

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591626

研究課題名(和文) HDAC阻害剤の併用療法のターゲットとしてのHSP70の可能性の探究

研究課題名(英文) The possibility of HSP70 as a therapeutic target in combination with HDACi

研究代表者

藤井 一恭 (Fujii, Kazuyasu)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：70452571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまずHSP72高発現Jurkat細胞株を樹立し、HSP72の高発現がHDAC阻害剤による細胞増殖抑制やアポトーシス誘導を減弱させること、そのメカニズムとしてカスパーゼ経路が関与していること、bcl-2やXIAPの発現が亢進していることを明らかにした。次にHSP72高発現株であるHut78細胞を用いてHSP72の発現抑制株を作成し、HDAC阻害剤に対する感受性が亢進することを明らかにした。さらにHSP70阻害作用のあるQuercetinを併用したところ、Hut78細胞に対するHDAC阻害剤の細胞増殖抑制効果とアポトーシス誘導効果が増強した。

研究成果の概要(英文)：Using proteomic analysis of lymphoid cell lines, we identified HSP72, an inducible isoform of HSP70 family, was increased in histone deacetylase inhibitor (HDACi)-resistant cell line group. However, the functional role of HSP72 on HDACi-resistance had been largely unknown. In this study, we first established HSP72 stably transfected Jurkat cells, and we identified that HDACi-induced apoptosis and caspase activities were decreased and that base line expression level of bcl-2 and XIAP were increased in HSP72 overexpressed cells. On the other hand, HSP72 knock down Hut78 cell line was more sensitive for HDACi compared to MOCK cell line. Finally, we identified quercetin, an inhibitor of HSP70, enhanced HDACi-induced suppression of cell proliferation and HDACi-induced apoptosis in Hut78 cells. In conclusion, HSP72 is a possible target for combination therapy of HDACi.

研究分野：皮膚科学

キーワード：HDAC阻害剤 HSP72

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は新たな悪性腫瘍治療のターゲットとして注目され、様々な観点から研究がおこなわれている。米国では既にボリノスタット (SAHA) 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ており、本邦でも 2011 年に皮膚 T 細胞リンパ腫に対する適応で認可された。しかしその効果は患者間で異なり、また同一患者においても効果のある部位と効果のない部位が混在して存在することがある。しかしその分子的背景については不明な点が多く残されていた。

(2) 我々は蛍光標識二次元電気泳動法を用いた定量的プロテオームの手法を開発し (Kondo T, [Fujii K](#), et al. Proteomics 2003) 細胞内のタンパク質の定量的プロテオームを解析することにより細胞の形質を分類することを明らかにした (Seike M, [Fujii K](#), et al. Proteomics 2004, [Fujii K](#), et al. Proteomics 2005) また 42 株のリンパ球系悪性腫瘍の細胞内タンパク質の網羅的解析のデータベースを作成し、リンパ腫の分類に有効であることを証明した ([Fujii K](#), et al. Proteomics 2006) さらにそのデータベースを利用して HSP70 の代表的なアイソフォームである HSP72 がリンパ腫において HDAC 阻害剤の感受性に最も関係していることを示した。

(3) HSP72 は正常組織では種々のストレスにより誘導されるが、定常状態ではほとんど発現していない。一方で多くのがん細胞において HSP72 が高発現していることが知られている。また HDAC 阻害剤による治療により HSP72 が誘導されるという報告 (de Bono JS, et al. Clin Cancer Res 2008) もあることから、HSP72 が HDAC 阻害剤の治療のターゲットとなり得るのではないかと考

えた。

2. 研究の目的

以下の 3 点を本研究の目的としてあげた。

(1) HDAC 阻害剤の感受性に HSP72 の高発現が機能的に関与しているか、関与しているとすればどのようなメカニズムで関与しているか明らかにする。

(2) HSP72 の発現を低下させた場合に HDAC 阻害剤の感受性が亢進するか明らかにする。

(3) HSP70 阻害剤を併用することにより、HDAC 阻害剤の感受性がどのように変化するか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HSP72 を過剰発現させた Jurkat 細胞を作成し、MOCK と比べて HDAC 阻害剤の感受性にどのような影響があるか、細胞増殖、アポトーシス誘導の観点から検討した。さらにアポトーシスに関してカスパーゼ経路などメカニズムについて検討した。

(2) 遺伝子導入の手法を用いて HSP72 の発現を抑制した Hut78 細胞の亜株を作成し、MOCK と比べて HDAC 阻害剤による細胞増殖やアポトーシス誘導にどのような影響があるか検討した。

(3) HSP70 の阻害作用がある Quercetin を用いて SAHA による細胞増殖抑制やアポトーシス誘導にどのような影響があるか検討した。

4. 研究成果

(1) HSP72 過剰発現 Jurkat 細胞では HDAC 阻害剤による増殖抑制効果が低下していた (図 1)

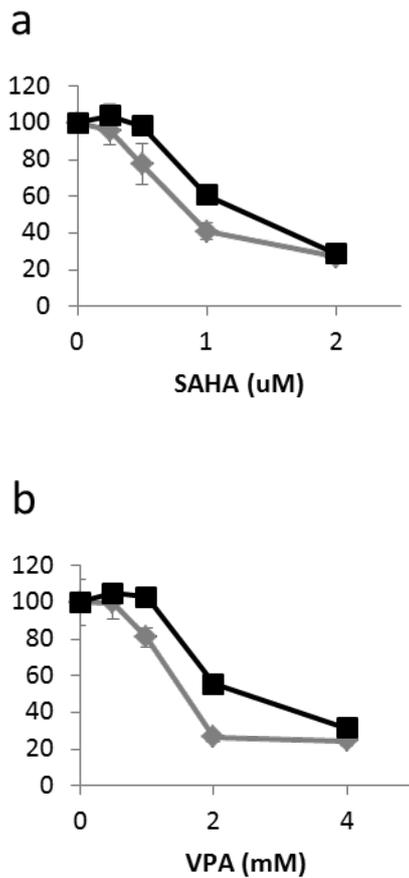


図 1 : HSP72 過剰発現株では SAHA に対しても(a)、VPA に対しても(b)MOCK と比べて細胞増殖抑制効果が低下していた (○ : Jurkat-HSP72、□ : Jurkat-MOCK)。各々の細胞株を指定の濃度で 24 時間培養後に WST-1 を加えて 4 時間培養後吸光度を測定した。

HSP72 過剰発現株では HDAC 阻害剤によるアポトーシス誘導が抑制されていた (図 2)

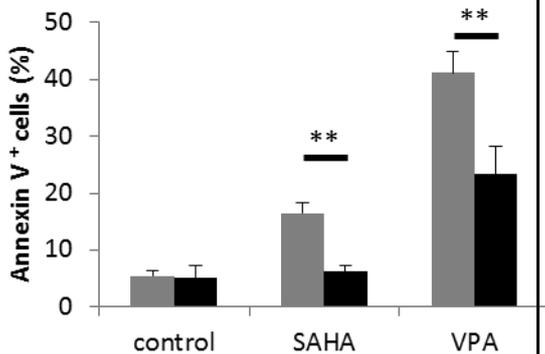


図 2 : 各々の細胞を SAHA (1 uM)、VPA (2 mM) で 24 時間刺激後、Annexine V assay で

アポトーシス誘導細胞の割合を測定した。HSP72 過剰発現株 (○) では MOCK (□) と比べてアポトーシス誘導が抑制されていた。

HSP72 過剰発現株では SAHA や VPA による caspase-3/7 活性、-8 活性、-9 活性の誘導のいずれもが抑制されており、さらに HDAC 阻害剤によるミトコンドリアの膜電位の低下も抑制されていた。

HDAC 過剰発現株では抗アポトーシスに作用する分子である bcl-2 や XIAP の発現が定常状態で亢進している一方、アポトーシスを促進させる分子である t-bid や bad の発現の HDAC 阻害剤による誘導が低下していた。

(2) HSP72 の発現を抑制させた Hut78 細胞株では SAHA 及び VPA に対する感受性が亢進した (図 3)。

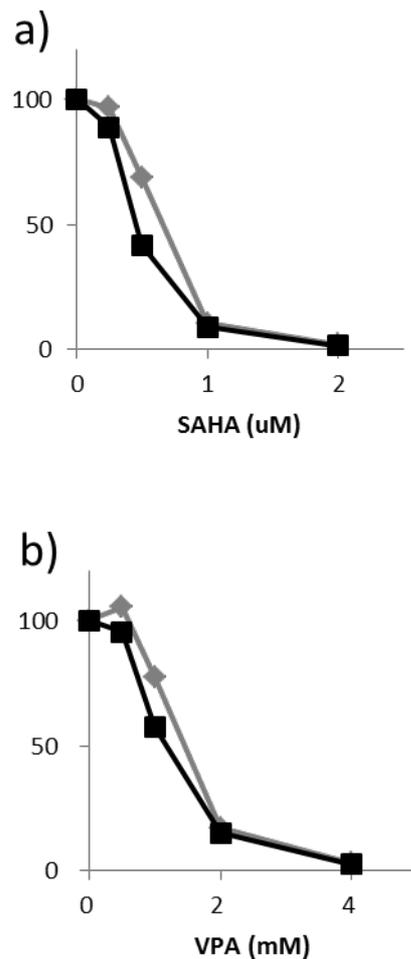


図3 : HSP72 発現抑制株では SAHA に対しても(a)、VPA に対しても(b)、empty vector を導入したコントロール株と比べて細胞増殖抑制効果が低下していた (: Hut78-siHSP72、 :Hut78-sicontrol)。各々の細胞株を指定の濃度で 24 時間培養後に WST-1 を加えて 4 時間培養後吸光度を測定した。

(3) HSP72 高発現株である Hut78 を用いて、HSP70 阻害剤である Quercetin を併用したところ、SAHA による細胞増殖抑制効果が増強した (図 4)。この作用は主にアポトーシスの亢進によるものであった。

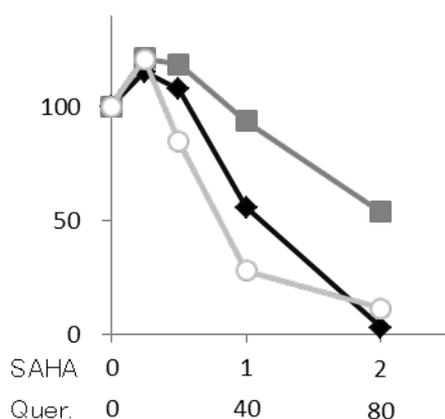


図4 : Hut78 細胞を SAHA 単独 ()、Quercetin 単独 ()、両者の併用 () で 24 時間培養後、WST-1 を加えてさらに 4 時間培養し、吸光度を測定した。40uM 以下の低濃度の Quercetin は単独では増殖抑制効果は示さなかったが、SAHA と併用することで SAHA による細胞増殖抑制効果を増強させた。

以上の結果から HSP70 をターゲットとした治療法が HDAC 阻害剤の併用療法の候補となり得ると考えた。

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 20 件)

Kamiya K, Aoyama Y, Yamaguchi M, Ukida A, Mizuno-Ikeda K, Fujii K, Hamada T, Tokura Y, Iwatsuki K. Clues to diagnosis

for unusual mucosal pemphigus demonstrating undetectable anti-desmoglein 3 serum antibodies by routine tests. *J Dermatol.* 査読有, 2015, in press.

DOI:10.1111/1346-8138.12872.

Jimura N, Matsushita S, Baba N, Kubo H, Takeda K, Fukushige T, Fujii K, Kanekura T. Rare case of Langerhans cell sarcoma with cutaneous manifestation arising on the inguinal region. *J Dermatol.* 44 巻, 査読有, 2014, 1127-1128.

DOI:10.1111/1346-8138.12692.

光井聖子、藤井一恭、大塚文男、岩月啓氏. Erdheim-Chester 症候群の一例. *皮膚科の臨床.* 56 巻, 査読有, 2014, 1524-1525.

Taoka M, Morofuji N, Yamauchi Y, Ojima H, Kubota D, Terukina G, Nobe Y, Nakayama H, Takahashi N, Kosuge T, Isobe T, Kondo T. Global PROTOMAP profiling to search for biomarkers of early-recurrent hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res.* 13 巻, 査読有, 2013, 4847-4858.

DOI:10.1021/pr500262p.

Fujiwara T, Katsuda T, Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi RU, Takeshita F, Kubota D, Kondo T, Ichikawa H, Yoshida A, Kobayashi E, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells. *Stem Cells.* 32 巻, 査読有, 2014, 959-973.

DOI:10.1002/stem.1618.

Kubota D, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Proteomics identified overexpression of SET oncogene product and possible therapeutic utility of protein phosphatase 2A in alveolar soft part sarcoma. *J Proteome Res.* 13 巻, 査読有, 2014, 2250-2261.

DOI:10.1021/pr400929h.

Ito M, Hagiwara M, Mima T, Inoue T, Kato T, Yoneshige A, Nakanishi J, Kondo T, Okada M, Ito A. -Parvin, a pseudopodial constituent, promotes cell motility and is associated with lymph node metastasis of lobular breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 144 巻, 査読有, 2014, 59-69.

DOI:10.1007/s10549-014-2859-0.

Kamiya K, Aoyama Y, Shirafuji Y, Hamada T, Morizane S, Fujii K, Iwatsuki K. A higher correlation of the antibody activities against the calcium-dependent epitopes of desmoglein 3 quantified by ethylenediaminetetraacetic acid-treated enzyme-linked immunosorbent assay with clinical disease activities of pemphigus vul-

garis. *J Dermatol Sci.* 70 巻, 査読有, 2013, 190-195.
DOI:10.1016/j.jdermsci.2013.02.011.
Kondo T. Casting doubt on the traditional approach of cancer biomarker discovery through proteomics. *Expert Rev Proteomics.* 11 巻, 査読有, 2013, 9-12.
DOI:10.1111/1346-8138.12692.
Hosoya N, Sakumoto M, Nakamura Y, Narisawa T, Bilim V, Motoyama T, Tomita Y, Kondo T. Proteomics identified nuclear N-myc downstream-regulated gene 1 as a prognostic tissue biomarker candidate in renal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta.* 1834 巻, 査読有, 2013, 2630-2639.
DOI:10.1016/j.bbapap.2013.08.009.
Kubota D, Yoshida A, Tsuda H, Suehara Y, Okubo T, Saito T, Orita H, Sato K, Taguchi T, Yao T, Kaneko K, Katai H, Kawai A, Kondo T. Gene expression network analysis of ETV1 reveals KCTD10 as a novel prognostic biomarker in gastrointestinal stromal tumor. *PLoS One.* 8 巻, 査読有, 2013, e73896.
DOI:10.1371/journal.pone.0073896.
Kubota D, Mukaihara K, Yoshida A, Tsuda H, Kawai A, Kondo T. Proteomics study of open biopsy samples identifies peroxiredoxin 2 as a predictive biomarker of response to induction chemotherapy in osteosarcoma. *J Proteomics.* 91 巻, 査読有, 2013, 393-404.
DOI:10.1016/j.jprot.2013.07.022.
Ichikawa H, Kanda T, Kosugi S, Kawachi Y, Sasaki H, Wakai T, Kondo T. Laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis reveal the role of a novel macrophage-capping protein in lymph node metastasis in gastric cancer. *J Proteome Res.* 12 巻, 査読有, 2013, 3780-3791.
DOI:10.1021/pr400439m.
Arai K, Sakamoto R, Kubota D, Kondo T. Proteomic approach toward molecular backgrounds of drug resistance of osteosarcoma cells in spheroid culture system. *Proteomics.* 13 巻, 査読有, 2013, 2351-2360.
DOI:10.1002/pmic.201300053.
三好智子、大塚文男、稲垣兼一、田中康司、越智可奈子、藤井一恭、藤井伸治、当真貴志雄、中村絵里、塚本尚子、武田昌也、三村由香里、小倉俊郎、景山甚郷、榎野、博史。Erdheim-Chester 病が強く疑われた下垂体機能低下症の一例。日本内分泌学会雑誌。89 巻, 査読無, 2013, 21-23。
藤井一恭。【皮膚リンパ腫-いかに診断・治療するか】皮膚リンパ腫に対する分子標

的薬 HDAC 阻害剤の作用機序と使い方。医学のあゆみ。245 巻, 査読無, 2013, 589-592。

Fujii K, Suzuki N, Ikeda K, Hamada T, Yamamoto T, Kondo T, Iwatsuki K. Proteomic study identified HSP 70 kDa protein 1A as a possible therapeutic target, in combination with histone deacetylase inhibitors, for lymphoid neoplasms. *J Proteomics.* 75 巻, 査読有, 2012, 1401-1410.

DOI:10.1016/j.jprot.2011.11.010.

Fujii K, Aochi S, Takeshima C, Ohtsuka M, Hamada T, Asagoe K, Aoyama Y, Morizane S, Iwatsuki K. Eccrine poromatosis associated with polychemotherapy. *Acta Derm Venereol.* 92 巻, 査読有, 2012, 687-690.

DOI:10.2340/00015555-1279.

Hirai Y, Yamamoto T, Kimura H, Ito Y, Tsuji K, Miyake T, Morizane S, Suzuki D, Fujii K, Iwatsuki K. Hydroa vacciniforme is associated with increased numbers of Epstein-Barr virus-infected T cells. *J Invest Dermatol.* 132 巻, 査読有, 2012, 1401-1408.

DOI:10.1038/jid.2011.461.

Fujii K, Suzuki N, Yamamoto T, Suzuki D, Iwatsuki K. Valproic acid inhibits proliferation of EB virus-infected natural killer cells. *Hematology.* 17 巻, 査読有, 2012, 163-169.

DOI:10.1179/102453312X13376952196494.

[学会発表](計 12 件)

藤井一恭、馬場淳徳、勝江浩未、地村 望、東 裕子、米良修二、金蔵拓郎。生検後に縮小した EBER 陰性 Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL)。日本皮膚科学会第 372 回福岡地方会今福信一皮膚科主任教授就任記念。2015.3.14 ~ 2015.3.15。福岡(ホテルニューオータニ)。

Fujii K, Karpova M, Cheng P, Kanekura T, Iwatsuki K, Dummer R, Urošević-Maiwald M. The role of oversican on the pathogenesis of Sèzary syndrome. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014.12.12 ~ 2014.12.14。大阪 (Hotel Hankyu Expopark)。

藤井一恭、鈴木規弘、近藤 格、金蔵拓郎、岩月啓氏。蛍光標識二次元電気泳動法による HDAC 阻害剤の治療抵抗性原因タンパク質の同定。第 65 回日本電気泳動学会総会。2014.10.24 ~ 2014.10.25。横浜(横浜情報文化センター)。

Fujii K, Idogawa M, Kondo T, Iwatsuki K, Kanekura T. HSPA1A inhibits histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through mitochondrial apoptotic

pathway. 第 73 回日本癌学会学術総会.
2014.9.25 ~ 2014.9.27. 横浜 (PACIFIC
YOKOHAMA).

Fujii K, Suzuki N, IDogawa M, Kondo T,
Iwatsuki K, Kanekura T. HSP72 is a
possible target for combination therapy
with HDAC inhibitor. 44th Annual Meeting
of the European Society for Dermatolo-
gical Research. 2014.9.10 ~ 2014.9.13.
Copenhagen, Denmark.

藤井一恭、馬場淳徳、有村亜希子、多田浩
一、東 裕子、松下茂人、金蔵拓郎. 疣贅
状外観を呈した乾癬. 森田栄伸教授・山元
修教授就任 10 周年記念日本皮膚科学会第
128 回山陰・第 24 回島根合同開催地方会.
2014.8.30 ~ 2014.8.31. 松江 (松江テル
サ)

深松紘子、濱田利久、藤井一恭、青山裕美、
岩月啓氏、西田圭一郎、若林 宏、川畑智
子、高橋義雄. TNF 阻害剤による薬剤性障
害の 2 例. 日本皮膚科学会第 368 回福岡地
方会. 2014.3.15. 福岡(ホテルニューオー
タニ博多).

藤井一恭. Sezary 細胞における Versican
の発現とその生物学的意義. 第 32 回岡山
研究皮膚科フォーラム. 2014.1.18. 岡山
(岡山コンベンションセンター).

藤井一恭、竹原 彩、青山裕美、岩月啓氏.
帯状疱疹発症後に一時軽快した HIV 関連乾
癬. 岡山県医師会皮膚科部会・岡山市医師
会皮膚科・泌尿器科専門医部会学術講演会.
2013.12.13. 岡山(岡山衛生会館).

藤井一恭. がん細胞の薬剤抵抗性分子機
序: HDAC 阻害剤を例として. 第 65 回日本
皮膚科学会西部支部学術大会. 2013.11.9
~ 2013.11.10. 鹿児島(かごしま県民交流
センター).

梅村啓史、浅越健治、光井聖子、瀧口徹也、
藤井一恭、岩月啓氏. M タンパク血症を背
景とし、深部静脈血栓症と皮膚随伴症状を
伴った 2 例. 第 260 回日本皮膚科学会岡山
地方会. 2013.9.15. 岡山(岡山コンベンシ
ョンセンター).

吉岡愛育、藤井一恭、濱田利久、岩月啓氏、
野田和代、宮原信明. Multicentric Cas-
tleman 's disease (MCD) の一例. 第 259
回日本皮膚科学会岡山地方会. 2013.5.18.
岡山(岡山コンベンションセンター).

〔図書〕(計 2 件)

浦部晶夫、大田 健、川合眞一、島田和幸、
菅野健太郎 編集、藤井一恭他. 今日の処
方 改訂第 5 版. 南江堂. 2013 年.

相羽恵介 編、藤井一恭、岩月啓氏ほか.
抗がん薬の臨床薬理. 南山堂. 2013 年.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 一恭 (FUJII, Kazuyasu)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講
師

研究者番号: 70452571

(2) 研究分担者

近藤 格 (KONDO, Tadashi)
独立行政法人国立がん研究センター・希少
がん研究分野・分野長

研究者番号: 30284061

(3) 連携研究者