

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592355

研究課題名(和文) 前立腺癌に対するユビキチン化蛋白蓄積を介した新規治療法の開発

研究課題名(英文) An investigation of novel treatment of prostate cancer through ubiquitinated protein accumulation

研究代表者

佐藤 全伯 (Sato, Akinori)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・助教)

研究者番号：00296675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：細胞内に生じた異常蛋白はプロテアソームによって分解される。私は、vorinostatやritonavirが細胞内に異常蛋白を増加させ、そこにプロテアソーム阻害薬bortezomibを併用することで、それらの分解を妨げ、前立腺癌細胞を死滅できると仮定した。予測通り、これらの併用療法は、ユビキチン化蛋白と呼ばれる異常蛋白を細胞内に蓄積し、前立腺癌細胞を死滅させた。

研究成果の概要(英文)：Unfolded proteins are normally repaired by the proteasome. I postulated that vorinostat or ritonavir increased unfolded proteins and bortezomib in combination would inhibit their degradation, leading to cell death. As expected, the combination therapies caused ubiquitinated proteins to accumulate in the cell and killed prostate cancer cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、泌尿器科学

キーワード：ユビキチン化蛋白蓄積 前立腺癌

1. 研究開始当初の背景

進行した泌尿器科癌に対する根治的な治療は未だ存在していない。新しい発想による治療法の開発が急務である。私は、本研究開始前より、泌尿器科癌に対する新規治療開発を目指して、特定のシグナル伝達機構にとられないアプローチを試みてきた。当初、腎細胞癌に対して、プロテアーゼ阻害薬である ritonavir と histone deacetylase (HDAC) 阻害薬である vorinostat (SAHA) の併用が効果的に細胞増殖を抑制することを明らかにした (Sato et al. Urology 2010)。この研究の流れの中で、いかに効率的に細胞内にユビキチン化蛋白を蓄積して癌細胞を死滅させることが出来るか、に研究の焦点が絞られた。一般に、細胞内に生じた異常蛋白は、まず分子シャペロンによってその修復が試みられるが、修復がうまく行かなかった場合は、目印としてユビキチンを付加され (ユビキチン化)、プロテアソームで分解される。Vorinostat は HDAC 6 の抑制を介して分子シャペロンである heat shock protein (HSP) 90 をアセチル化し、その機能を抑制することで異常蛋白の修復を妨げ、細胞内のユビキチン化蛋白を増加させる。このユビキチン化蛋白を分解するメカニズムであるプロテアソームをプロテアソーム阻害薬 bortezomib を用いて阻害すれば、分解されないユビキチン化蛋白が細胞内に蓄積されると仮定した。そして、このユビキチン化蛋白には細胞毒性があるため細胞増殖が抑制される、と考えた訳である。

2. 研究の目的

本研究では、第一に前立腺癌細胞において、vorinostat と bortezomib の併用効果、およびそのメカニズムについて検討し、ユビキチン化蛋白蓄積を介した新規治療を開発することを目的とする。さらに他の HDAC 阻害薬や小胞体ストレスを誘導する薬剤と bortezomib を組み合わせることで、さらなる

ユビキチン化蛋白蓄積を介した治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) Vorinostat と bortezomib の併用が前立腺癌においてユビキチン化蛋白を蓄積し、細胞増殖を抑制するか。

Vorinostat と bortezomib 投与による細胞増殖抑制効果の検討

前立腺癌培養株 (LNCaP, PC-3, DU145) に vorinostat 及び bortezomib を投与し (以下、併用療法) 増殖抑制効果を MTS assay にて検討する。Chou と Talalay らの方法で、combination index を算出、相乗性を検討する。次いで colony formation assay を行い、コロニー形成阻害能について検討する。

Vorinostat と bortezomib 投与による蛋白ユビキチン化、小胞体ストレス誘導、ヒストンアセチル化の検討

併用療法を施行し、蛋白を抽出する。Western blot 法によりユビキチン化蛋白蓄積、小胞体ストレス誘導、ヒストンアセチル化などについて検討する。

Vorinostat と bortezomib 投与によるアポトーシス誘導の検討

併用療法を施行し、annexin V 陽性細胞をフローサイトメトリーにて検出する。またアポトーシス関連蛋白の発現を検討する。

細胞周期および細胞周期関連蛋白発現の変化に関する解析

併用療法を施行し、細胞周期の変化をフローサイトメトリーにて解析する。また western blot 法にて細胞周期関連蛋白の発現の変化を検討し、併用療法が細胞周期に変化を及ぼす原因を追究する。

In vivo における併用療法の検討

ヌードマウスを用い、前立腺癌皮下腫瘍モデルを作成する。マウスをコントロール群、vorinostat 投与群、bortezomib 投与群、併用療法群に分け、腹腔内投与による治療を行い、治療効果を検討する。

アンドロゲンレセプターの発現が bortezomib の感受性に及ぼす影響についての検討

LNCaP において、アンドロゲンレセプターを small interfering RNA (siRNA) を用いてノックダウンし、bortezomib に対する感受性の変化を検討する。

(2) 他の HDAC 阻害薬や小胞体ストレスを誘導する薬剤と bortezomib の併用もユビキチン化蛋白を蓄積し、前立腺癌細胞増殖抑制に効果があるか。

Panobinostat など他の HDAC 阻害薬や小胞体ストレスを誘導する ritonavir と bortezomib の併用も効果的にユビキチン化蛋白を蓄積することが予想される。そこで Panobinostat 或いは ritonavir と bortezomib の併用療法について(1)と同様の手法で検討し、より効果的なユビキチン化蛋白蓄積を介した新規治療法開発を目指す。

4. 研究成果

まず、vorinostat と bortezomib の併用療法が、ユビキチン化蛋白を蓄積し、*in vitro*、*in vivo* において前立腺癌に有効であることが示された。

Vorinostat 及び bortezomib の併用は前立腺癌細胞増殖を効果的に抑制し、その効果は相乗的であることが Chou-Talalay method による isobologram 解析で明らかとなった (combination indexes <1)。併用療法はコロニー形成も有意に阻害した。さらにヌードマウスを用いた PC-3 皮下腫瘍モデルでの検討では、有意に腫瘍の増大を抑制した。また

annexin-V assay, アポトーシス関連蛋白の検討から、併用療法はアポトーシスを誘導することが示された。更に、細胞周期解析では、併用療法により劇的な sub-G1 fraction の増加が確認された。この際、cyclin D1, CDK4 といった細胞周期関連蛋白の発現の抑制が見られた。併用療法は相乗的に小胞体ストレスを誘導し、ユビキチン化蛋白を蓄積することが示された。大変興味深いことには、併用療法はヒストンのアセチル化も相乗的に促進し、これに伴い p21 の発現が増加した。Vorinostat はヒストンをアセチル化するもののユビキチン化蛋白を蓄積せず、一方で bortezomib はユビキチン化蛋白を蓄積しヒストンをアセチル化したことから、ヒストンアセチル化はユビキチン化蛋白蓄積の2次的な現象であることも初めて示された。更に siRNA を用いた検討により、アンドロゲンレセプターの発現がボルテゾミブの作用を減弱すること、vorinostat がアンドロゲンレセプターの発現を抑制することも見出された。

HIV protease inhibitor である ritonavir による小胞体ストレス誘導下における bortezomib の併用効果についての検討では両者の併用は前立腺癌細胞増殖を効果的に抑制し、その効果は同様に相乗的であることが isobologram 解析で明らかとなった。また annexin-V assay, アポトーシス関連蛋白の検討から、併用療法はアポトーシスを誘導することが示された。更に、細胞周期解析では、併用療法により劇的な sub-G1 fraction の増加が確認された。Western blot 法による検討では、併用療法は相乗的に小胞体ストレスを誘導し、ユビキチン化蛋白を蓄積することが示された。さらに併用療法は、ヒストンをアセチル化することも確認された。この際、histone acetyltransferase 作用を有する creb2 の発現も同時に増加しており、ヒストンアセチル化の重要なメカニズムの一つと考えられた。

他に、vorinostat に比して低濃度で作用する panobinostat と bortezomib、ritonavir と panobinostat の併用についても検討を行ったが、細胞増殖抑制についての相乗性は確認できず、HDAC 阻害の選択性が重要と考えられた。また、各種薬剤の組み合わせにおいて、SUMO 化に関する検討も行ったが、確認されなかった。

本研究では、前立腺癌に対してユビキチン化蛋白蓄積を介した新規治療法を開発することを目的としてきた。Vorinostat と bortezomib および ritonavir と bortezomib の併用が、最も効率的に小胞体ストレスを誘導し、ユビキチン化蛋白を蓄積した。特に vorinostat と bortezomib の併用では、in vivo における効果も確認されたのみならず、cyclin D1/CDK4 complex の発現と機能の抑制、またアンドロゲンレセプターの発現が bortezomib の効果を抑制するなどの、多くの新しい知見が得られた。Vorinostat と bortezomib の併用は、すでに多発性骨髄腫患者で臨床応用され、薬物動態パラメーターに関するデータや副作用についても明らかにされており、本併用療法の難治性前立腺癌患者に対する臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sato, A., Asano, T., Ito, K. and Asano, T. (2012): Vorinostat and Bortezomib Synergistically Cause Ubiquitinated Protein Accumulation in Prostate Cancer Cells. *J. Urol.* 188(6), 2410-2418.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Sato, A. (2013): Might cancer cells be killed by something accumulating in them? : The idea of treating urological malignancies by causing the accumulation of ubiquitinated proteins. Heinrich Heine University

Lecture at Düsseldorf, Germany. (招待講演)

2. 佐藤全伯、浅野貴子、伊藤敬一、浅野友彦. (2013): 前立腺癌に対する vorinostat と bortezomib を用いた併用療法の開発 : ユビキチン化蛋白蓄積を介する新たな治療戦略. 第 22 回泌尿器科分子・細胞研究会、高知.
3. 佐藤全伯、浅野貴子、伊藤敬一、浅野友彦. (2012): 前立腺癌に対する vorinostat と bortezomib による新規治療. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌.
4. Sato, A., Asano, T., Ito, K. and Asano, T. (2012): Ritonavir interacts with bortezomib synergistically to enhance endoplasmic reticulum stress in prostate cancer cells. The 107th American Urological Association Annual Meeting at Atlanta, USA.
5. Sato, A. (2012): What wandering along the Rhein brought me: The idea of treating urological malignancies by causing the accumulation of ubiquitinated proteins. The 100th Japanese Urological Association Annual Meeting at Yokohama, Japan. (招待講演)
6. 佐藤全伯、浅野貴子、伊藤敬一、浅野友彦. (2012): 前立腺癌に対する新規治療の開発 : ユビキチン化蛋白蓄積による戦略. 第 100 回日本泌尿器科学会総会、横浜.
7. Sato, A., Asano, T., Ito, K. and Asano, T. (2012): Vorinostat interacts with bortezomib to enhance protein ubiquitination synergistically in prostate cancer cells. The 27th European Association of Urology Congress at Paris, France.

〔その他〕
ホームページ等
<http://researchmap.jp/zenpaku/>

6．研究組織

(1)研究代表者
佐藤 全伯 (SATO AKINORI)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・助教
研究者番号：00296675