

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593035

研究課題名(和文) エピジェネティクス機構をターゲットとした唾液腺癌に対する新規分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular therapy target at epigenetics against salivary gland cancer

研究代表者

大江 剛(OHE, Go)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：60432762

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)：唾液腺癌は再発、転移を頻発するため予後不良であることが知られており、より効果的な新規治療法の開発が望まれている。そこでHDAC阻害剤バルプロ酸(VPA)を用いてエピジェネティクス機構をターゲットとした新規治療法の開発を行った。

VPAは唾液腺癌細胞株に対してp27、p21の発現増強を介したG1 arrestを誘導し、その結果、腫瘍増殖を抑制した。またVPAは唾液腺癌細胞を移植したマウスに対しても著明な腫瘍増殖抑制効果を発現した。VPAが唾液腺癌に対するより効果的な治療薬である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Salivary gland cancer (SGC) has a comparatively poor prognosis and is prone to frequent recurrence and metastases. Therefore, the development of more effective chemotherapy against SGC is desirable. The aim of the present study was to investigate the antitumour effects of valproic acid (VPA) against SGC.

VPA inhibited the proliferation of SGC cells in a dose-dependent manner in vitro. Degenerated cancer cells were observed at high concentrations of VPA. In the cell cycle analysis, VPA induced cell-growth inhibition and G1 arrest of cell cycle progression in both cancer cell lines in a time- and dose-dependent manner. VPA markedly upregulated the mRNA expression levels of both p21 and p27 in both SGC cell lines in a time-dependent manner. In the xenograft model experiment, VPA treatment markedly inhibited the growth of salivary gland tumours when compared with the growth of the untreated controls. VPA may be a valuable drug in the development of better therapeutic regimens for SGC.

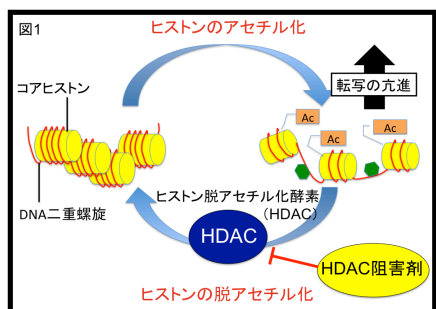
研究分野：口腔外科

キーワード：HDAC阻害剤 バルプロ酸 唾液腺癌

1. 研究開始当初の背景

正常細胞と比べると、がん細胞の遺伝子発現には多くの変化がみられる。この遺伝子発現の変化は主に DNA の突然変異によって起こるとされており、がんにて特異的なこれらの遺伝子変異をターゲットとした分子標的治療の研究が盛んに行われている。しかしながら、実際のがんでは変異を高率に起こしている遺伝子数は少なく、一部の症例にしか利用できないという問題点がある。最近、遺伝子の塩基配列の変化を伴わない遺伝子の発現異常、すなわちエピジェネティックな変化が発がんに関与していることが明らかになってきた。このエピジェネティックな変化の主なものとして、DNA のメチル化やヒストンタンパク質のメチル化・アセチル化等のヒストン残基修飾が知られており、これらの異常によって、細胞周期の調節やアポトーシス、腫瘍免疫、癌の転移や浸潤に関連する遺伝子が不活化されている。

ヒトの DNA はヌクレオソームを基本としたクロマチン構造をとっている。クロマチン構造の最小単位であるヌクレオソームは、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 の各 2 分子ずつが集合して構成されるコアヒストン 8 量体からなり、その周囲を 146 bp の DNA が左巻きに約 2 回転巻き付いている構造をとっている。この状態のヌクレオソーム構造は転写を抑制しており、がん細胞では癌抑制遺伝子の発現が抑えられている。転写の活性化には、転写活性化因子が DNA に結合して整然と配列していたヌクレオソーム構造が部分的に排除されるなどの変化を受ける必要があるが、この転写活性化機構の 1 つにヒストンのアセチル化がある。ヒストンがアセチル化されると、メチル化などで発現の抑えられた癌抑制遺伝子の転写が亢進し、細胞増殖が抑制される。ヒストンのアセチル化は、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) によって制御されていて、そのバランスによって種々の遺伝子の発現を調節していること (図 1) から、抗がん剤の分子標的として大きな注目を集めている。



バルプロ酸は、てんかんや躁うつ病などの治療薬として広く用いられている薬物であるが、最近、HDAC の阻害薬として機能することが報告された (Göttlicher M, et al. EMBO J., 2001)。ヒストンがアセチル化されると、メチル化などで発現の抑えられてい

た癌抑制遺伝子の転写が亢進し、がん細胞の増殖が抑制されることから、HDAC は抗がん剤の分子標的として大きな注目を集めている。乳癌や前立腺癌、白血病などでは、既に HDAC 阻害薬の抗腫瘍効果が報告されていて (Göttlicher M. Ann Hematol, 2004)、臨床試験がはじまっている。現在、種々の HDAC 阻害剤が開発されており、それらを用いることでより効果的で、副作用の少ない新しい治療法が期待される。

2. 研究の目的

唾液腺癌は放射線や抗癌剤に対する感受性が低く、しばしば局所再発や遠隔転移し、一般に予後は不良とされている。そのため新規治療法の開発が待たれている。一方、バルプロ酸は、てんかんや躁うつ病などの治療薬として広く用いられている薬物であるが、最近、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase; HDAC) の阻害薬として機能することが報告され、乳癌や前立腺癌に対する抗腫瘍効果が報告されている。その背景として、最近、塩基配列の変異を伴わないエピジェネティックな変化が癌の発生や進展に重要な役割を果たすことが次第に明らかとなってきたことが挙げられる。

そこで、本研究では、唾液腺癌に対してもバルプロ酸を含めた種々の HDAC 阻害薬や DNA メチル化阻害薬が抗腫瘍効果を示すのではないかと考え、エピジェネティック機構をターゲットとした唾液腺癌に対する新規治療の可能性について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 唾液腺癌細胞株に HDAC 阻害剤を添加し、細胞増殖に対する HDAC 阻害剤の影響を検討する。すなわち、 2×10^3 個/well の唾液腺癌細胞を 96 穴ウェルプレートに播種する。24 時間後、各種 HDAC 阻害薬を添加した培養液に交換し、培養 0, 2, 4 日する。MTT assay により、生細胞数は 540 nm の吸光度で測定する。
- (2) 唾液腺癌細胞株に HDAC 阻害剤を添加し、細胞周期に対する HDAC 阻害剤の影響を検討する。すなわち、サブコンフルエントの唾液腺癌細胞に各種 HDAC 阻害薬あるいは DNA メチル化阻害薬を添加して 12, 24, 48, 72 時間培養する。回収した細胞を 70%エタノールで固定後、100mg/ml の RNase で処理し、40mg/ml のヨウ化プロピジウムで染色し、DNA 量をフローサイトメーターにて測定し細胞周期の解析を行う。
- (3) 唾液腺癌細胞株に HDAC 阻害剤を添加し、癌抑制遺伝子に対する HDAC 阻害剤の影響を検討する。すなわち、サブコ

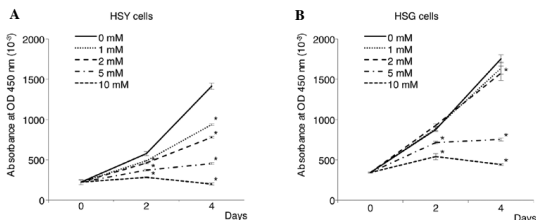
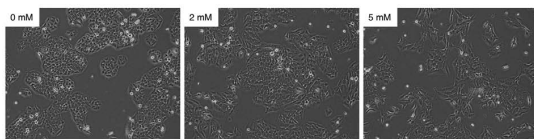
ンフルエントの唾液腺癌細胞に各種 HDAC 阻害薬あるいは DNA メチル化阻害薬を添加して 12、24、48 時間培養する。回収した細胞の total RNA を回収した後、cDNA を合成する。リアルタイム PCR で解析する。癌抑制遺伝子 p21、p27 の発現を内因性コントロールである GAPDH mRNA を用いて標準化し、比較検討する。

- (4) ノードマウスに移植した唾液腺癌細胞株に対する、HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果について検討する。すなわち、唾液腺癌細胞を 8 週齢の Balb/c 雌性ノードマウスの背部皮下に移植し（それぞれ 5×10^6 個あるいは 1×10^5 個）、1 週間後に腫瘍が生着したことを確認後、各種 HDAC 阻害薬あるいは DNA メチル化阻害薬を投与する。腫瘍の大きさ（長径，短径）を経時的に測定して、抗腫瘍効果を評価する。また、腫瘍組織を試料としパラフィン切片を作成し、p21 および p27 の発現を免疫組織学的に評価する。

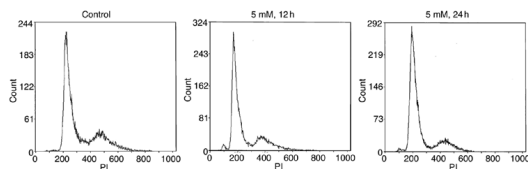


4. 研究成果

- (1) 唾液腺癌細胞株の細胞増殖に対する HDAC 阻害剤の影響



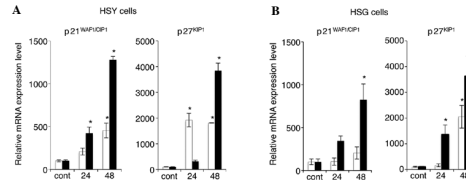
- (2) 唾液腺癌細胞株の細胞周期に対する HDAC 阻害剤の影響



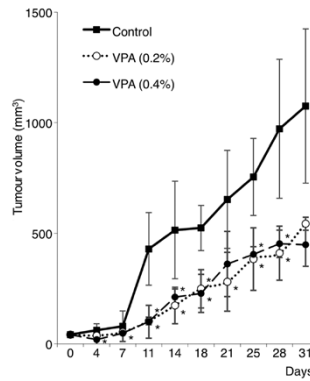
	VPA				
	Control (%)	12 h (%)	24 h (%)	12 h (%)	24 h (%)
G1	56.2±0.8	57.7±6.0	60.4±0.6 ^a	67.1±1.6 ^a	73.8±2.0 ^a
G2	24.6±0.3	21.9±0.6	18.3±2.2 ^a	21.2±0.1 ^a	15.1±0.6 ^a

^aP<0.05, significant difference from the untreated control group.

- (3) 唾液腺癌細胞株の癌抑制遺伝子に対する HDAC 阻害剤の影響



- (4) 唾液腺癌担癌ノードマウスに対する HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果



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)

Antitumour effect of valproic acid against salivary gland cancer in vitro and in vivo. Nagai H, Fujioka-Kobayashi M, Ohe G, Hara K, Takamaru N, Uchida D, Tamatani T, Fujisawa K, Miyamoto Y. *Oncol Rep*. 31(3): 1453-1458, 2014 (査読有)
DOI: 10.3892/or.2013.2959

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大江 剛 (OHE, Go)
徳島大学・大学病院・助教
研究者番号：60432762

(2)研究分担者

内田 大亮 (UCHIDA, Daisuke)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20335798

玉谷 哲也 (TAMATANI, Tetsuya)
徳島大学・大学病院・講師
研究者番号：30274236

高丸 菜都美 (TAKAMARU, Natsumi)
徳島大学・大学病院・助教
研究者番号：40513031

永井 宏和 (NAGAI, Hirokazu)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究
部・准教授
研究者番号：50282190

栗林 伸行 (KURIBAYASHI, Nobuyuki)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究
部・助教
研究者番号：80617332

(3)連携研究者

()

研究者番号：