

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06572

研究課題名（和文）核内受容体による新たな細胞制御技術の開発；レチノイン酸受容体の分解制御に着眼して

研究課題名（英文）Development of Novel Cell Regulation Technology targeting Nuclear Receptors

研究代表者

湯浅 磨里（Yuasa, Mari）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：80506303

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：各種がん細胞におけるAm80とエピジェネティック阻害剤の併用効果を検討し、その結果、ClassIbに属するHDACiが併用に効果を示すことを明らかにした。これよりClassIbのHDAC6のターゲットの一つであるHSP90はアセチル化が亢進し、RARのシャペロンとして親和性を示しているHSP90はRARと解離し、結果として核移行を制御していることが示唆された。さらにRARの核移行制御が固形がん以外の細胞種やスフェロイドなどの培養条件においても共通の制御が行われているか検討を進め、いくつかの条件下では二剤の併用効果およびRAR核移行の制御は通常の2次元培養より顕著になることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核内受容体をターゲットとした創薬の成功例として、急性前骨髄急性白血病APLの治療薬Am80をはじめ、エストロゲンレセプター（ER）をターゲットとした乳がん治療薬タモキシフェン、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）をターゲットとした2型糖尿病の治療薬ロシグリタゾンなどがある。しかしながら、疾患に関与する核内受容体の精緻な制御は未だ途上であり従来のアゴニスト・アンタゴニストによる制御に留まらない新しい概念が求められている。本研究成果は従来の核内受容体リガンドによる制御に留まらないユビキチン化などの分解制御や細胞内輸送の制御など、新しい核内受容体制御法の開発に貢献しうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of synthetic retinoid Am80 in combination with epigenetic inhibitors in various cancer cells. Histone deacetylation inhibitors belonging to Class I1b were effective in combination with Am80. This suggests that HSP90, one of the targets of HDAC6 in Class I1b showing affinity as a chaperone of RAR, is hyperacetylated and dissociates from RAR, thereby regulating nuclear translocation. Furthermore, we investigated whether the nuclear migration of RAR is commonly regulated in cell types other than solid tumors and in culture conditions such as aggregation and spheroid. We found that the combined effects of the two drugs and the regulation of RAR nuclear migration are more pronounced under some conditions than in normal two-dimensional culture.

研究分野：創薬化学

キーワード：核内受容体

1. 研究開始当初の背景

核内受容体により制御される下位遺伝子の発現異常は様々な疾患に関わるため、その制御に関わるリガンド創製が積極的に進められている。核内受容体をターゲットとした創薬の成功例として、急性前骨髄急性白血病 (APL; acute promyelocytic leukemia) の治療薬 Am80 をはじめ、エストロゲンレセプター (ER) をターゲットとした乳がん治療薬タモキシフェン、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) をターゲットとした 2 型糖尿病の治療薬ロシグリタゾンなどがある。しかしながら、疾患に關与する核内受容体の精緻な制御は未だ途上であり、従来のアゴニスト・アンタゴニストによる制御に留まらない新しい概念が求められている。

2. 研究の目的

APL の病因が PML-RAR α キメラ遺伝子 (15 番染色体と 17 番染色体の相互転座に起因) であることから、PML-RAR の分解メカニズムについては多くの研究が行われてきた。一方で、正常型 RAR α は血球分化のみならず、多くのがん治療の有力なターゲットであるにも関わらず、その分解制御メカニズムには議論が及んでいない。この RAR α 分解制御を達成するべく、分解にかかわる時空間的な制御の解明を目指した。くわえて分解に関わる分子間のインタラクションを阻害または促進することにより RAR α の分解と下位遺伝子の発現を調節する化合物取得をめざした。すなわち、多くがヘテロダイマーとして働く核内受容体はそれぞれの多種多様なリガンドが開発されており、発現制御が可能となっているが、これらと分解の制御化合物を組み合わせた制御手法は開発されていない。ここで得られる知見や分解制御化合物は、すでに獲得されているアゴニストやアンタゴニストと協働させることで、AML や他の疾患に対する新しい制御手法を提供することになると考える。また、RAR α 分解制御法やそこで得られる知見は、他の核内受容体とそのアゴニストの機能制御にも展開可能で、広く活用できる方法になると考えた。核内受容体は増殖や分化にきわめて重要な役割を果たす。これらの制御法は疾患治療のみならず、幹細胞の分化誘導等の再生医療分野を含めた幅広い分野へ重要な知見を与えると考える。

3. 研究の方法

既知化合物を活用したユビキチン化制御、分解メカニズムの解析を RAR の転写活性化様式を評価できるレポーターアッセイシステムとプロテアソーム阻害剤、MDM2 阻害剤、特異的リン酸化阻害剤などを活用して転写活性化からユビキチンリガーゼによる分解に至る過程、特に特異性の高い核内受容体リガンドを活用して RAR α の挙動を明らかにする。これにより効率的な制御を実現するためにターゲットとすべき相互作用分子とその相互作用部位を明確化する。

4. 研究成果

Am80 の適用拡大を検討するため、各種がん細胞に対して Am80 とエピジェネティック阻害剤 (DNA メチル基転移酵素阻害剤 5-Azacytidine、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 SAHA) の併用効果を検討した。いくつかの固形がん細胞においてエピジェネティックな変化により RAR α の発現が抑制されていることを明らかになった。これに対してエピジェネティック阻害剤を用いることで、がん細胞でサイレンシングされた核内受容体の発現を回復させることを検討した。その結果、肝がん細胞、前立腺がん細胞および AML 細胞 (Kasumi-1 細胞) で細胞増殖抑制に相乗効果がみられた (図 1)。

しかしながら、たとえばエピジェネティック制御化合物 (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤; SAHA) による RAR α の発現促進が達成された場合でも RAR α の分解が進み、下位遺伝子の発現が十分に持続しないことが発現解析やウェスタンブロットなどの解析で明らかになった (図 2)。

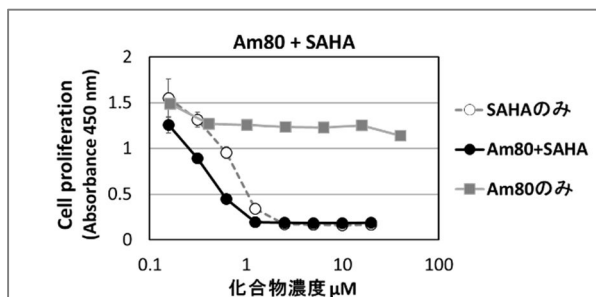
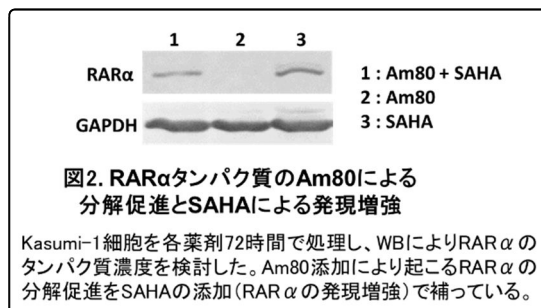


図 1. Am80とSAHA併用によるKasumi-1の増殖抑制効果

Kasumi-1細胞を各薬剤72時間で処理し、細胞増殖を測定した。Am80 25 μMでは細胞増殖は抑制されないが、SAHAと併用することで、相乗効果がみられる。

RAR α と同クラスの RAR γ 2 では、アゴニストの結合に伴い構造が変化し、下位遺伝子の転写を活性化した後ユビキチン化され分解される。このように一旦 ON になった転写活性は核内受容体自体の分解により抑制される。Am80 とプロテアソーム阻害剤 MG132 の併用により RAR α の分解を抑制したところ、分解が抑制され、がん細胞の増殖抑制効果にも相乗効果が認められた。



さらに検討を進めた結果、ClassIIb に属するヒストン脱アセチル化阻害剤がAm80との併用に効果を示すことを明らかになった。これより、ClassIIbのHDAC6のターゲットの一つであるHSP90はアセチル化が亢進し、本来であればRAR α のシャペロンとして親和性を示しているHSP90はRAR α と解離し、その結果として核移行を

制御していることが示唆された¹⁾(図3)。さらに、RAR α の核移行制御が固形がん以外の細胞種や凝集状態やスフェロイドなどの培養条件においても共通の制御が行われているか検討を進め、いくつかの条件下では二剤の併用効果およびRAR核移行の制御は通常の2次元培養より顕著になることが明らかになった。

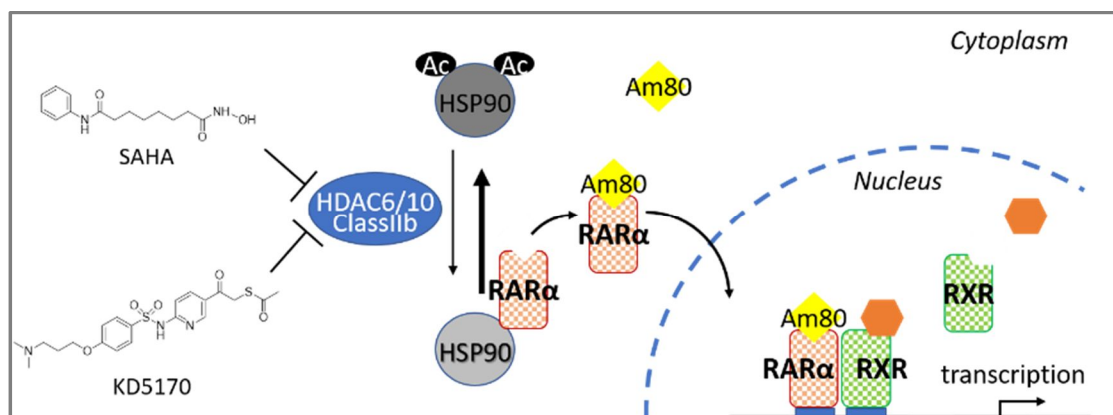


図3. HSP90 およびHDACによるRAR核移行の制御機構

シャペロンであるHSP90はRARに結合し核移行を制御している。特異的リガンドが存在してもHSP90と結合しているRARは核移行せず、下位遺伝子の転写は起こらない。この核移行の制御は創薬のターゲットとなり得る。

本研究で、がん細胞で抑制されているRAR α 下位遺伝子の発現を特異的リガンドとエピジェネティック制御剤を用いて制御できることを明らかにした。また、プロテアソーム阻害剤による分解を制御することも可能となった。この機構を解析したところ、この発現制御にRAR α の核移行制御が深く関わっていることが示唆され、さらにこの核移行はがん細胞種、培養様式により違ったステータスを示すことが明らかになった。すなわち、RAR α が関わる疾患の制御法として核移行制御が新たなターゲットとして有望な候補であることを明らかにした。

1) **Ishigami-Yuasa M**, Ekimoto H, Kagechika H. Class IIb HDAC Inhibition Enhances the Inhibitory Effect of Am80, a Synthetic Retinoid, in Prostate Cancer. *Biol Pharm Bull.*, 42(3), 448-452, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Ishigami-Yuasa Mari, Kagechika Hiroyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Chemical Screening of Nuclear Receptor Modulators	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5512 ~ 5512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21155512	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 -
1. 著者名 Koga Hitomi, Negishi Mai, Kinoshita Marie, Fujii Shinya, Mori Shuichi, Ishigami-Yuasa Mari, Kawachi Emiko, Kagechika Hiroyuki, Tanatani Aya	4. 巻 21
2. 論文標題 Development of Androgen-Antagonistic Coumarinamides with a Unique Aromatic Folded Pharmacophore	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5584 ~ 5584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21155584	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 -
1. 著者名 Sakakitani Shintaro, Podyma Inoue Katarzyna A., Takayama Rina, Takahashi Kazuki, Ishigami Yuasa Mari, Kagechika Hiroyuki, Harada Hiroyuki, Watabe Tetsuro	4. 巻 112
2. 論文標題 Activation of 2 adrenergic receptor signals suppresses mesenchymal phenotypes of oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 155 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14670	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 -
1. 著者名 Ishigami-Yuasa Mari, Ekimoto Hisao, Kagechika Hiroyuki	4. 巻 42
2. 論文標題 Class IIb HDAC Inhibition Enhances the Inhibitory Effect of Am80, a Synthetic Retinoid, in Prostate Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 448 ~ 452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00782	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 -

1. 著者名 Kazui Yuko, Fujii Shinya, Yamada Ayumi, Ishigami-Yuasa Mari, Kagechika Hiroyuki, Tanatani Aya	4. 巻 26
2. 論文標題 Structure-activity relationship of novel (benzoylaminophenoxy)phenol derivatives as anti-prostate cancer agents	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 5118 ~ 5127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.09.008	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 -

1. 著者名 Timalsina Shikshya, Arimoto-Matsuzaki Kyoko, Kitamura Masami, Xu Xiaoyin, Wenzhe Qiu, Ishigami-Yuasa Mari, Kagechika Hiroyuki, Hata Yutaka	4. 巻 164
2. 論文標題 Chemical compounds that suppress hypoxia-induced stress granule formation enhance cancer drug sensitivity of human cervical cancer HeLa cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 381 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy062	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 -

1. 著者名 Murayama Takashi, Kurebayashi Nagomi, Ishigami-Yuasa Mari, Mori Shuichi, Suzuki Yukina, Akima Ryunosuke, Ogawa Haruo, Suzuki Junji, Kanemaru Kazunori, Oyamada Hideto, Kiuchi Yuji, Iino Masamitsu, Kagechika Hiroyuki, Sakurai Takashi	4. 巻 94
2. 論文標題 Efficient High-Throughput Screening by Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ Measurement to Identify Inhibitors of Ryanodine Receptor Ca ²⁺ -Release Channels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 722 ~ 730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/mol.117.111468	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 -

1. 著者名 Shimada Shu, Akiyama Yoshimitsu, Mogushi Kaoru, Ishigami-Yuasa Mari, Kagechika Hiroyuki, Nagasaki Hiromi, Fukamachi Hiroshi, Yuasa Yasuhito, Tanaka Shinji	4. 巻 118
2. 論文標題 Identification of selective inhibitors for diffuse-type gastric cancer cells by screening of annotated compounds in preclinical models	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 972 ~ 984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-018-0008-y	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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 湯浅 磨里、影近 弘之
2. 発表標題 ヒト前立腺がん細胞におけるタミバロテンとヒストン脱アセチル化 酵素阻害薬の併用効果の検討および作用機序の解明
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mari Ishigami-Yuasa, Hiroyuki Kagechika
2. 発表標題 nhibitory effect of a synthetic retinoid, tamibarotene in combination with epigenetic drugs on human cancer cell growth.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯浅 磨里，影近 弘之
2. 発表標題 前立腺がんLNCapにおける合成レチノイドAm80とクラス選択的ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の併用効果.
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯浅 磨里，影近 弘之.
2. 発表標題 エピジェネティック阻害薬との併用効果
3. 学会等名 第361回脂溶性ビタミン総合研究委員会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tamura M, Kurebayashi N, Murayama T, Mori S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Suzuki J, Kanemaru K, Iino M, Sakurai T.
2. 発表標題 Discovery of novel RyR2 inhibitors as candidates for anti-arrhythmic drugs.
3. 学会等名 WCP 2018 KYOTO 18 th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishigami-Yuasa M, Kagechika H.
2. 発表標題 Growth inhibition of AML cell lines by a synthetic retinoid in combination with the epigenetic modulators, and protein level of RAR .
3. 学会等名 FASEB The 4th International Conference on Retinoids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tamura M, Kurebayashi N, Murayama T, Mori S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Suzuki J, Kanemaru K, Iino M, Sakurai T.
2. 発表標題 Search for type 2 ryanodine receptor inhibitor by monitoring endoplasmic reticulum Ca ²⁺ .
3. 学会等名 BSP18 62ND Annual Meeting Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishigami-Yuasa M
2. 発表標題 Growth inhibition of several human cancer cell lines by a synthetic retinoid in combination with the epigenetic modulators.
3. 学会等名 JSPS Core-to-core Program Symposium Frontier of Genomic Medicine “Retinoid (Am80, Tamibarotene) as therapeutics for intractable diseases” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishigami-Yuasa M, Watanabe Y, Suzuyama H, Masuno H, Fujii S, Mori T, Kikuchi E, Uchida S, Kagechika H.
2. 発表標題 Development of WNK Signaling Inhibitors as a New Class of Antihypertensive Drugs.
3. 学会等名 SPS Core-to-core Program Symposium Frontier of Genomic Medicine “Retinoid (Am80, Tamibarotene) as therapeutics for intractable diseases” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 湯浅 磨里, 影近 弘之
2. 発表標題 急性骨髄性白血病細胞株Kasumi-1における Am80 (タミパロテン) とヒストン脱アセチル化酵素阻害薬との併用効果.
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 修一、飯沼 大翔、間中 紀暁、湯浅 磨里、村山 尚、呉林 なごみ、影近 弘之.
2. 発表標題 変異1型リアノジン受容体のCa ²⁺ 遊離を抑制する新規化合物の創製.
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------