

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591923

研究課題名(和文) HDAC・PARP制御を介した合成致死誘導の分子基盤と乳癌治療へのアプローチ

研究課題名(英文) Nicotinamide potentiates HDAC inhibitor-induced cytotoxicity in human breast cancer cells through DNA damage accumulation

研究代表者

上原 範久 (UEHARA, NORIHISA)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30368211

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)：抗癌剤の多くは、DNA傷害による細胞死を誘導する。我々は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 vorinostat の有する DNA 二本鎖損傷誘導能ならびにニコチンアミド(NAM)の塩基除去修復酵素阻害作用に着目し、乳癌細胞への効率的な細胞死誘導法の検討を行った。乳癌細胞への vorinostat、NAM、vorinostat+NAM 処理後の細胞生存率を検討した結果、vorinostat 単剤と比較して、vorinostat+NAM 併用がより顕著に細胞死を誘導できた。また、vorinostat+NAM 併用による細胞死誘導は正常乳腺上皮細胞と比較して乳癌細胞選択的であることが確認された。

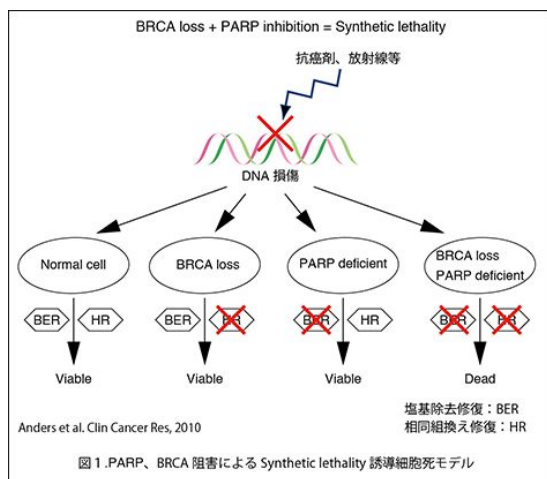
研究成果の概要(英文)：Poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) are nuclear protein that play a pivotal role in DNA single-strand breaks (SSB) repair pathway. Recently, PARP inhibitor has been employed as a novel therapeutic strategy to facilitate the cytotoxicity of DNA-damaging agents against cancer cells defective in homologous recombination repair through synthetic lethality. In the present study, we evaluated the effect of nicotinamide (NAM), an inhibitor of PARP-1 on the histone deacetylase inhibitor vorinostat-induced apoptosis in human breast cancer cells. When a NAM was combined with vorinostat, the dose of vorinostat required for apoptosis induction in MDA-MB-231 human breast cancer cells was markedly reduced, whereas normal human mammary epithelial cells exhibited resistance to vorinostat plus NAM treatment. Our results indicate that NAM may be a good candidate for enhancement of chemosensitivity of vorinostat.

研究分野：腫瘍細胞生物学

キーワード：HDAC inhibitor ニコチンアミド 合成致死 DNA損傷 breast cancer

1. 研究開始当初の背景

抗癌剤の多くは、細胞への DNA 傷害を基盤としたアポトーシス誘導により効果を発揮する。細胞は DNA 傷害に対して様々な修復機能を有しているが、近年、この DNA 修復経路の調節因子を標的とした癌治療へのアプローチが注目されている。通常 DNA 傷害に対して、一本鎖切断修復 (塩基除去修復) 経路に関わる poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) と二本鎖切断修復 (相同組換え修復) 経路に関わる BRCA (breast cancer susceptibility gene) は互いに補完し合い DNA 損傷修復を行う。どちらか一方の阻害のみでは DNA 損傷は修復され、細胞は生存するが、いずれの経路も阻害されると細胞は重度のゲノム不安定性により細胞死にいたる (**合成致死**“synthetic lethality”)(**図 1**)。



現在、この考えに基づき、PARP 阻害剤と DNA 損傷作用を有する薬剤との併用療法が進められ、BRCA 欠損の乳癌や BRCA 機能の異常が考えられるトリプルネガティブ (ER-, PgR-, HER2-) 乳癌に対して良好な結果が示されつつある。申請者はこれまでに、HDAC 阻害剤 vorinostat による p38MAPK を介した乳癌細胞アポトーシス誘導機序を明らかにした (Uehara et al. *Cancer Lett*, 2012)。また、HDAC 阻害剤の癌細胞選択的細胞死誘導機序において、正常細胞では HDAC 阻害剤処理後の DNA の損傷修復が見られるのに対して、癌細胞では修復抑制および DNA 二本鎖切断が蓄積されることが報告された (Lee et al., *PNAS*, 2011)。これらの結果より、HDAC および PARP の機能阻害が、より癌細胞選択的に細胞死を誘導できるのではないかと考えるに至った。加えて申請者は、ニコチンアミド (nicotinamide: NAM) の PARP 阻害作用を介した細胞死制御について報告しており (Uehara et al. *Exp Eye Res*, 2006)、水溶性ビタミンの一種である NAM は薬理的毒性が非常に少ないことから、現行の PARP 阻害剤と比較して副作用の軽減と効率的な抗癌作用を両立しうると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 vorinostat の乳癌細胞死誘導における DNA 二本鎖損傷蓄積の発見に加え、ニコチンアミド (NAM) が有する PARP 阻害作用に着目し、HDAC・PARP 制御を介した合成致死誘導の分子メカニズムの解明と効果的乳癌治療への応用を目的とする。

3. 研究の方法

(1) vorinostat・NAM 併用に対するヒト乳癌細胞株感受性の検討

乳癌細胞株と材料

ヒト乳癌細胞株およびヒト乳腺不死化細胞株 (Table) は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。ヒト正常乳腺上皮細胞は Invitrogen より購入した。HDAC 阻害剤 vorinostat は DMSO に溶解し 50 mM ストック溶液とした。NAM (ナカライテスク) は滅菌水に溶解し 1M ストック溶液をとした。

Cell lines	Subtype
MCF-10A	Normal-like, immortalized (ER-, PgR-)
MCF-7	Luminal type (ER+, PgR-, HER2+)
T47D	Luminal type (ER+, PgR+, HER2+)
KPL-1	Luminal type (ER+, PgR-, HER2+)
BT549	Basal type (TNBC)
HCC38	Basal type (TNBC)
MDA-MB-231	Basal type (TNBC)
HCC1937	BRCA1 ^{mut} (TNBC)
MDA-MB-436	BRCA1 ^{mut} (TNBC)

*TNBC (triple negative breast cancer; ER-, PgR-, HER2-)

細胞増殖の解析

各癌細胞および正常乳腺上皮細胞は 96-well プレートへ 5×10^3 個の細胞を播種し、vorinostat・NAM 添加後 PrestoBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen) を用いて細胞増殖アッセイを行った。

細胞死の解析

細胞増殖アッセイと同様に 96-well プレートへ細胞を播種し、vorinostat・NAM 添加後トリパンブルー色素排除法ならびに M30 Cytodeath ELISA (PEVIVA) により、細胞死およびアポトーシス細胞の検出を行った。

(2) vorinostat・NAM 併用による細胞死誘導の分子機序解析

Western blot 法

vorinostat・NAM 処理後の細胞より抽出したタンパクは SDS-PAGE に供し、PVDF メンブレンに転写した後、目的の特異的抗体を用いて検出を行った (Uehara et al. *Mol Cancer Res* 2008)。

γ H2AX 蛍光免疫染色

ガラスボトムカルチャーディッシュ (松波硝子) へ播種した MDA-MB-231 細胞を 10% ホルマリンにて固定した後、Anti-phospho-Histone H2A.X (JBW301, Millipore) ならびに Anti-mouse IgG Alexa Fluor488 (Invitrogen) を用いて蛍光顕微鏡下にて観察した。

siRNA による p38MAPK のノックダウン

6-well プレートへ MDA-MB-231 細胞を播種した後、p38MAPK siRNA をトランスフェクションした。48 時間後細胞を回収し、ウェスタンブロット解析に用いた (Uehara et al. *Cancer Lett*, 2012)。

4. 研究成果

(1) vorinostat・NAM 併用のヒト乳癌細胞に対する細胞増殖抑制効果。

各サブタイプに属する乳癌細胞 (前項 Table 参照) およびヒト正常乳腺上皮細胞 (HMEC) への vorinostat (5 μM)、NAM (20 mM)、vorinostat (5 μM)+NAM (20 mM) 処理 72 時間後の細胞増殖を検討した結果、vorinostat・NAM 併用において、HMEC および MCF-10A では緩やかな増殖がみられたが、いずれの乳癌細胞においても増殖抑制効果が認められた。興味深いことに basal type に属する乳癌細胞 (MDA-MB-231、BT549) における増殖抑制効果が高かった (Fig.1 は HMEC および MDA-MB-231 の増殖曲線を示す)。

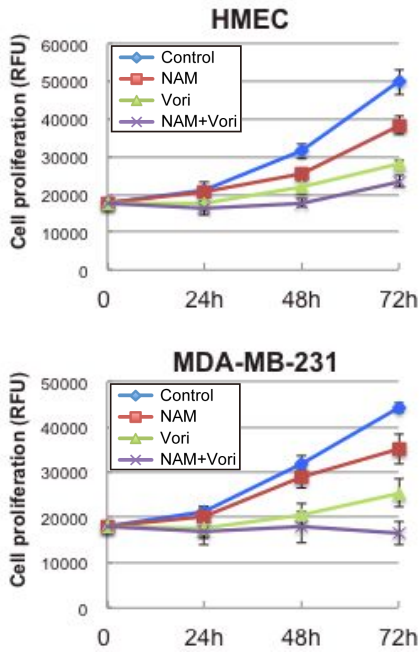


Fig. 1 vorinostat および NAM の細胞増殖に及ぼす影響

(2) vorinostat・NAM 併用によるヒト乳癌細胞死誘導。

次に vorinostat・NAM 併用の細胞生存率への影響を色素排除法にて検討した (Fig. 2)。

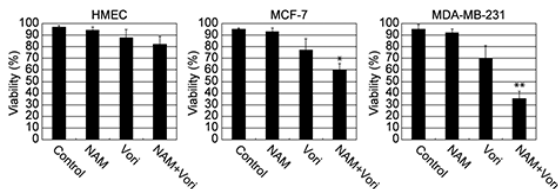


Fig. 2 vorinostat および NAM の細胞死誘導効果
その結果、MDA-MB-231 への vorinostat+NAM

処理により、vorinostat 単剤と比較して顕著な細胞死誘導が確認された。また、vorinostat+NAM 処理後の細胞生存率は、HMEC と比較し、いずれの乳癌細胞においても顕著に低下した。

続いて vorinostat・NAM 併用による MDA-MB-231 への細胞死誘導がアポトーシスによるものかどうかを、アポトーシス特異的 CK18 切断断片の検出により確認を行った (Fig. 3)。その結果、未処理のコントロール細胞と比較し、MDA-MB-231 細胞への vorinostat 処理後 24、72 時間において顕著なアポトーシス誘導が認められた。大変興味深いことに、vorinostat 誘導アポトーシスは NAM との併用によってさらに 2 倍以上のアポトーシスが誘導されていることが確認された。

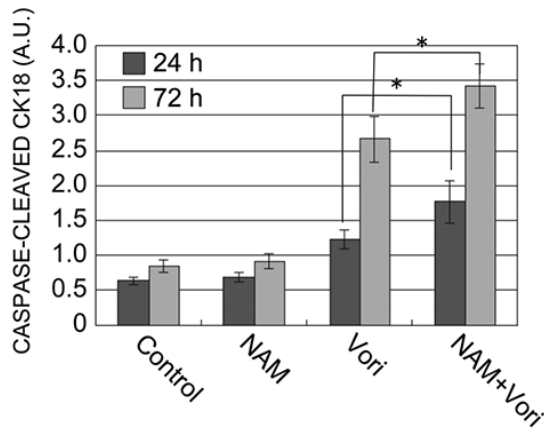


Fig. 3 vorinostat・NAM 併用によるアポトーシス増強効果

(3) vorinostat・NAM 併用によるアポトーシス誘導の分子機序。

MDA-MB-231 細胞への vorinostat+NAM 処理 24 時間後におけるアポトーシス関連タンパクの発現レベルをウェスタンブロット法により解析した結果 (Fig. 4)、抗アポトーシスタンパク Bcl-xL の顕著な発現レベルの低下とともに、アポトーシス促進タンパクである Bim の発現上昇が確認された。MDA-MB-231 細胞への vorinostat 単剤処理においても、アポトーシスの重要な実行タンパクである断片化 Caspase-3 のタンパクレベルの顕著な上昇が認められたが、NAM との併用によりその発現はさらに上昇した (Fig. 4)。

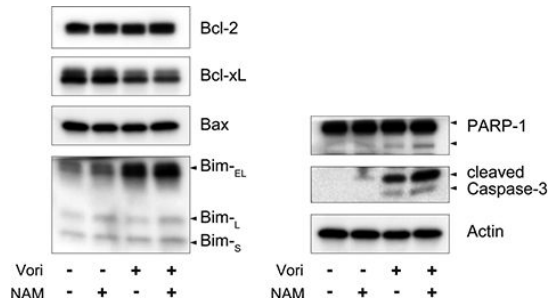


Fig. 4 vorinostat・NAM 併用によるアポトーシス関連タンパクレベルの変化

MAP キナーゼ (ERK、JNK、p38MAPK) は様々なシグナルを媒介する中心的な分子で

ある。我々は以前、MDA-MB-231 への vorinostat 誘導アポトーシスにおいて、p38MAPK が必須の分子であることを報告した (Uehara et al. *Cancer Lett*, 2012)。そこで、vorinostat・NAM 併用によるアポトーシス誘導機序における MAP キナーゼシグナルの関与をウェスタンブロット法により検討した (Fig. 5)。その結果、以前の報告と同様に vorinostat 単剤処理後の p38MAPK のリン酸化亢進が確認されるとともに、vorinostat・NAM 併用による p38MAPK のさらなるリン酸化亢進が検出された。以上の結果より、vorinostat・NAM 併用によるアポトーシス誘導においても p38MAPK の活性化が関与することが示唆された。

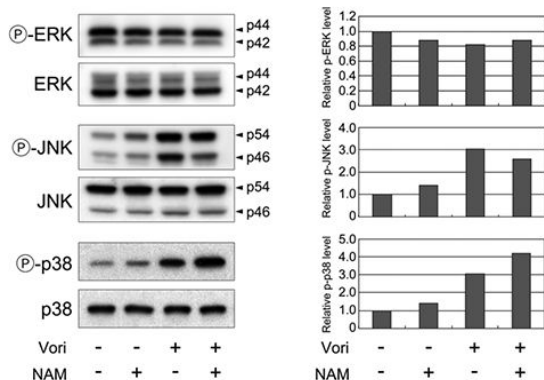


Fig. 5 vorinostat・NAM 併用の MAP キナーゼシグナルに及ぼす影響

(5) vorinostat・NAM 併用による DNA 損傷蓄積の検討。

合成致死誘導における DNA 損傷の蓄積は重要なイベントである。これまでの結果より、乳癌細胞株への vorinostat+NAM 処理がより効果的なアポトーシス誘導法であることが確認できた。そこで、vorinostat+NAM 誘導アポトーシスが DNA 損傷の蓄積に伴うものなのかを検討するために、DNA 二本鎖損傷マーカーであるリン酸化ヒストン H2AX (γ H2AX) の細胞内局在とリン酸化レベルをそれぞれ蛍光免疫染色法ならびにウェスタンブロット法により検討した。 γ H2AX の蛍光免疫染色の結果、MDA-MB-231 細胞への NAM および vorinostat 単剤処理において、核内における γ H2AX の局在が観察された。その局在は、vorinostat・NAM 併用後、より多くの γ H2AX シグナルの局在が確認された (Fig. 6)。

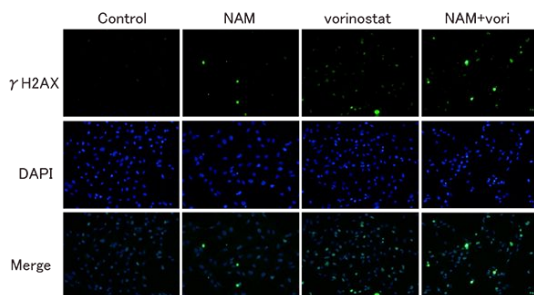


Fig. 6 MDA-MB-231 細胞における vorinostat・NAM 処理後の γ H2AX の蛍光免疫染色像

次に、vorinostat+NAM 処理後の γ H2AX レベルをウェスタンブロット法により検討した結果、vorinostat 単剤および vorinostat+NAM 処理 24 時間後のいずれにおいても顕著な γ H2AX レベルの上昇が認められた。大変興味深いことに、vorinostat 単剤における γ H2AX レベルは処理後 24 時間において最も亢進するが、48~72 時間にかけてその発現レベルは減少した。一方、vorinostat+NAM 併用では、処理後 72 時間においても γ H2AX レベルは維持されており、p38MAPK のリン酸化も引き続き検出された (Fig. 7)。以上の結果から、vorinostat+NAM 併用による MDA-MB-231 細胞へのアポトーシス誘導効果は、 γ H2AX レベル亢進と非常によく相関することが明らかとなった (Fig. 2, Fig. 7)。

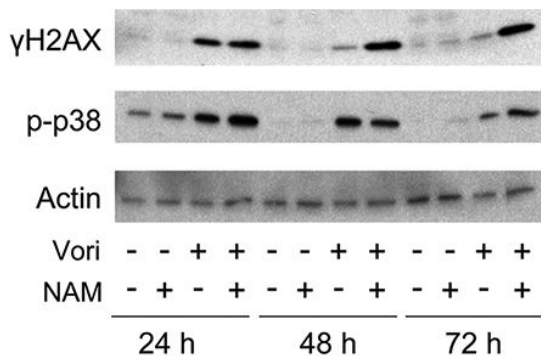


Fig. 7 vorinostat・NAM 併用による γ H2AX の蓄積

(6) vorinostat・NAM 誘導 DNA 損傷蓄積における p38MAPK の役割。

vorinostat・NAM 誘導アポトーシスにおいて、 γ H2AX 蓄積と p38MAPK のリン酸化に相関性がみられた。そこで、p38MAPK 発現の vorinostat・NAM 誘導 DNA 損傷蓄積における役割を siRNA を用いて検討した (Fig. 8)。

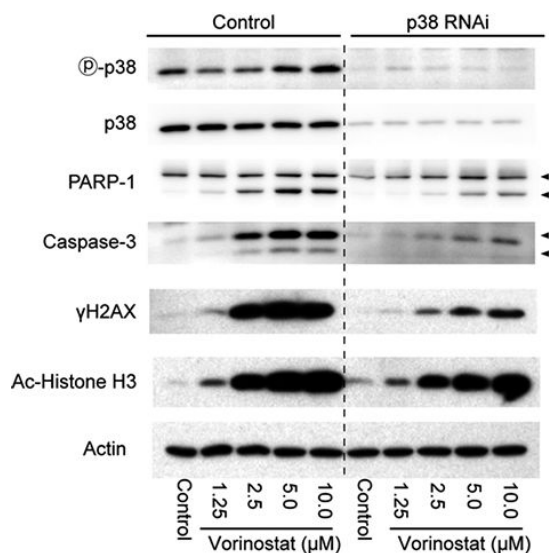


Fig. 8 p38MAPK ノックダウン後の γ H2AX 発現

p38MAPK をノックダウンした後、vorinostat 処理を行い、Caspase-3、 γ H2AX タンパクレベルをウェスタンブロットにより検討したところ、p38MAPK をノックダウンによりア

ポトシスの減少が認められたとともに (Uehara et al. *Cancer Lett*, 2012), Caspase-3 および γ H2AX タンパクレベルの顕著な低下が確認された(Fig. 8)。

以上の結果より、vorinostat+NAM 併用による乳癌細胞死誘導の有効性が確認され、その機序として p38MAPK を介した DNA 損傷の高度の蓄積を起点とすることが示唆された。加えて、HDAC および PARP の機能阻害が、より癌細胞選択的に細胞死を誘導できたことから、水溶性ビタミンの一種である NAM は薬理学的毒性が非常に少ないことから、副作用の軽減と効率的な抗癌作用を両立するものと考えられた。

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1件)

Uehara, N. Yoshizawa, K. Tsubura, A.

Vorinostat enhances protein stability of p27 and p21 through negative regulation of Skp2 and Cks1 in human breast cancer cells *Oncol Rep* 28 105-110 (2012)

[学会発表](計5件)

上原範久、義澤克彦、螺良愛郎：Vorinostat誘導乳癌細胞増殖抑制におけるSkp2、Cks1発現抑制とp27、p21の安定化(日本病理学会2012年04月)

上原 範久：Vorinostat誘導乳癌細胞増殖抑制におけるmiR-148a発現とその役割(日本がん分子標的治療学会2012年06月)

Norihisa Uehara, Katsuhiko Yoshizawa, Ayako Kimura and Airo Tsubura: MicroRNA-148a suppresses cell migration and invasion in human breast cancer cells: possible involvement of epithelial-mesenchymal transition pathway (日本分子生物学会2012年12月)

上原範久、義澤克彦：Inhibition of in vitro motility and invasive potential by microRNA-148a in human breast cancer cells. (日本癌学会 2013年10月)

上原範久、義澤克彦：ニコチンアミドはヒストン脱アセチル化阻害剤vorinostat誘導細胞死を増強する(日本分子生物学会2014年11月)

[図書](計0件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

上原 範久 (UEHARA NORIHISA)
九州大学・歯学研究科(研究院)・助教
研究者番号：30368211

(2)研究分担者

()

(3)連携研究者

螺良 愛郎 (TSUBURA AIRO)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：90098137

義澤 克彦 (YOSHIZAWA KATSUHIKO)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：70548396

片倉 喜範 (KATAKURA YOSHINORI)
九州大学・農学部・准教授
研究者番号：50264106