

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390351

研究課題名 (和文) 細胞内核外輸送阻害とエピジェネティクス制御を標的とした消化器癌分子治療の開発

研究課題名 (英文) Creation of molecular therapy for gastrointestinal cancer using inhibition of intra cellular molecular transport and regulation of epigenetics

研究代表者

松原 久裕 (MATSUBARA HISAHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20282486

研究成果の概要 (和文)：難治性消化器癌に対する新たな治療を目指し、遺伝子の導入、転写、翻訳され機能するタンパクとして発現し、細胞内を輸送され、さらに分解されるという細胞内でのダイナミックな動きを制御することを目指し、遺伝子の発現を制御する酵素の阻害剤により遺伝子治療の効率を上げることを確認、新たな化合物の抗腫瘍効果も確認した。また、分子の細胞間輸送を制御することにより細胞死がより強く誘導可能であった。これらの化合物は橋渡し研究の重要なシーズの1つであり、分子治療の展開上で極めて有用である。

研究成果の概要 (英文) : In order to create new molecular therapy for gastrointestinal cancer, we have planed the regulation of gene transduction, translation and protein synthesis. Furthermore, we have tried inhibition of intracellular molecular transport for the same purpose. We found that new molecule which inhibit enzyme for genetic expression have good efficiency for gene therapy. And this molecule was revealed anti-tumor action. The regulation of molecular transportation between nuclear and cytoplasm have induced cell death. These new molecules are important seeds for translational research and extremely useful for new development of molecular therapy for gastrointestinal cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：消化器癌、細胞内分子移動、エピジェネティクス、分子治療、micro RNA

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の導入、細胞内での遺伝子の発現、細胞内での分子移動の制御、遺伝子導入細胞による生体の応答を利用した新たな難治性消化器癌に対する新たな治療を目指す。消化器癌への遺伝子治療は単独では十分な効果を得ることが難しく、種々の工夫によるブレイクスルーが必要である。当科での進行食道癌へのp53遺伝子治療も忍容性は良好で

あったが、対象症例が高度進行例ではあったが奏効率という点では十分な結果が得られなかった(14)。まず第1に遺伝子導入の観点から種々のウイルスベクターの開発、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導するウイルス治療の方向へ多くの研究が進んでいるが、今回、本研究で採用し、これまでに有用性を確認してきた電気穿孔遺伝子導入法は極めて特異的であり、ウイルスベクターを用いないため

安全性が高く、併用する薬剤の細胞内流入にも有用であることから癌治療に極めて有望な方法である 30,34)。さらに遺伝子をノックダウンする手法として siRNA が基礎実験に汎用されるようになったが実際の癌組織に siRNA を導入して癌の増殖、浸潤、転移を抑制する方法としても極めて有望な手法である。

第2に導入遺伝子の発現についての課題である。ヒトゲノムがすでに解読された後、遺伝子発現という点からエピジェネティクスの研究は極めて重要な課題とされ、遺伝子変異のみならず遺伝子の発現制御が癌においても極めて重要であり発癌並びに癌の治療の観点から研究が進みつつある領域である。遺伝子の発現には遺伝子そのものだけでなく、エピジェネティクスと呼ばれる遺伝子周囲の環境が極めて重要であることが明らかになりつつある。遺伝子、ヒストンのメチル化、ヒストンのアセチル化などが遺伝子の転写に重要であることが解明されてきた。これまでに萌芽研究としてヒストンの脱アセチル化酵素(HDAC)を阻害することにより食道癌に対して抗腫瘍効果を示す化合物の検討を行い、癌抑制遺伝子の1つである Prdx-1 が発現誘導され抗腫瘍効果を示すことを明らかにした 23)。また、これらの薬剤は導入遺伝子の転写活性を増強することも報告されつつある。ヒストンのアセチル化を制御することにより、新たな分子治療の戦略が可能となる。また、理化学研究所、吉田稔博士の協力により新たな HDAC 阻害剤の提供が可能となった。HDAC 阻害剤はこのエピジェネティクスに影響を与える新たな分子標的薬剤として国内外で脚光を浴び、現在欧米において臨床研究が進みつつある。すでに私たちは HDAC 阻害剤 FK228 の食道癌への抗腫瘍効果を確認、報告しており 23)、連携研究者の吉田らとともに新たに開発する強力な安全性の高い新規化合物の研究は臨床応用という点からは極めて有意義である。

第3に遺伝子導入により発現した分子をいかに細胞内で強力に作用させるかである。P53 タンパクのようなアポトーシスを誘導する癌抑制遺伝子産物が細胞内においてユビキチン化されプロテアソームにより分解され、その機能を喪失する。P53 は HDM-2 と結合しユビキチン化されていくことが解明されている。発現した P53 分子が分解されず核内で機能することにより強力にアポトーシスが誘導される。核外輸送シグナル(NES)をもつ分子が CRM-1 と結合することにより核から細胞質へ輸送されるが、レプトマイシンは CRM-1 へ結合するのを阻害し、核外への分子の輸送を阻止する。この結果、核内の分子濃度が上昇し、作用を増強する。P53 タンパクは NES をその C 末側に有しており、

これまでに食道癌細胞においてレプトマイシンにより核内濃度が上昇しアポトーシスが誘導することを確認した。細胞質一核の間の分子移動は癌治療において新たな分子標的として極めて有望である。同時に遺伝子治療に併用することによりその効果を増強する。一方、すべての癌細胞に遺伝子を導入する必要がある方法ではその遺伝子導入効率を考慮すると治療に限界がある。そのため、遺伝子導入細胞以外の細胞へその遺伝子産物が移行し、細胞死を誘導することが可能なバイスタンダー効果を示す遺伝子の利用あるいはサイトカイン遺伝子、樹状細胞のような宿主の免疫応答を利用した遺伝子治療の開発も極めて重要である。1つの細胞単位ではなく周囲の細胞を含めた空間、あるいは生体というさらに大きな空間を含め治療を考える必要がある。これまでに IL-2,GM-CSF,IL-21 等種々のサイトカイン遺伝子や Herpes Simplex Virus-Thymidinekinase 遺伝子を自殺遺伝子として利用して、遺伝子が導入されない腫瘍細胞への治療効果についてマウスモデルにて有用であることを確認、報告してきた 2,21,22,27)。

また、樹状細胞を利用した治療が現在の癌免疫治療の大きな流れとなっている。私どもは樹状細胞が Heat Shock Protein の1つである gp96 に着目し、放射線治療による gp96 発現増強と樹状細胞による gp96 の取り込みにより、両者を併用することにより放射線照射した局所のみならず、放射線照射していない遠隔転移巣へも治療効果を認めることを報告した 4)。さらに HDAC 阻害剤により MHC classI 抗原の発現増加も報告されており、HDAC 阻害剤や遺伝子治療と併用することにより遠隔転移巣の制御が可能になる展望が開けてきた。

2. 研究の目的

エピジェネティクスの制御に関してはヒストンのアセチル化を制御することにより、新たな分子治療の戦略が可能とするため、より強力かつ安全性に優る吉田博士より提供される新たな HDAC 阻害剤の有効性および抗腫瘍効果の分子機構の解明をこの3年間で行う。また、遺伝子治療に併用することにより、導入遺伝子の転写活性の増強、新規癌抑制遺伝子 Prdx-1 のような遺伝子発現による相乗効果を確認する。

遺伝子導入による分子発現が核外分子輸送を阻害するレプトマイシンにより核内の作用を増強する機序の分子レベルでの解明を行う。P53 の CRM1 依存性核外輸送および分解が Jab1(Jun activation domain-binding protein 1)により促進され、これをレプトマイシンが阻害することが報告されており、これらの機序の解明ならびに

外来性の遺伝子導入による発現での差異を解明する。また P53 などのアポトーシスを誘導する分子に関し RNA 干渉(RNAi)により制御し、分解を防ぎ抗腫瘍効果が増強することを期間内に確認する。in vivo 電気穿孔法による siRNA 導入の有効性を確認する。

さらに強い腫瘍免疫を惹起する新たなサイトカイン遺伝子による治療、および放射線照射と樹状細胞による増強効果を期間内に確認する。電気穿孔法の電極が臨床応用可能になった時点でトランスレーショナルリサーチへの移行が可能となる。さら非遺伝子導入細胞への効果を目指したサイトカイン、HSV-tk 遺伝子導入に関して HDAC 阻害剤の併用による遠隔転移巣への抗腫瘍効果の増強効果の有無をマウスモデルにて確認する。

遺伝子治療の発展のために安全性・経済性の面から非ウイルス性ベクターの開発が必要である。非ウイルス性ベクターとしてプラスミドのみで遺伝子導入を行い、効率的に遺伝子導入が可能な方法として siRNA の導入も可能な in vivo 電気穿孔法は臨床応用に極めて有利である。実際の鏡視下手術や内視鏡下で使用できる電極の開発をこれまでに進めてきた。前回の基盤研究においてブタモデルにて使用可能な試作品を完成した。今期間内に実際にヒトにおいて利用可能な電極の開発を進め、速やかにトランスレーショナルリサーチへ移行しヒトへの臨床研究を実施する。

これまでの単に遺伝子を導入する、単独の分子標的を目的とした薬剤のみでは、ヘテロジェナイティーという特徴をもつ難治性の消化器癌の性質からみるとその治療には限界がある。当研究は、遺伝子を導入する時点から、ヒストンのアセチル化脱アセチル化、転写、翻訳され機能するタンパクとして発現し、細胞内を輸送され、さらに分解されるという細胞内でのダイナミックな動き、エピジェネティクスを制御することを目標とした独創的な研究である。さらに生体の応答を利用した遠隔転移巣まで含めた新たな癌治療法の展開を計画している。

HDAC 阻害剤を含めたエピジェネティクスについての研究はあらたな分子治療の開発には極めて重要である。さらに遺伝子の転写活性を増強することにより遺伝子治療に併用する際にも有用である。また、分子の細胞間輸送を制御することによる癌治療は新たな癌分子治療を考える上で極めて重要である。さらに HDAC 阻害剤の新規化合物はトランスレーショナルリサーチの重要なシーズの1つであり、in vivo 電気穿孔法を含めて本研究の後速やかに移行したいと考えている。

3. 研究の方法

1) 新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の食道癌細胞における in vitro での抗腫瘍効果の検討。すでに既存の HDAC 阻害剤である FK228 を用いた食道癌細胞での抗腫瘍効果は報告しており 14)、新たな薬剤による実験により検討、確認が可能である。

2) 細胞内タンパク輸送を阻害するレプトマイシン等新規分子標的薬剤の食道癌細胞における in vitro での抗腫瘍効果の検討。すでにレプトマイシンによるパイロット研究は終了しており、その効果を確認済みである。検体数を増やすことにより、効果の確認により検討可能な状態である。

3) ノードマウス食道癌細胞皮下移植モデルでの新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の抗腫瘍効果の検討。

4) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤および mdm-2 に対する siRNA によるヒト食道癌細胞における細胞内 p 53 遺伝子発現の増強効果の検討。 RNAi を用いた細胞内での遺伝子ノックダウンに関してもすでに当科ではその手法を確立し、食道癌細胞で癌抑制遺伝子 Prdx1 を RNAi を用いてノックダウンすることによりヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による増殖抑制効果が減弱することを報告している。

5) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によるヒト食道癌細胞における細胞周期制御、細胞死の細胞生物学的解析。遠隔転移巣への遺伝子治療の開発として、バイスタンダー効果を有する HSV-tk 遺伝子を用いた抗腫瘍効果の検討を in vivo で行う。

6) 樹状細胞と Heat Shock Protein gp96 を利用したサイトカイン遺伝子とのマウスモデルでの併用効果の検討。

7) 核内から細胞質への細胞内タンパク輸送を阻害するレプトマイシンによる in vivo での抗腫瘍効果、および核内に蓄積する分子の検討。

8) siRNA の導入効率、遺伝子発現の基礎的検討。

9)、新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 CHAP31 におけるアポトーシスの機序の解析。

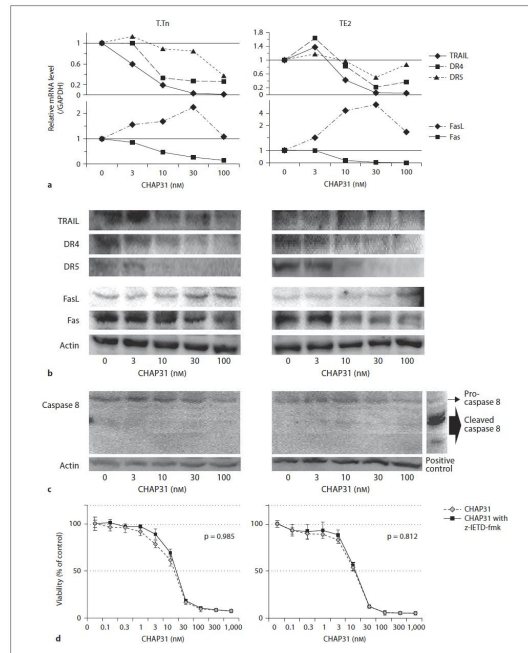
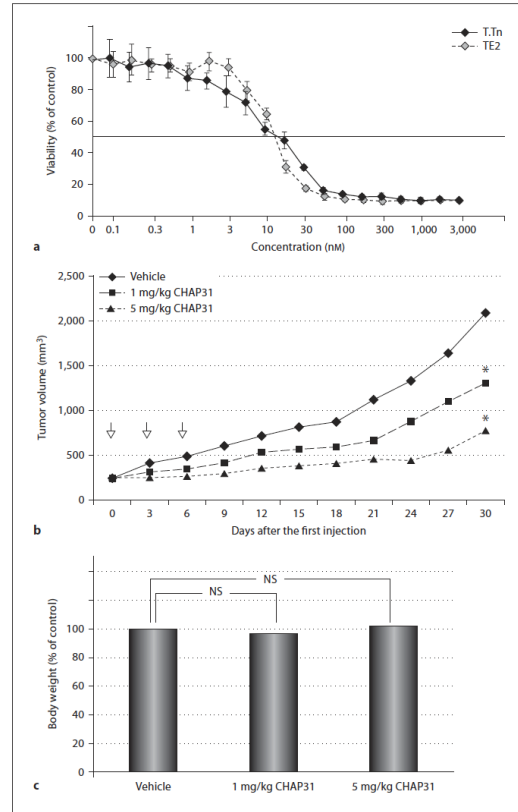
10) 食道癌細胞からエピジェネティクスの重要な役割を担う microRNA をアレイにより解析。

4. 研究成果

遺伝子の導入、細胞内での遺伝子の発現、細胞内での分子移動の制御、遺伝子導入細胞による生体の応答を利用した新たな難治性消化器癌に対する新たな治療を目指している。これまでの単に遺伝子を導入する、単独の分子標的を目的とした薬剤のみでは、ヘテロジェナイターという特徴をもつ難治性の消化器癌の性質からみるとその治療には限界がある。当研究では、遺伝子を導入する時点から、ヒストンのアセチル化脱アセチル化、転写、翻訳され機能するタンパクとして発現し、細胞内を輸送され、さらに分解されるという細胞内でのダイナミックな動き、エピジェネティクスを制御することを目指している。

今回、HDAC 阻害剤を食道癌細胞に作用させることにより、遺伝子治療に用いるアデノウイルスベクターの細胞内導入に必要なコクサッキーアデノウイルスレセプターの発現が増強すること、それにより遺伝子導入高率が増加すること、実際の遺伝子治療に用いる p53 遺伝子発現が増強することを確認、報告した。また、分子の細胞間輸送を制御することによる癌治療は新たな癌分子治療を考える上で極めて重要であり、レプトマイシン B を用いて核から細胞質への分子輸送を阻害することにより核内に p53 分子が蓄積することが確認された。さらに p53 分子より下流の分子の転写が増強していることも明らかになり、細胞死も誘導可能であった。これらの化合物はトランスレショナルリサーチの重要なシーズの1つであり、分子治療を展開するうえで極めて有用である。

さらに食道癌細胞にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を作用させることによって生じるアポトーシスの機序について不明であったが、新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 CHAP31 が食道癌治療に有用であることを示し、そのアポトーシスの機序が Fas-FasL による外因性経路ではなく、ミトコンドリアを介した内因性経路によるものであることを明らかにした。この経路では Bax が関与しているがその上流の p53 とは独立しており、ROS が関与していることも明らかにした。また、この CHAP31 は新たながん治療として有用性が検証されつつある重粒子線との併用により、食道癌細胞において CHAP31 が DNA 修復遺伝子の発現を抑制し、その抗腫瘍効果を *in vitro* ならびに *in vivo* において増強することを明らかにした。

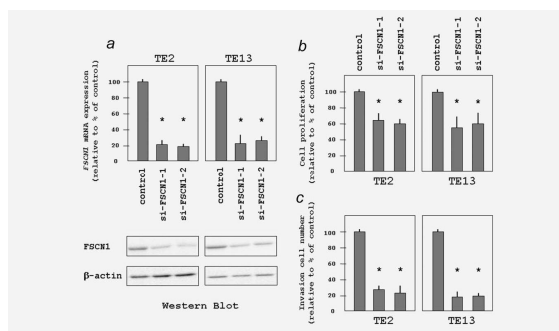


(Oncology. 2010;78(1):62-74 より)

現在非常に注目されている microRNA の役割についても検討を行い、食道癌細胞からエピジェネティクスの重要な役割を担う microRNA をアレイにより解析、食道癌細胞において抑制されている miR-145, miR-133 を見出した。これらの miRNA を食道癌細胞に導入

することにより細胞増殖と癌細胞として特徴的な性質である浸潤能が減弱することを確認した。これらの miRNA が FSCN を標的としていることを確認しさらに直接同遺伝子の転写領域に作用することを確認した。これらの miRNA 導入により細胞内の FSCN 発現が減弱することも確認できた。

また、この FSCN を siRNA によりノックダウンすることにより食道癌細胞の増殖能、浸潤能ともに減弱した。エピジェネティクスの重要な一員である miRNA が抑制的に働き癌遺伝子の発現を減弱させ、癌治療に有用であることが明らかとなった。



(Int J Cancer. 2010 ;127:2804-14. より)

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 13 件) 【全て査読有り】

①: Akutsu Y, Hanari N, Yusup G, Komatsu-Akimoto A, Ikeda N, Mori M, Yoneyama Y, Endo S, Miyazawa Y, Matsubara H. COX2 Expression Predicts Resistance To Chemoradiotherapy in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Ann Surg Oncol. 2011 Mar;25. [Epub ahead of print]

②: Akutsu Y, Matsubara H, Kano M, Usui A, Yoneyama Y, Ikeda N, Komatsu A, Yusup G. Correlation between gp96 expression and the surgical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol. 2011 Mar;18(3):832-7.

③: Wu D, Matsushita K, Matsubara H, Nomura F, Tomonaga T. An alternative splicing isoform of eukaryotic initiation factor 4H promotes tumorigenesis in vivo and is a potential therapeutic target for human cancer. Int J Cancer. 2011 Mar 1;128(5):1018-30.

④: Kano M, Seki N, Kikkawa N, Fujimura L, Hoshino I, Akutsu Y, Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M, Matsubara H. miR-145, miR-133a and miR-133b:

Tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 2010 Dec 15;127(12):2804-14.

⑤: Hoshino I, Matsubara H. Recent advances in histone deacetylase targeted cancer therapy. Surg Today. 2010 Sep;40(9):809-15.

⑥: Murakami K, Matsubara H, Hoshino I, Akutsu Y, Miyazawa Y, Matsushita K, Sakata H, Nishimori T, Usui A, Kano M, Nishino N, Yoshida M. CHAP31 induces apoptosis only via the intrinsic pathway in human esophageal cancer cells. Oncology. 2010 Mar;78(1):62-74.

⑦: Kawahira H, Matsushita K, Shiratori T, Shimizu T, Nabeya Y, Hayashi H, Ochiai T, Matsubara H, Shimada H. Viral shedding after p53 adenoviral gene therapy in 10 cases of esophageal cancer. Cancer Sci. 2010 Jan;101(1):289-91.

⑧: Kano M, Yamada S, Hoshino I, Murakami K, Akutsu Y, Sakata H, Nishimori T, Usui A, Miyazawa Y, Kamada T, Tsujii H, Matsubara H. Effects of carbon-ion radiotherapy combined with a novel histone deacetylase inhibitor, cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 31 in human esophageal squamous cell carcinoma. Anticancer Res. 2009 Nov;29(11):4433-8.

⑨: Hoshino I, Matsubara H, Komatsu A, Akutsu Y, Nishimori T, Yoneyama Y, Murakami K, Sakata H, Matsushita K, Miyazawa Y, Brooks R, Yoshida M, Ochiai T. Combined effects of p53 gene therapy and leptomycin B in human esophageal squamous cell carcinoma. Oncology. 2008 Nov;75(1-2):113-9.

〔学会発表〕 (計 25 件)

①. Matsubara H, Usui, A, Akutsu Y, et al. : Fra-1 is an independent prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma and related to cell proliferation, migration and invasion in vitro. 22nd EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics 2010年11月19日 Berlin, Germany

②. Matsubara H, Murakami K, Akutsu Y, Nishino N, Yoshida M: CHAP31 Induces Apoptosis Only via the Intrinsic Pathway in Human Esophageal Cancer Cells. 8th AACR-JCA Joint Conference 2009年10月16日 Kona, Hawaii, USA

③. 松原 久裕: 食道癌の外科治療と新規治療法の現況. 日本癌学会 腫瘍別シンポジウム 2008年10月30日名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 久裕 (MATSUBARA HISAHIRO)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：20282486

(2) 研究分担者

阿久津 泰典 (AKUTSU YASUNORI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：00375677