

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650618

研究課題名(和文) HDAC1 結合蛋白による抗がん剤耐性機構に基づく新たな分子標的治療の開発研究

研究課題名(英文) Mechanism of chemoresistance by HDAC1-associating protein and development of molecular targeted therapy

研究代表者

高橋 雅英 (Takahashi, Masahide)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40183446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：生体内でHDAC1結合蛋白RFPが悪性腫瘍の抗がん剤耐性に与える影響について卵巣がん細胞株において検討を行った。複数の卵巣がん細胞株を用い、培養中の細胞およびヌードマウス皮下へ移植した腫瘍に対し抗がん剤を投与した結果、RFPノックダウンによる抗がん剤耐性の有意な低下を認めた。またヒト卵巣がん患者組織にてRFPの免疫染色を行い、染色強度と臨床情報を比較した結果、RFP高発現患者群において抗がん剤治療の奏効率が有意に低いことが明らかになった。この結果から、RFPが卵巣がんにおいても抗がん剤耐性を制御していることが示され、治療ターゲットになる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Resistance to platinum- and taxane-based chemotherapy is a major cause of treatment failure in ovarian cancer. Thus, it is necessary to develop a predictive marker and molecular target for overcoming drug resistance in ovarian cancer treatment. Using an in vitro model, we previously found that the RET finger protein (RFP) which is known as HDAC-associating protein, confers cancer cell resistance to anticancer drugs. In this study, we showed that RFP was expressed in 62% of ovarian cancer patients and its positivity significantly correlated with drug resistance. Depletion of RFP by RNA interference in ovarian cancer cell lines, SKOV3 and HEY, significantly increased carboplatin- or paclitaxel-induced apoptosis and resulted in reduced anticancer drug resistance. In a nude mouse tumor xenograft model, inoculated RFP-knockdown ovarian cancer cells exhibited lower carboplatin resistance than control cells. These findings suggest that RFP could be a candidate for a molecular-targeted agent.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：HDAC1 RET finger protein 抗がん剤耐性 卵巣がん

## 1. 研究開始当初の背景

HDAC (Histone Deacetylase) は細胞の増殖、分化、生存に機能することで腫瘍の増殖を制御している。In vitro の研究によって、HDACi が細胞増殖の停止、分化、細胞死、および腫瘍血管新生の阻害などの多様な制がん作用を発揮することがわかってきた。これらの研究をもとに、多数の HDACi を用いた臨床試験が行われており、そのうちの二種類が FDA による認可を受けて治療に使われている。しかし、複数の HDACi において、単剤での使用では効果が期待できないことや、悪心や血小板減少、骨髄減少等の副作用が強く出ることが報告されている (Vansteenkiste, J et al. Invest. New Drugs 2008)。最近の動向としては他剤との併用療法での認可を目指した臨床試験が行われているが、HDAC のような幅広い細胞に発現し重要な機能を担う分子を阻害する以上、副作用がでる可能性は極めて高い。この問題を解決する方策として考えられるのは、(1) 作用する HDAC ファミリー分子選択的あるいは作用部位選択的な阻害剤の開発、あるいは (2) HDAC と協調的に機能し、HDAC の特定の機能に局限して影響を与える分子を治療標的にする、等が挙げられる。(1) に関しては製薬企業等による阻害剤の探索が進められている一方で、(2) に関して HDAC 関連分子を標的とした治療法開発の報告は申請者の知る限りほとんどなされていない。

申請者の研究によって、HDAC ファミリーの一つである HDAC1 と相互作用する RET Finger Protein (RFP) が正常組織では主に精巣に局限して発現している、RFP のノックアウトマウスが著明な表現型を示さず、野生型と同程度の寿命を有する、RFP が HDAC1 との相互作用を介して Thioredoxin Binding Protein-2 (TBP-2) 遺伝子の転写を抑制し、がん細胞の抗がん剤抵抗性を亢進させている、がん患者において、RFP を発現している患者群では発現していない群に比べて予後が有意に悪化する、等が明らかになっている (Shimono, Y et al. J. Biol. Chem. 2003; Kato, T et al. Cancer Res. 2009; Tsukamoto, H et al. Cancer Sci. 2009 など)。これらの結果は RFP を標的とすることで、従来使用されていた抗がん剤の副作用を減らしつつ、制がん効果の増強が可能となることを示唆している。本研究計画では治療に応用することを前提として、in vivo で RFP の発現抑制が抗がん剤の作用を増強し得るか、発現抑制以外に、RFP の機能を抑制する有効な方法があるかについて検討する。RFP を標的とした治療法の有効性を示すことができれば、RFP をモデルとして HDAC 関連分子のうち治療候補となりうるものをさらに見出すことができると考えている。

## 2. 研究の目的

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC inhibitor; HDACi) はその制がん作用から、抗がん剤として有望視されている。しかし、複数の HDACi の臨床試験において重篤な副作用が観察され、問題となっている。この副作用の一因として、HDAC が細胞内で非常に多くのプロセスに関与する重要な分子であることが挙げられる。この問題点を回避する手段として HDAC そのものではなく、より機能の限定された HDAC 結合分子を治療標的にすることが考えられる。今回の研究では、我々が見出したがん細胞で高発現し、HDAC1 との相互作用を介して抗がん剤耐性を増強する分子である RET Finger Protein (RFP) を標的とした治療法の基礎的研究を推進し、HDAC 関連分子を治療標的候補とするアプローチの有効性を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) In vivo において RFP の発現抑制による悪性腫瘍の抗がん剤耐性に与える影響の検討

RFP を標的とした治療の可能性を示すためには生体内で効率良く RFP をノックダウンする手法の開発、およびその手法による抗がん剤作用の増強効果の評価が必須である。評価を行うにあたって達成すべき目標値を明確にする必要がある。

方法としてはがん細胞をヌードマウスに皮下移植してできた腫瘍が体積 50mm<sup>3</sup> に達した段階で RFP を抑制するための siRNA もしくは shRNA をマウス腫瘍内に導入し、経時的にサンプルを採取してノックダウン効率をウェスタンブロットングで検討する。その際に siRNA に関しては導入方法 (直接投与、アテロコラーゲン) や投与回数、化学修飾の有無等のコンディションの違いによるノックダウン効率の違いについて評価する。shRNA に関しては導入する際に、大阪大学薬学研究科の水口裕之先生が開発された高効率に目的遺伝子のノックダウン可能なアデノウイルスベクターを供与いただき利用する予定である。In vitro でのノックダウン効率および抗がん剤治療モデルにおける治療効果を基に目標値を以下のように設定する。

### RFP ノックダウン効率

これまでの in vitro での実験から、70% 程度のノックダウン効率でも抗がん剤の作用増強効果が観察されている。そこで今回の研究計画では in vivo でのノックダウン効率 70% ± 10 を目標に、生体内における RFP ノックダウンの手法について検討をする。

抗がん剤の作用増強効果以前の抗がん剤治療モデルではコントロール細胞株を移植した群では抗がん剤治療により約 20% 程度の腫瘍縮小効果しかみられなかったが、RFP をノックダウンした群では 50% 以上腫瘍が縮小した (図 3)。今回の治療モデルでは以前用いたノックダウン細胞株ほどのノック

ダウン効率を得られない可能性があるため、30～40%程度の腫瘍縮小効果を目標値として考えている。これらの目標値を基に24年度は *in vivo* における RFP のノックダウン効果について検討する。具体的には、まず複数の RFP を標的とした siRNA の配列を設計し、それぞれ *in vitro* でノックダウン効率を検討し、80-90%程度抑制できた配列について *in vivo* での検討に用いる。使用するがん細胞としては、患者検体を用いた解析で予後と RFP の発現との間に相関関係のみられた大腸がんおよび子宮体がん由来の細胞株を考えている。

#### (2) RFP-HDAC1 複合体形成の阻害による新たな治療法の開発

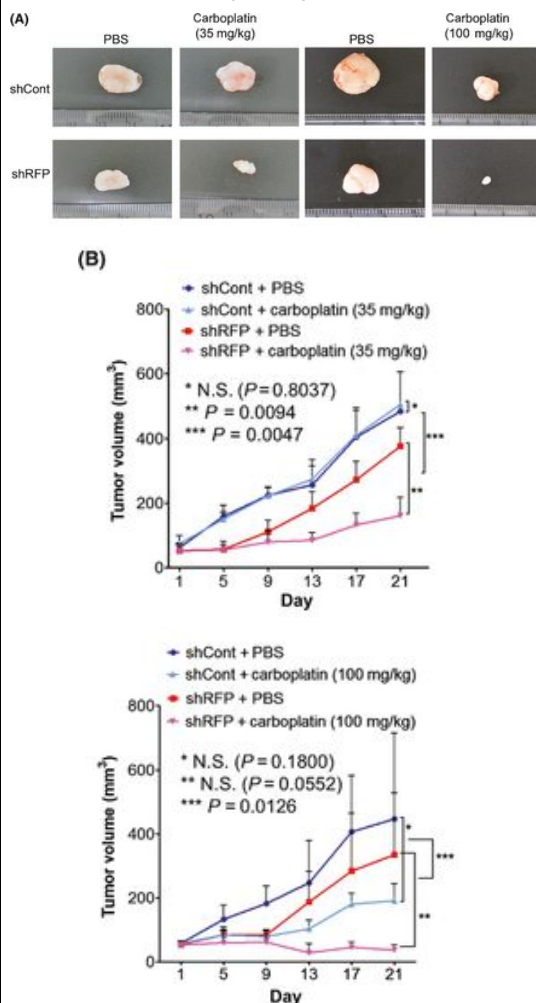
申請者の研究から、RFP ががん細胞の抗がん剤耐性を制御する際には HDAC1 および転写因子 NF-Y と Thioredoxin Binding Protein-2 (TBP-2) 遺伝子プロモーター上で転写抑制複合体を形成して TBP-2 の発現を抑制していることを報告している (Kato et al. Cancer Res. 2009)。この研究を通じて RFP-HDAC1 相互作用には RFP の Rfp domain が必要であること、また RFP/HDAC1/NF-Y 複合体の形成に RFP の二量体化が必須であり (図 4) Rfp domain のみでは複合体の形成ができないことが明らかとなっている。このことから、Rfp domain のみあるいは二量体化に必要な Coiled-coil domain を発現させることで RFP/HDAC1/NF-Y 複合体の機能を阻害し、結果としてがん細胞の抗がん剤耐性を低下させることができるのではないかと考えている (図 4)。そこで Rfp domain および Coiled-coil の強制発現によって HDAC1 と RFP の相互作用を阻害できるか否かを、免疫沈降法を用いて検討する。この検討で阻害作用が確認された場合は、より低分子量のペプチドで阻害効果を得るために、RFP-HDAC1 相互作用および RFP の二量体化に必要な領域をさらに絞り込む必要がある。そのため、Coiled-coil および Rfp domain を削った欠失変異体を作製し、それぞれ RFP の二量体化および RFP-HDAC1 相互作用を阻害できる最小の変異体を免疫沈降法にて検討する。

#### (3) HDAC1 の新規結合分子の同定および治療標的としての可能性の検討

がん細胞内で HDAC1 に結合し協調的に機能するタンパク質は、HDAC1 を介したがんの悪性化に關与する可能性が考えられる。そこで、新規 HDAC1 結合タンパク質を探索するために、質量分析計を用いることを考えている。具体的には HeLa 細胞に FLAG タグを融合させた HDAC1 を発現させ、抗 FLAG タグ抗体を用いて免疫沈降し、得られたサンプルを LC-MS/MS にて解析し、結合タンパク質を同定する。同定したタンパク質についてそのタンパク質を認識する抗体を用いた免疫沈降にて HDAC1 との結合を確認する。

#### 4. 研究成果

生体内で RFP が悪性腫瘍の抗がん剤耐性に与える影響について卵巣がん細胞株において検討を行った。複数の卵巣がん細胞株を用い、培養中の細胞およびヌードマウス皮下へ移植した腫瘍に対し抗がん剤を投与した結果、RFP ノックダウンによる抗がん剤耐性の有意な低下を認めた (下図)。またヒト卵巣がん



図(A)ヌードマウスに皮下移植した RFP をノックダウンした卵巣がん細胞株 (shRFP) では carboplatin に対する抗がん剤耐性が著しく低下する。(B) (A) の皮下腫瘍の大きさの継続的な変化を示す。

患者組織にて RFP の免疫染色を行い、染色強度と臨床情報を比較した結果、RFP 高発現患者群において抗がん剤治療の奏効率が有意に低いことが明らかになった。この結果から、RFP が卵巣がんにおいても抗がん剤耐性を制御している可能性が示唆された。

従来のヌードマウス皮下への移植腫瘍を用いた検討では異所性の腫瘍を用いていた。より本来のがんの状況を模した実験を行うために発がんモデルマウスを用いた実験系を構築した。方法として、Dr. Holland の研究室にて開発された、RCAS/tv-a システムを用いた神経膠芽腫を発症するマウスと RFP のノックアウトマウスを交配し、マウスに発生

した神経膠芽腫の抗がん剤耐性をコントロール - RFP ノックアウトマウス間で比較する、という系を採用した。現在までに本マウスで神経膠芽腫の発症を確認したため、今後抗がん剤耐性について検討が必要である。

当初は RFP-HDAC 相互作用の阻害方法を模索する予定であったが、期間中に RFP がユビキチン E3 リガーゼ活性を有することが判明した。この酵素活性を指標にしたスクリーニング系の構築が当初計画と比較してより RFP 阻害剤の開発に資するものと判断し、スクリーニング系の構築に着手した。RFP タンパク質を精製し、基質候補のヒストン H2A を用いて *in vitro* ユビキチン化アッセイを行った結果、基質の RFP タンパク質量依存的なユビキチン化が観察された。この結果から、この系が RFP の活性阻害剤のスクリーニングに有用である可能性が示されたと考えている。

#### 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6件)すべて査読有り

1. Kato, T., Enomoto, A., Watanabe, T., Haga, H., Ishida, S., Kondo, Y., Furukawa, K., Urano, T., Mii, S., Weng, L., Takagishi, M., Asai, M., Asai, N., Kaibuchi, K., Murakumo, Y. and Takahashi, M.

TRIM27/MTRF-B-dependent integrin beta1 expression defines leading cells in cancer cell collectives.

**Cell Rep.** (2014) in press

2. Niimi, K., Murakumo, Y., Watanabe, N., Kato, T., Mii, S., Enomoto, A., Asai, M., Asai, N., Yamamoto, E., Kajiyama, H., Shibata, K., Kikkawa, F., and Takahashi, M.

Suppression of REV7 enhances cisplatin sensitivity in ovarian clear cell carcinoma cells.

**Cancer Sci.** 105: 545-552 (2014).

3. Watanabe, N., Mii, S., Asai, N., Asai, M., Niimi, K., Ushida, K., Kato, T., Enomoto, A., Ishii, H., Takahashi, M., and Murakumo, Y.  
The Rev7 subunit of DNA polymerase  $\zeta$  is essential for primordial germ cell maintenance in the mouse.

**J. Biol. Chem.** 288: 10459-10471 (2013)..

4. Horio, M., Kato, T., Mii, S., Enomoto, A., Asai, M., Asai, N., Murakumo, Y., Shibata, K., Kikkawa, F. and Takahashi, M.

Expression of RET finger protein predicts chemoresistance in epithelial ovarian cancer.

**Cancer Med.** 1: 218-229 (2012).

5. Iwakoshi, A., Murakumo, Y., Kato, T., Kitamura, A., Mii, S., Saito, S., Yatabe, Y. and Takahashi, M.

RET finger protein expression is associated with prognosis in lung cancer with

epidermal growth factor receptor mutations

**Pathol. Int.** 62: 324-330 (2012).

6. Kee, H. J., Kim, J-R, Joung, H., Choe, N., Lee, S. E., Eom, G. H., Kim, J. C., Geyer, S. H., Jijiwa, M., Kato, T., Kawai, K., Weninger, W. J., Seo, S. B., Nam, K-I., Jeong, M. H., Takahashi, M. and Kook, H.  
Ret finger protein inhibits muscle differentiation by modulating serum response factor and enhancer of polycomb 1.

**Cell Death Differ.** 19: 121-131 (2012).

[学会発表](計3件)

1 Takahashi, M., Enomoto, A. and Asai, N.  
Roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis.

International Symposium on Nanomedicine

(Nagoya University, Nagoya)

January 13-14, 2014.

2. Takahashi, M.

Roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis.

Joint meeting of the Medical School of Nagoya University and the University of Adelaide

(The University of Adelaide, Adelaide, Australia)

May 27, 2013

3. Horio, M., Kato, T., Enomoto, A., Asai, N., Murakumo, Y., Shibata, K., Kikkawa, F. and Takahashi, M.

RET finger protein related to early cancer recurrence and potential therapeutic target in ovarian cancer.

第71回日本癌学会学術総会(ロイトン札幌、札幌市)

2012年9月19日-21日

[その他]

ホームページ:

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 雅英 (TAKAHASHI MASAHIDE)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 40183446

(2)研究分担者

村雲 芳樹 (MURAKUMO YOSHIKI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号: 40324438

加藤 琢哉 (KATO TAKUYA)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 00551970

(3)連携研究者: 無