

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591406

研究課題名(和文) 難治性リンパ系腫瘍におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に対する耐性化機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of resistance against histone deacetylase inhibitors in refractory lymphoid malignancies

研究代表者

飯田 真介 (IIDA, SHINSUKE)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50295614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬(HDACI)は、リンパ腫や骨髄腫に対して有効な薬剤である。HDACIに対する耐性化機序を明らかにするために、複数のvorinostat耐性株を樹立解析し、次のことを明らかにした。耐性株は汎HDAC活性の低下を認め、特にHDAC3発現低下が特徴的であった。shRNAによるHDAC3の発現抑制により親株のHDACI感受性の低下を認めた。HDAC3遺伝子の変異やプロモーターメチル化は認めなかった。すなわちHDACI耐性化にHDAC3の発現低下が関与していることを見いだした。HDAC3発現低下機序については、さらなる検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：Histone deacetylase inhibitor (HDACI) has been demonstrated to be effective for the patients with cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) and multiple myeloma (MM). To elucidate the mechanisms of acquired resistance against HDACI in these tumors, we established various vorinostat-resistant cell lines. Comparison between these resistant and their parental cell lines has shown the following differences. Pan-HDAC activity was generally low in HDACI-resistant cells, but reduced HDAC3 activity was commonly shared in HDACI-resistant cell lines. Reduced expression of HDAC3 by shRNA decreases the sensitivity to HDACI, whereas that of other HDACs do not. Neither genetic mutation nor promoter methylation exists in HDAC3 gene in HDACI-resistant cells. Thus, reduced expression of HDAC3 is responsible for the acquired resistance against HDACI in part, although the underlying mechanism remains to be clarified.

研究分野：血液・腫瘍学

キーワード：医療 がん 薬剤耐性 リンパ腫 骨髄腫 HDAC阻害剤

1. 研究開始当初の背景

ヒストンのアセチル化修飾は、二つの相反する機能酵素であるヒストンアセチル化転移酵素とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) により制御されている。ヒストンのアセチル化と脱アセチル化のバランスの異常が、がんの発症および増殖につながると考えられ、特に HDAC の発現異常が大腸がんや肺がんなどを中心に報告され始めてきている。造血器腫瘍でも、T 細胞リンパ腫で HDAC の活性が高いことが報告されている。その HDAC 発現異常を標的とする HDAC 阻害剤は、皮膚 T 細胞性リンパ腫に薬事承認され、他の造血器腫瘍においても治験が進行中である。さらに、がん細胞における HDAC 発現異常の意義として、ヒストンだけでなく、ヒストン以外の細胞内タンパク (非ヒストンタンパク) のアセチル化の抑制により、腫瘍の増殖・浸潤に有利な環境を作り出されていることも、HDAC 阻害剤を使った研究から明らかになっている。

我々の研究室では、これまで難治性リンパ系腫瘍である (成熟 T 細胞性リンパ腫および多発性骨髄腫) の分子標的療法の作用機序と、その耐性化機構を解明する研究を続けており、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブ (BTZ) の作用機序と耐性メカニズムに関して報告してきた。HDAC 阻害剤は皮膚 T 細胞性リンパ腫に薬事承認され、多発性骨髄腫では SAHA (vorinostat) と LBH589 (panobinostat) の二つの HDAC 阻害剤の治験が進行しており、BTZ 耐性患者にも BTZ との併用で有効性を示すことから、BTZ との併用療法として使用される分子標的薬として期待されている。上記 2 種の HDAC 阻害剤は汎 HDAC 阻害剤であるために、HDAC 全体の阻害がどのような作用機序で抗腫瘍効果をもたらすかを解明するためには、多

岐にわたる検証が必要である。

2. 研究の目的

上記の研究背景をもとに、我々は、難治性リンパ系腫瘍における HDAC 阻害剤 (SAHA) 耐性の細胞株 (皮膚 T 細胞性リンパ腫及び多発性骨髄腫) を樹立し、その親株との比較により耐性機序を解明することで、HDAC 阻害剤がおよぼす多岐にわたる作用の中でも重要な作用機序を同定することを試みる。

多発性骨髄腫、皮膚 T 細胞性リンパ腫は、難治性の成熟リンパ系腫瘍であるが、これらの腫瘍に対してヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (histone deacetylase inhibitor: HDACI) の一部が臨床導入されつつある。したがって本薬剤の耐性機構の解明とその克服戦略の確立は重要な課題となる。また感受性あるいは耐性化因子を同定できれば、将来の個別化治療が可能となる。本研究により、耐性化機構及び HDACI の作用機序を明らかにし、さらに薬剤の感受性と耐性を予測しうる有用なバイオマーカーの開発、耐性を克服する薬剤の同定を目標とする。具体的には、我々が樹立した HDACI 耐性細胞株と感受性親株間の HDAC 活性、遺伝子発現、ヒストン修飾、非ヒストン蛋白のアセチル化状態の差異を明らかにする。次に、体内で耐性化した腫瘍検体で認められる耐性化機構を解析するとともに、将来的には耐性克服を目指した薬剤・化合物の同定へと発展させることを目標とする。

3. 研究の方法

HDACI 耐性株及びその親株の比較検討による耐性メカニズムの解明を通して、HDACI が及ぼす多岐にわたる作用の中での重要な作用機序の解明および、難治性リンパ系腫瘍における HDAC 発現異常の

生物学的意義の解明も併せて解明する。そのため、まず以下の2点を重点項目にあげて研究を計画した。

- HDAC1 耐性細胞株と感受性株間のHDAC 発現及び活性変化の検討
- 耐性株と感受性株間の遺伝子発現変化。主にヒストン修飾による遺伝子発現変化の観点から。

4. 研究成果

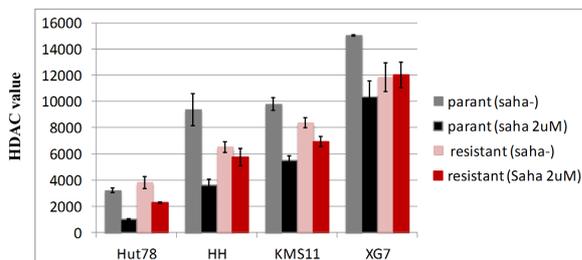
本研究は、難治性リンパ系腫瘍における HDAC1 (SAHA) 耐性の細胞株 (皮膚 T 細胞性リンパ腫及び多発性骨髄腫) を樹立し、その親株との比較により耐性機序を解明することが目的である。これまでのところ、耐性株と親株を比較することで、以下のことを明らかにした。

(1) SAHA (vorinostat) 耐性の細胞株は、他の汎 HDAC1 (panobinostat) に対しても、同様に耐性を示すこと

SAHA 耐性株は、他の汎 HDAC1 である panobinostat に対しても同様な薬剤耐性を示した。そのため、本耐性株は SAHA に対して特異的な薬剤耐性株ではなく、汎 HDAC1 に対して耐性を示す細胞株と位置付けられた。

(2) HDAC1 耐性細胞株は、HDAC 全体の活性が低下しており、また HDAC1 による HDAC 活性阻害に対して低感受性であること

HDAC1 耐性株と親株の比較では、定常状態における HDAC 活性は、耐性株4株中の3株で低下していた。また、HDAC 阻害剤投与下において、親株と比べて耐性株



では HDAC 活性の抑制は減弱されていた。

(3) HDAC1 耐性細胞株の各 HDAC の遺伝子の主なエクソン領域を調べた結果、変異は見当たらないこと

HDAC1 と HDAC の結合部位における遺伝子変異の有無や、HDAC 変異によるある特定の HDAC の機能変化の有無を探索する目的にて、親株と HDAC1 耐性株における class 1 HDAC のエクソン領域の遺伝子配列決定を行った。親株と耐性株を比較したが、耐性株で新たに獲得された遺伝子変異は認められず、両株で共通して認められた遺伝子多型のみ同定された。(下表参照)。

Mutations screening for HDAC2,3,4 and 8 (exons only)

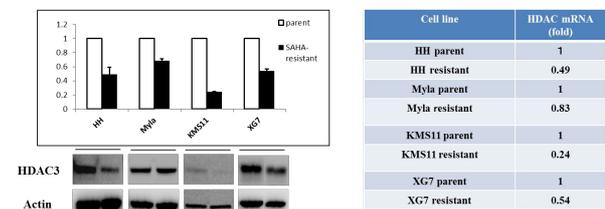
Parent cells:5 SAHA-resistant cells: 5

	Exon number	position	nt change	aa change	Incidence	Conclusions
HDAC2	15		No	No		no mutations
HDAC3	15	Exon 3	CAA>CAG	Gln>Gln	10/10	polymorphism
HDAC4	47	Exon3	CTG>CTT	Leu>Leu	9/10	polymorphism
		Exon16	ATC>ATT	Ile>Ile	10/10	polymorphism
HDAC8	12		No	No		No mutations

(4) HDAC1 耐性株においては、HDAC3 の発現レベルが共通して低下していること

各 HDAC の発現量を親株と耐性株で比較してところ、4 細胞株中、3 細胞株において共通して HDAC3 の発現量が遺伝子およびタンパクレベルにおいて、耐性株で低下していた。

HDAC3 mRNA and protein expressions in parent and HDACi-resistant cells

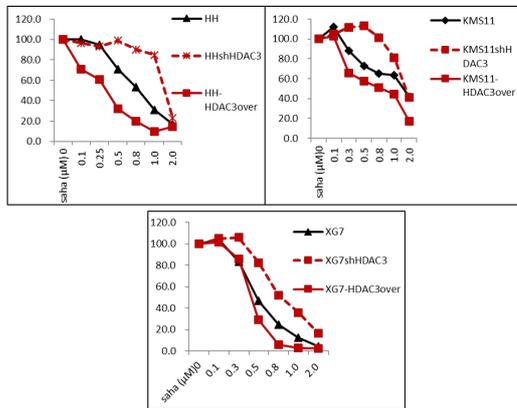


(5) HDAC3 発現の抑制により、HDAC1 の感受性が低下する

HDAC3 発現レベルと HDAC1 の感受性の関係を調べるために、通常の細胞株において各種 HDAC の発現を shRNA により抑

制し、その安定株を樹立した。HDAC 抑制細胞とコントロール細胞での HDAC 阻害剤の感受性の相違を観察したところ、下図のように HDAC3 の発現抑制細胞株では、HDAC1 の感受性が有意に低下した。逆に親株に HDAC3 を過剰発現させたところ、コントロールと比較して HDAC1 の感受性亢進が認められた。一方、他の HDAC (HDAC2, HDAC8) の発現を阻害した場合には、HDAC1 感受性には変化がなかった。つまり、HDAC1 の作用機序には、特定の HDAC が関与し、中でも HDAC3 の発現レベルの重要性が示唆された。

Growth inhibition of HDAC3 knock downed or overexpressed cells in HDACi treatment



(6) 親株と HDAC1 耐性株の網羅的遺伝子発現解析データの比較

耐性株は親株とくらべて、HDAC3 の発現レベルの低下がみられているが、さらに、いくつかの興味深い遺伝子の大きな発現変異が見られた。これらには、カスパーゼ依存性のアポトーシス誘導因子および、骨髄系細胞の分化に係る転写因子などが含まれている。興味深い遺伝子として *HOXB6*, *FBOX2*, *BID* などが挙げられる。

(7) 耐性株における HDAC3 発現レベルの低下は、プロモータ領域のメチル化に依存しない機序の可能性があること

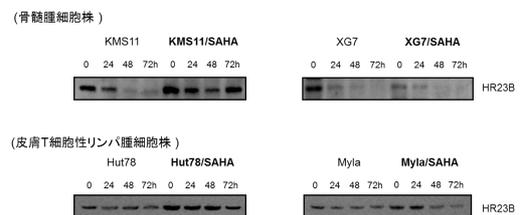
HDAC3 のプロモータ領域内でのメチル化/非メチル化領域を想定し、メチル化と

非メチル化部位に特異的なプライマーを 3 ペア作成し、耐性株の DNA にバイサルファイト処理を行い、メチル化特異的 PCR を実施したが、メチル化特異的プライマーからの増幅は認められなかった。そのため、耐性株における HDAC3 の発現低下はプロモータのメチル化以外の機序の可能性はあるが、今回の検索部位以外の他領域でのメチル化の可能性は否定できず、さらなる検討が必要である。

(8) HR23B の発現量と HDAC1 感受性の検討

HDAC1 の感受性にかかわる因子として、HR23B の高発現が他の研究グループにより報告されている。しかし、我々の耐性株と親株間の比較では、HR23B の発現に有意な差は認められなかった。

HDAC阻害剤耐性株におけるHR23B発現



以上の結果から、HDAC1 に対する共通した耐性化機構として一部の HDAC 特に HDAC3 の発現抑制が存在することが明らかとなった。この HDAC3 の発現低下は mRNA レベルで認められた。しかし、これまでの結果からは HDAC3 の発現低下に結びついている遺伝子異常やエピゲノムの変化には至っておらず現在も検討を継続している。

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 0 件)
該当なし

〔学会発表〕(計 1 件)

- 1) Ding J, Li M, Narita T, Masaki A, Mori F, Ito A, Kusumoto S, Ishida T, Komatsu H, Shiotsu Y, Niimi A, Iida S. Reduced expression of HDAC3 contributes to the resistance against HDAC inhibitor, vorinostat (SAHA) in mature lymphoid malignancies. 54th. Annual Meeting of American Society of Hematology, Dec. 8, 2012. Atlanta, (USA)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ncu-ketsuekishuyo.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 真介 (SHINSUKE IIDA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50295614

(2) 研究分担者

李 政樹 (MASAKI RI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00567539