邦彦, 家原知子, 酒井敏行, 細井 創
2. 発表標題 横紋筋肉腫における新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤OBP-801の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第121回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Kaneda, Ken Kikuchi, Kayoko Nakamura, Shigeki Yagyu, Tomoko Iehara, Toshiyuki Sakai, Hajime Hosoi
2. 発表標題 The novel histone deacetylase inhibitor OBP-801 induces apoptosis in neuroblastoma tumor cells
3. 学会等名 Advances in Neuroblastoma research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Kaneda, Ken Kikuchi, Kayoko Nakamura, Shigeki Yagyu, Tomoko Iehara, Toshiyuki Sakai, Hajime Hosoi
2. 発表標題 The novel histone deacetylase inhibitor OBP-801 induces apoptosis in neuroblastoma tumor cells
3. 学会等名 Advances in Neuroblastoma research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊地顕、友安千紘、中村加世子、柳生茂希、宮地充、家原知子、酒井敏行、細井創
2. 発表標題 横紋筋肉腫における新規ヒストン脱メチル化酵素阻害剤の抗腫瘍効果と分子機構の解析
3. 学会等名 第121回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2018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
研究分担者	柳生 茂希 (Yagy Shigeki) (10572547)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究分担者	細井 創 (Hajime Hosoi) (20238744)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	菊地 顕 (Kikuchi Ken) (40453104)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教 (24303)	
研究分担者	宮地 充 (Miyachi Mitsuru) (40584983)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	