

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 25日現在

機関番号：17102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791660
 研究課題名（和文）ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 SAHA のオートファジー細胞死誘導機構の解析
 研究課題名（英文） The mechanisms of induction of autophagic cell death by histone deacetylase inhibitor SAHA
 研究代表者
 岡田貴充（OKADA TAKAMITSU）
 九州大学・大学病院・助教
 研究者番号：70525550

研究成果の概要（和文）：

多剤耐性骨肉腫細胞株に SAHA を投与し電子顕微鏡にて細胞内オルガネラを観察すると、SAHA は autophagic cell death を誘導させる際には、細胞内に autophagosome と呼ばれる器官の形成を促進させることが確認できた。Autophagosome を形成する際に発現上昇を認めるタンパクとして LC3(Microtubule-associated protein 1 light chain)-I、LC3-II、Beclin1 が知られているが、SAHA は MNNG/ADR 細胞株において LC-3、Beclin1 濃度依存的な発現の上昇を認めた。以上のことから SAHA は多剤耐性骨肉腫細胞株において細胞死を誘導する際、autophagy を誘導することを示す事ができた。続いて細胞周期の検討を行ったところ、SAHA は apoptosis を誘導する骨肉腫細胞株 MNNG においては Sub-G1 分画を増加させるが、autophagic cell death を誘導する MNNG/ADR においては G2/M 分画の上昇を認めた。Autophagy を誘導する際に細胞周期を G2/M 期に誘導することが分かったが、そのタイミングに付き検討を行ったところ Beclin1 等のタンパク誘導時期と G2/M 導入時期がほぼ同時期であることが確認できた。さらにこれらの関連について検討中である。

研究成果の概要（英文）：

In electron microscope SAHA induced autophagosome in multidrug-resistant osteosarcoma cell. SAHA also induced autophagy related protein Beclin1 and LC3-I, II in dose dependent manner. These facts demonstrated that SAHA induce autophagic cell death in multidrug-resistant osteosarcoma cell. Next, we investigated cell cycle population in osteosarcoma parental cell and multidrug-resistant cell after SAHA treatment. SAHA increased Sub-G1 fraction in parental cell, but G2/M fraction in multidrug-resistant cell. Therefore, we investigated the relationship between autophagy and G2/M phase. As a result, we got new fact that SAHA induce autophagy and G2/M phase at the same time.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：autophagic cell death

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫、Ewing 肉腫は若年者の骨・軟部腫瘍であり、小児がんの約 3%を占める再発・遠隔転移傾向の強い高悪性度の腫瘍である。治療法の進歩により 5 年生存率が約 60%に改善したが、再発例の 5 年生存率は 20%前後と依然として著しく不良で新たな治療法の開発が必要である。再発例に対しては、外科療法にセカンドラインケモセラピーを追加しても予後は改善できないとの報告があり、再発腫瘍は既存の抗癌剤に耐性を獲得していると考えられる。骨肉腫・Ewing 肉腫に対する抗癌剤では、Doxorubicin が key drug だが、Doxorubicin は P-glycoprotein (P-gp)、MRP1 といわれる多剤耐性因子の一つである Efflux pump の基質となるため、骨肉腫・Ewing 肉腫の多剤耐性機序には P-gp、MRP1 の関与が示唆される。Ewing 肉腫では 11 番/22 番染色体の間で染色体相互転座があり、その結果 EWS-Flil1 融合遺伝子が形成される。これが異常な転写因子となり細胞周期抑制因子である p21^{cip1} および p27^{kip1} の発現を抑制することを見いだしてきた (Tanaka et al. J Clin Invest. 1997, Matsumoto et al. Br J Cancer 2001, Nakatani et al. J Biol Chem. 2003, Matsunobu et al. Clin Cancer Res. 2004)。この EWS-Flil1 により発現抑制される p21^{cip1} を標的とした新規分子標的治療薬にヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 (HDACIs) がある。HDACIs は新規抗癌剤として有望で、我々はその一つの FK228 が Ewing 肉腫に有効であることを報告した (Sakimura et al. Int J Cancer 2005)。そこで私は P-gp/MRP1 を発現する多剤耐性 Ewing 肉腫細胞株を樹立し FK228 の抗腫瘍効果を調べたところ、HDACIs の中でも FK228 が属す群は P-gp、MRP1 の基質となり、これらを発現する腫瘍には交叉耐性を有すことを示した (Okada et al. Int J

Cancer 2006)。次に私は他の category の suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) がこれら多剤耐性 Ewing 肉腫細胞に抗腫瘍効果を示すことを明らかにし、平成 21・22 年度科学研究費助成により、SAHA の多剤耐性 Ewing 肉腫マウスモデルにおける有効性を明らかにした。今回 Ewing 肉腫に加え、骨肉腫に対する SAHA の抗腫瘍効果の有無を検討した結果、SAHA は骨肉腫細胞株 MNNG/S において良好な抗腫瘍効果を発揮できることを確認した。この骨肉腫細胞株から樹立した多剤耐性骨肉腫細胞である MNNG/ADR は P-gp、MRP1 を発現することにより様々な薬剤に対して耐性を示しているが、興味深いことにこの MNNG/ADR は X 線に対しても強い耐性を認め apoptosis 誘導に非常に強い抵抗性を示していることが明らかになった。この apoptosis 抵抗性を示す MNNG/ADR に対する SAHA の抗腫瘍効果を検討してみたところ、非常に驚いたことに「SAHA は親株 MNNG/S に対するのと全く同じ濃度で同様の抗腫瘍効果を示す」ことが判明したのである。この事実を説明できる仮説として「MNNG/ADR に対しては apoptosis と異なる pathway を利用して抗腫瘍効果を発揮しているのでは」と考えた。Apoptosis と異なる細胞死として最近特に注目されているものでは autophagic cell death という現象がある。もともと autophagy という現象はユビキチン・プロテアソーム系と並ぶ二大細胞内蛋白分解系の一つで細胞内のオルガネラ等の器官をまるごと autophagosome といわれる vesicle でつつみこみ分解してしまう現象である。Autophagic cell death はこの autophagy を利用した細胞死で programmed cell death type 2 に分類され近年特に注目されている。共同研究者は私の指導の元、「SAHA がこの autophagic cell death を軟骨肉腫細胞において誘導できる」ことを世界に

先駆けて証明している (Yamamoto et al. Anticancer Research 2008)。最近、さらなる基礎実験において「SAHA は薬剤感受性株には apoptosis を誘導するが、apoptosis 抵抗性を持つ多剤耐性株には autophagic cell death という全く異なる細胞死を誘導する」という非常に興味深いデータを前回の科研費申請による研究で証明した。この事実は「SAHA は、悪性腫瘍細胞が持つ“死への耐性”により、誘導する細胞死を使い分けている」可能性を示唆する。悪性腫瘍に対する治療は一般的に apoptosis を介するため、これら治療に抵抗性を示すものは apoptosis 抵抗性を獲得している可能性がある。これらのデータにより、SAHA は既存の治療で無効とされている悪性腫瘍に対し画期的な薬剤となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SAHA がいかなるメカニズムで autophagic cell death を誘導するのかを検討することである。

3. 研究の方法

SAHA を我々が樹立した骨肉腫細胞株とそれからさらに樹立した多剤耐性骨肉腫細胞株に投与し、autophagy 関連タンパクと細胞周期 G2/M 誘導の時期、関連に付き検討した。

要旨

(A) SAHA による autophagic cell death 誘導メカニズムの解析 SAHA による autophagy 関連タンパク質の発現量の変化を調査する。HDACIs はヒストンを脱アセチル化することにより、転写レベルでタンパクの発現量を調整する薬剤である。また autophagy が生じる際に発現量が上昇するタンパクがあり、SAHA 投与後のこれら autophagy 関連タンパク質の発現量を経時的に調査する。

(B) SAHA 投与後の細胞周期の解析

申請者は最近の基礎実験で、SAHA が

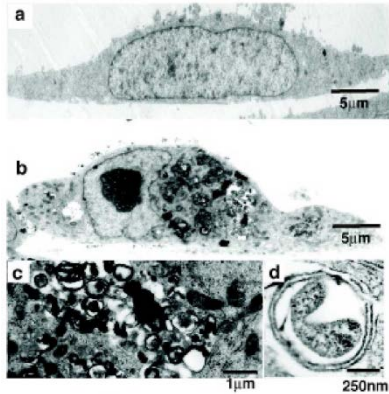
apoptosis を誘導する際は細胞周期で Sub-G1 分画を上昇させ、autophagic cell death を誘導する際は G2/M 分画を上昇させる現象を捉えている。この誘導する細胞周期分画の違いから、SAHA の autophagic cell death 誘導メカニズムを解析する。

(C) 多剤耐性骨肉腫細胞動物モデルの作製 平成 21 年度科学研究費助成により、多剤耐性 Ewing 肉腫のマウスモデルを作製し、SAHA の抗腫瘍効果を vivo で検討することができた。そこで今回、同様の手技で多剤耐性骨肉腫細胞動物モデルを作製し SAHA の多剤耐性骨肉腫動物モデルへの抗腫瘍効果を検討したい。

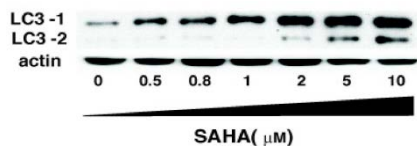
4. 研究成果

SAHA は骨肉腫細胞株では Sub-G1 fraction を増加させ apoptosis を誘導することにより細胞死へと導いたが、多剤耐性骨肉腫細胞株においては G2/M fraction を増加させ autophagic cell death を誘導していた。Autophagy 関連タンパクの発現時期と G2/M 誘導時期はほぼ同時期であることが判明した。新たな多剤耐性骨肉腫細胞株、多剤耐性 Ewing 肉腫細胞株の樹立は随時施行しており、2つの細胞株で樹立が完了した。成功した細胞株においてはマウスに移植し動物モデルの作製を継続して行う予定である。

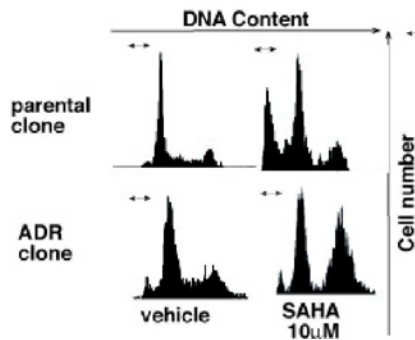
[Fig. 1] SAHA を投与した多剤耐性骨肉腫細胞株の電子顕微鏡写真 (autophagosome の形成)



[Fig. 2] SAHA 投与後の Flowcytometry 薬剤感受性株 (parental clone) と多剤耐性株 (ADR) に SAHA10 μM 投与したところ、薬剤感受性株では Sub-G1 fraction が、他剤耐性株では G2/M fraction が増加した。



[Fig. 3] SAHA 投与後の Western blotting: 多剤耐性株 (ADR) に様々な濃度の SAHA を投与



したところ濃度依存性に autophagy 誘導蛋白 LC3-1, 2 の発現が誘導された。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 貴充 (OKADA TAKAMITSU)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 70525550

(2) 研究分担者 なし