

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790802
 研究課題名（和文）
 リンパ球系悪性腫瘍に対するHDAC阻害剤の応答性のメカニズムと予測因子の解析
 研究課題名（英文）
 Molecular analysis of mechanisms regulating drug sensitivity of lymphoid neoplasms to HDAC inhibitor
 研究代表者
 藤井 一恭（FUJII KAZUYASU）
 岡山大学・岡山大学病院・助教
 研究者番号：70452571

研究成果の概要（和文）：

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)に対する応答性を予測する分子を同定するために、37株のリンパ球系悪性腫瘍の細胞株に対するバルプロ酸の増殖阻害濃度を測定し、我々が構築した各々の細胞株の蛍光標識二次元電気泳動の発現プロファイルと比較した。HDACi に対する感受性に相関する分子として新たに 19 タンパク質スポットを新たに同定した。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the molecular mechanisms and the predictive markers of sensitivity to histone deacetylase inhibitor (HDACi), we compared with IC50 values for valproic acid, one of the HDACi, in 37 lymphoid cell lines and their 2D-DIGE expression profiles. We newly identified 19 protein spots associated with HDACi sensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：HDAC 阻害剤、薬剤感受性

1. 研究開始当初の背景

皮膚は筋外原発リンパ腫の中では消化管に次いで好発する部位である。菌状息肉症をは

じめ皮膚原発のリンパ腫は悪性度の低いものが多いが、治療方法は確立されているものは少ない。病変が限局していれば放射線療法が

有効であるが、病変が広範囲に及ぶ場合はステロイド外用剤や紫外線療法などで病期の進行を遅らせることはできるものの、化学療法でも根治するのが難しく、病期が進行すれば多臓器浸潤、感染症などのために死亡する。また死亡に至らない患者においても難知性皮膚病変が長期間持続するために、社会生活上の支障が大きい。そのため新たな治療薬の開発が望まれている。近年HDAC阻害薬がリンパ腫、白血病、種々の固形癌の増殖を抑制することが明らかになっている。米国ではHDAC阻害薬の1種であるSAHA(vorinostat)が他疾患に先駆けて皮膚T細胞リンパ腫の治療薬として認可された。またSAHA以外にも世界中で複数のHDAC阻害薬について皮膚リンパ腫を含む悪性腫瘍に対しての臨床試験が進行中である。

しかし再発性皮膚T細胞リンパ腫患者に対して行われた第I/II相試験におけるSAHAの全奏効率は20%台に留まっている。有効例ではヒストンのアセチル化が亢進していることなどが明らかにされているが、無効例ではどうして腫瘍の増殖抑制がかからなかったのか、有効例と無効例では細胞レベルで違いがあるのかなど不明な点が多く残されている。

ところで肺がんの治療薬であるイレッサに関して、治療前の腫瘍の細胞内タンパク質を網羅的に解析することにより、イレッサが奏効する群と無効である群とが鑑別でき、治療開始の前に治療効果が予測できることが報告されている。そこでHDAC阻害薬に関しても腫瘍細胞の細胞内分子を解析することにより、治療によく反応する群と、無効である群とが予め予測できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HDAC阻害剤に対する感受性を予測する分子を同定し、その背景にあるメカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

研究開始当時、国内で唯一臨床応用が可能であったHDAC阻害剤であるバルプロ酸を用いた。

(1)37株のリンパ球系悪性腫瘍の細胞株に対するバルプロ酸のIC50の同定。

種々の濃度(0.25~10mM)のバルプロ酸の存在下で細胞株を培養し、72時間後における細胞増殖抑制をXTT法を用いて測定し、IC50を同定した。

(2)37株の細胞株の細胞内タンパク質の発現プロファイルの同定

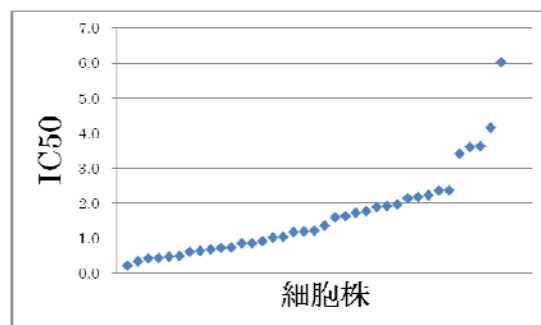
我々が構築した蛍光標識二次元電気泳動(2D-DIGE)のデータベースより、各々の細胞株の細胞内タンパク質の発現プロファイルのデータを引用した。

(3)バルプロ酸に対する感受性と相関する分子の同定

上記(1)(2)で得られたデータをもとに、バルプロ酸に対するIC50とタンパク質の発現プロファイルを比較検討し、相関関係のある分子を同定した。

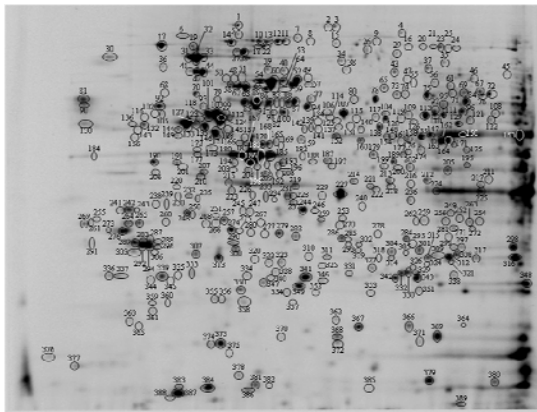
4. 研究成果

(1)リンパ球系悪性腫瘍の細胞株におけるバルプロ酸に対するIC50の同定



72時間刺激後のIC50は0.2mMから6.0mMで、平均は1.6mMであった。

(2) 各細胞株における細胞内タンパク質の発現プロファイルの抽出



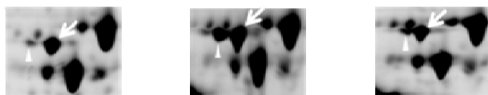
我々が構築した2D-DIGEのデータベースから、各々の細胞株について質量分析によってタンパク質が同定されている389タンパク質スポットの発現データを抽出した。

(3) バルプロ酸に対するIC50と相関のある分子の同定

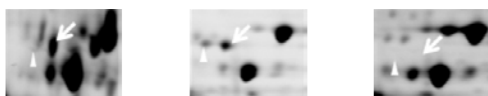
上記(1)で得られたIC50のデータと、各々の細胞株のタンパク質スポットの発現データを比較した。データベース上の389タンパク質スポットのうち19スポットの濃度がIC50と相関関係があった (Spearmanの順位相関係数 $r_s > 0.4$)。このうち高感受性群(IC50 < 0.5 mM)と不応群(IC50 > 3.0 mM)との間で濃度に2倍以上の差を認めるものとして、3スポット2タンパク質を同定した。

protein X (2タンパク質スポット、1タンパク質)

高感受性株

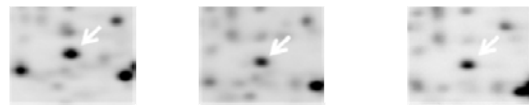


低感受性株

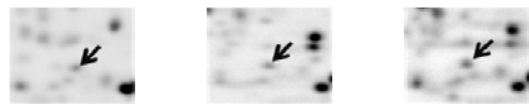


protein Y (1タンパク質スポット、1タンパク質)

高感受性株



低感受性株



現在これらの分子に関してwestern blotやreal-time qPCRで発現の確認を行っている。

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4件)

① Nakanishi G, Fujii K, Asagoe K, Tanaka T, Iwatsuki K. Erythema multiforme-like contact reaction due to liquid-formulated 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide: involvement of cytotoxic T-lymphocyte reaction. Clin Exp Dermatol. vol. 39. 2009. 732-736. 査読あり

② 藤井一恭、岩月啓氏. 【T細胞腫瘍】 皮膚T細胞リンパ腫 菌状息肉症/Sezary症候群と原発性皮膚CD30陽性リンパ増殖症. 血液・腫瘍科. 58巻. 2009. 686-693. 査読無

[学会発表] (計20件)

① 平井陽至. 心筋浸潤を合併した重症型種痘様水疱症:副腎皮質ステロイドとVP16間歇療法による治療例. 第20回EBウイルス研究会. 2010. 3. 6. 東京

- ② K Fujii. Valproic acid, an HDAC inhibitor, diminishes lymphoproliferation of EB-virus infected NK cells via G1 cell cycle arrest. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2009/12/5-6. Fukuoka
- ③ 藤井一恭. 皮膚T細胞リンパ腫における新しい治療戦略 HDAC阻害薬. 第25回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会. 2009/5/23. 岡山
- ④ Fujii K. Valproic acid, an HDAC inhibitor induces G1-cell cycle arrest in natural killer (NK) cell lines established from patients with chronic active EB virus infection. ISCL annual meeting, 2009. 2009/3/5. San Francisco, CA
- ⑤ 藤井一恭. Anti-proliferative effect of valproic acid against natural killer-cell lymphoma cell lines. 第67回日本癌学会学術総会. 2008/10/28. 名古屋
- ⑥ Fujii K. Possibilities of valproic acid as a therapeutic tool for natural killer-cell neoplasms. Lymphoma Expert meeting. 2008/5/15. Kyoto
- ⑦ Fujii K. Possibilities of valproic acid as a therapeutic tool for natural killer-cell neoplasms. International Investigative Dermatology 2008. 2008/5/14-17. Kyoto

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 一恭 (FUJII KAZUYASU)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：70452571