

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462338

研究課題名(和文) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤SAHAのオートファジー細胞死誘導機構の解析

研究課題名(英文) The mechanisms of autophagic cell death induction by histone deacetylase inhibitor SAHA

研究代表者

岡田 貴充 (Okada, Takamitsu)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70525550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：SAHAによるautophagy誘導タンパクの発現量とヒストンアセチル化に相関はなかった。SAHAによりG2/Mのpopulationの量が増加する事が確認できたが、細胞周期G2/M導入時期・LC3-2発現量増加時期には特定の傾向はなかった。SAHAは細胞内にautophagosomeの形成を促進させることが確認できたが、autophagosomeの形成時期に一定の傾向は無くautophagy導入時期を同定できなかった。骨肉腫細胞株Saos2を用いて多剤耐性骨肉腫細胞動物モデルの作成を試みたが、doxorubicin25 ng/mlで細胞が死滅し、多剤耐性株の獲得に至らなかった。

研究成果の概要(英文)：There was no correlation between the expression of autophagy-related protein and acetylation of the histone. I was able to confirm that quantity of population of G2/M increased by SAHA. However, there was no correlation between G2/M introduction time and LC3-2 expression increasing time. SAHA induced the formation of autophagosome in a cell. I observed the period of the formation of autophagosome, there was no tendency of this period. I tried the making of the multidrug-resistant osteosarcoma cell animal model using osteosarcoma cell line: Saos2, but this cell line died the concentration of 25 ng/ml Dox. We could not make the multidrug-resistant Saos2 cell line.

研究分野：整形外科

キーワード：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 オートファジー細胞死 多剤耐性骨肉腫細胞株

1. 研究開始当初の背景

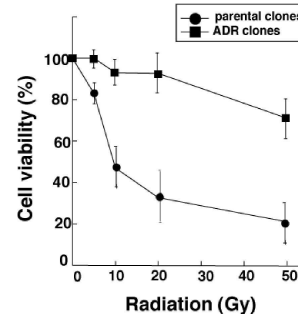
骨肉腫、Ewing 肉腫は若年者の骨・軟部組織に発生する腫瘍であり、小児がんのおよそ3%を占める再発・遠隔転移傾向の強い、悪性度の高い腫瘍である。様々な治療法の進歩により、5年生存率がいずれも約60%に改善したが、再発例の5年生存率は20%前後と依然として著しく不良であり、新たな治療法の開発が必要である。再発例に対する治療では、外科療法に加え、セカンドラインケモセラピーを追加しても予後は改善できないとの報告があり、再発した腫瘍は既存の抗癌剤に対して耐性を獲得していることが考えられる。骨肉腫、Ewing 肉腫に対する抗癌剤として、Doxorubicin は全てのレジメに含まれる key drug であるが、Doxorubicin は P-glycoprotein(P-gp)、MRP1 といわれる多剤耐性因子の一つである Efflux pump の基質となるため、骨肉腫・Ewing 肉腫の多剤耐性機序には P-gp、MRP1 が関与していることが示唆される。Ewing 肉腫では11番染色体と22番染色体の間で染色体相互転座が認められ、その結果、EWS-Flt1 融合遺伝子が形成され、これが異常な転写因子として機能し、細胞周期抑制因子である p21^{cip1} および p27^{kip1} の発現を抑制することを見いだした(Tanaka et al. J Clin Invest. 1997, Matsumoto et al. Br J Cancer 2001, Nakatani et al. J Biol Chem. 2003, Matsunobu et al. Clin Cancer Res. 2004)。

この EWS-Flt1 により発現抑制される p21^{cip1} を標的とした最近開発された分子標的治療薬として、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬(HDACIs)がある。HDACIs は新規抗癌剤として近年特に有望視されており、我々はその一つである FK228 が Ewing 肉腫に対して有効であることを報告した(Sakimura et al. Int J Cancer 2005)。そこで私は P-gp、MRP1 の発現を示す多剤耐性骨肉腫・Ewing 肉腫細胞株を樹立し、これらへの FK228 の抗腫瘍効果を調べたが、HDACIs の中でも FK228 が属す Cyclic-tetrapeptide 群は P-gp、MRP1 の基質となり、これらを発現する腫瘍に対しては交叉耐性を示すことが明らかになったため(Okada et al. Int J Cancer 2005)、これらに有効な HDACIs の存在を調査することが必要となった。HDACIs のなかで他の category に属す suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)がこれら多剤耐性骨肉腫・Ewing 肉腫細胞に抗腫瘍効果を示すこと明らかにできた。

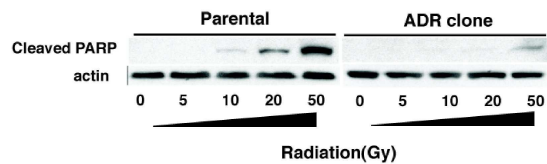
我々はこの研究において SAHA の抗腫瘍メ

カニズムを解析したが注目すべき事を明らかにした。我々が樹立した多剤耐性骨肉腫細胞である MNNG/ADR は Efflux pump である P-gp、MRP1 を発現することにより様々な薬剤に対して耐性を示しているが、この MNNG/ADR は X

A.



B.



(図 1)

線に対しても強い耐性があり、X 線による apoptosis 誘導に抵抗性を示している細胞株であることが明らかになった。

しかし SAHA はこの apoptosis 抵抗性を示す MNNG/ADR に対して親株 MNNG/S と全く同じ濃度で抗腫瘍効果を示すことが確認できたため、MNNG/ADR に対しては apoptosis と異なる pathway を利用して抗腫瘍効果を発揮しているのではとの仮説をたてた。その一つの中で最近特に注目されているものとして autophagic cell death という現象がある。もともと autophagy という現象はユビキチン・プロテアソーム系と並ぶ二大細胞内蛋白分解系の一つで細胞内のオルガネラ等の器官をまるごと autophagosome といわれる vesicle でつつみこみ分解してしまう現象である。Autophagic cell death はこの autophagy を利用した細胞死で programmed cell death type 2 に分類され、特に注目されていた。今まで使用されている抗腫瘍治療は、抗腫瘍薬、X 線などを含め主に apoptosis を介して抗腫瘍効果を発揮しているため、これらの治療に抵抗性を示すもの、またこれらの治療を施行した後に再発したものは apoptosis に対して抵抗性を示している可能性が高い。従って既存の apoptosis とは異なる autophagy という現象を介して抗腫瘍効果

を發揮できる薬剤は現存の治療で無効とされている症例に対して画期的なものとなりうる可能性がある。この様に画期的な抗腫瘍薬となりうる SAHA を早急に臨床応用する必要があった。我々はアニマルモデルで SAHA による多剤耐性骨肉腫細胞株への抗腫瘍効果を確認することに成功した。

2. 研究の目的

今回の研究目的は、「SAHA による autophagic cell death の誘導メカニズムを明らかにすること」である。予備実験で SAHA を投与すると細胞は G2/M 期に入ることが明らかになった。そこで本研究では「SAHA が細胞周期 G2/M 期を誘導する機序」「autophagic cell death と細胞周期 G2/M 期の関係」について検討したい。

3. 研究の方法

A) SAHA による G2/M 期誘導メカニズムの解析

SAHA を様々な濃度で MNNG/ADR 細胞株に投与し 24 時間培養したのち、細胞を回収し、抗ATR抗体、抗Chk1リン酸/非リン酸化抗体、抗Cdc25Aリン酸/非リン酸化抗体、抗Cdc 2リン酸/非リン酸化抗体(Wako社)を用いて Western-blotting を施行する。この際SAHA による作用である確認のために、acetylated histone H3 抗体キットを用いてヒストンのアセチル化も定量する。ATR、Chk1、Cdc25A、Cdc2 の発現量及びリン酸化ステータスの観察よりSAHA がどのタンパクの発現量を調節することによりG2/M のpopulation を増加させているのかを観察する。また経時的に回収したサンプルから細胞周期関連タンパクの Western blotting を行いこれらのタンパクの経時的発現量の変化を観察し、autophagy 導入時期とG2/M arrest の生じる時期を観察する。

(B)細胞周期G2/M 期とautophagy 発生の関係の調査

先行研究においてG2/M 期のpopulation が上昇してくる時間はSAHA 投与後12 時間後、autophagy 誘導タンパク LC3-2 の誘導が上

昇し出す時間が8時間後であることが分かっている。そこで、SAHA 投与後からの時間を2 時間おきに細胞周期解析用と抗LC3-2 抗体を用いたWestern blotting 用に細胞を回収する。細胞周期G2/M 導入時期・LC3-2 発現量増加時期の詳細な観察からG2/M、autophagy の導入時期の順序を確定させる。細胞周期G2/M 期とautophagy 発生の関係の調査:電子顕微鏡による観察でSAHAはautophagic cell death を誘導させる際には、細胞内にautophagosome の形成を促進させることを確認している。電子顕微鏡は同大学生体防御医学研究所施設内のものを使用し我々の施行した方法を用いる(Yamamoto et al. Anticancer Research 2008)。SAHA投与から1 時間ごとに細胞を回収し経時的にautophagosome の形成を観察する。タンパクの動きとautophagosome の形成という現象の双方からautophagy 導入時期を詳細に検討する。

(C)多剤耐性骨肉腫細胞動物モデルの作製。

1st step:多剤耐性骨肉腫細胞株Saos2/ADR の獲得。2nd step:獲得したSaos2/ADR のマウスへの生着。

骨肉腫細胞株Saos2を行う。以前施行した方法(Okada et al. Int J Cancer 2005)で行う。細胞を培養する培養液にdoxorubicin を2.5, 5, 10, 25, 50, 100ng/ml の6 段階に徐々に濃度を上げながら培養を続け、高濃度のdoxorubicin下でも生存可能な細胞を耐性株として数クローン採集する。樹立には前回の経験では約10ヶ月は要する予定である。多剤耐性骨肉腫細胞動物モデルの作製:前回と同様の手技で獲得予定であるSaos2/ADR をantymic nu/nu/mice に xenograft を行い生着を試みる(Li. Et al. Int J Cancer)。皮下に5×10⁶、1×10⁷、2×10⁷、5×10⁷ と様々な濃度の細胞を注入する。

多剤耐性骨肉腫細胞動物モデルの作製及び動物モデルへのSAHA 投与実験□

以前Ewing肉腫2細胞株から多剤耐性細胞株を樹立しマウスモデルを樹立する事に成功したが、施行開始から動物モデル樹立までに約4年を要した。今回は3年以内で樹立する予定である。様々なXenograft model を検討した論文を参照すると、細胞株の性質によりマウスの皮下に生着するものとならないものが存在するようである。Ewing 肉腫細胞株は2種が生着したが、骨肉腫細胞株の生着は全く確認できていない。腫瘍の生着が可能であれば、3週間皮下培養し、前回の実験(平成21年度科研費助成による実験と同様にSAHA 含有PBS 液を腹腔内連日投与を3週間施行する。各濃度に5匹づつのマウスを用意する。腫瘍の長径(A)と短径(B)およびマウスの体重SAHA 投与後3週間測定する。腫瘍サイズを $A \times B \times \pi / 6$ の公式から算出し、抗腫瘍効果の有無を算定する。またSAHAのマウスに対する副作用の有無を測定した体重から検討する。Saos2で獲得が困難な場合、他の骨肉腫細胞株から多剤耐性細胞株の樹立を同時に順次開始する。

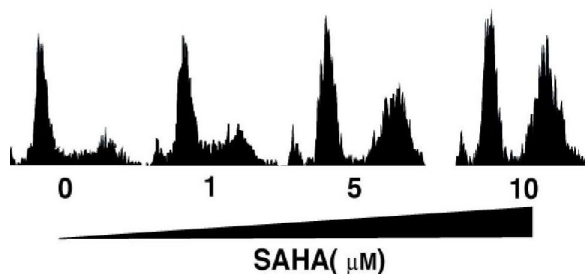
4. 研究成果

A)SAHA によるG2/M 期誘導メカニズムの解析：SAHA を様々な濃度でacetylated histone H3 抗体キットを用いてヒストンのアセチル化も定量したが、抗ATR抗体、抗Chk1リン酸/非リン酸化抗体、抗Cdc25Aリン酸/非リン酸化抗体、抗Cdc 2リン酸/非リン酸化抗体によるWestern-blottingでの発現確認量とは相関が見られなかった。

(B)細胞周期G2/M 期とautophagy 発生の関係の調査

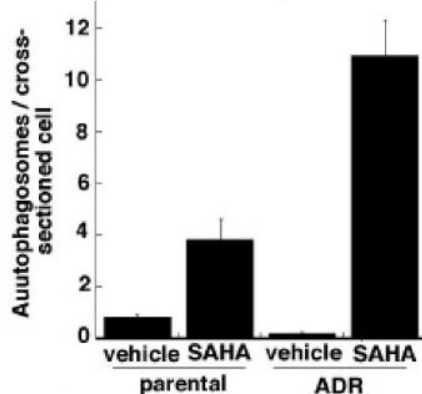
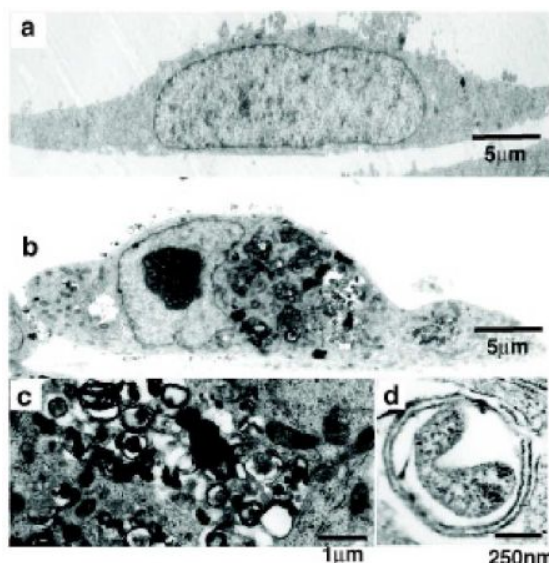
SAHAの投与とともにG2/M のpopulationの量が増加する事が確認できた(図2)

(図2)



細胞周期G2/M 導入時期・LC3-2 発現量増加時期の詳細な観察からG2/M、autophagyの導入時期の順序を観察したが、特定の傾向は見いだせなかった。電子顕微鏡による観察でSAHAは細胞内にautophagosomeの形成を促進させることが確認できた(図3)。

(図3)



時間ごとに細胞を回収し経時的にautophagosome の形成を観察したが、こちらでも形成される時間が一定せずautophagy 導入時期の同定までは至らなかった。

(C)多剤耐性骨肉腫細胞動物モデルの作製。

骨肉腫細胞株 Saos2 を用いて以前施行した方法(Okada et al. Int J Cancer 2005)で多剤耐性細胞株の樹立を試みたが細胞を培養する培養液に doxorubicin を 2.5, 5, 10, 25, と段階的に濃度を上げて培養したところ、25 ng/ml の濃度で細胞が死滅し多剤耐性株の獲得に至らなかった。

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 2 件)

Effect of the Optimal Asymmetry on the Strength of Six-Strand Tendon Repair: An Ex Vivo Biomechanical Study. Kozono N, Okada T, Takeuchi N, Shimoto T, Higaki H, Nakashima Y. J Hand Surg Am. 42(4) 250-256

In vivo kinematic analysis of the glenohumeral joint during dynamic full axial rotation and scapular plane full abduction in healthy shoulders. Kozono N, Okada T, Takeuchi N, Hamai S, Higaki H, Ikebe S, Shimoto T, Miake G, Nakanishi Y, Iwamoto Y. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2016 Aug 10. 1-9

〔学会発表〕(計 1 件)

The ORS 2017 Annual Meeting. (2017.3.19~22. San Diego, California) In Vivo Kinematic Analysis of the Glenohumeral Joint during Dynamic Full Axial Rotation and Scapular Plane Full Abduction. Kozono N, Okada T, Takeuchi N, Shimoto T, Higaki H, Nakashima Y

〔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：
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

岡田 貴充 (OKADA TAKAMITSU)
九州大学大学病院・助教
研究者番号：70525550