

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861069

研究課題名(和文) ヒストン制御による肝胆膵領域悪性腫瘍の上皮間葉転換制御と化学療法抵抗性の克服

研究課題名(英文) A Histone Deacetylase Inhibitor Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition and Attenuates Chemoresistance in Biliary Tract Cancer

研究代表者

阪本 卓也 (Sakamoto, Takuya)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40645074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胆道癌細胞株において、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の一種である vorinostat が、癌の悪性度に関与する上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition; 以下 EMT) を阻害し、化学療法抵抗性を減弱させることを示した。その機序として、EMT 誘導因子である TGF- $\beta$ 1 のシグナル伝達分子である SMAD4 の核内移行を阻害することを示した。また、gemcitabine 耐性株を皮下移植したマウスにおいて、vorinostat と gemcitabine の併用は gemcitabine 単剤と比較して生存期間の延長を認めた。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is involved in the characteristics of malignancy. In biliary tract cancer (BTC), EMT is induced by transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1). We focused on histone deacetylase (HDAC) inhibitors as regulators of TGF- $\beta$ 1 signaling. We employed BTC cell lines and used vorinostat as the HDAC inhibitor. In the parent BTC cell lines, TGF- $\beta$ 1 induced EMT and chemoresistance; while, vorinostat inhibited the EMT and chemoresistance induced by TGF- $\beta$ 1. In gemcitabine-resistant cell lines that highly expressed TGF- $\beta$ 1, vorinostat inhibited EMT and attenuated chemoresistance. We showed that vorinostat inhibits nuclear translocation of SMAD4 which is a signaling factor of TGF- $\beta$ 1. Furthermore, combination therapy with vorinostat and gemcitabine improved survival time in the mice xenografted with gemcitabine resistant MzChA-1 cells. In conclusion, vorinostat regulated TGF- $\beta$ 1-induced EMT and chemoresistance through inhibition of SMAD4 nuclear translocation.

研究分野：消化器外科

キーワード：胆道癌 上皮間葉転換 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 SMAD4 TGF- $\beta$ 1

### 1. 研究開始当初の背景

胆道癌は消化器癌の中では膵癌に次いで予後不良であり、5年生存率は30%にも満たない。外科的切除以外に根治的治療法は存在せず、早期発見が困難なため、診断時には切除不能であることも少なくない。切除不能症例や転移・再発症例に対してはシスプラチンやゲムシタピン、TS-1などを用いた化学療法が行われているが、切除不能症例の中央生存期間は7.6ヶ月と非常に短く、十分な効果が得られているとは言い難い。このため、胆道癌の治療成績の向上のための有効な新規治療戦略の開発は急務であると言える。

胆道癌の予後改善のために、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) やシグナル伝達、DNA修復、アポトーシスなど多くの分子生物学的研究がなされている (Kobayashi S, et al.: Gastroenterology 2005, 2054-65; Nitta T, et al. Br J Cancer 2014, 1363-72; Mott JL, et al.: Oncogene 2007, 6133-40)。その中で我々は、癌の悪性度との関連が報告されている EMT に着目した。EMT とは上皮系の性質をもった細胞が間葉系の性質をもった細胞へと変化する現象をさし、種々の癌の浸潤や転移、化学療法抵抗性との関与が報告されている。

EMT をおこした癌細胞は細胞間接着分子 (E-Cadherin など) の発現を抑制し、浸潤能や転移能、化学療法抵抗性を獲得するとされる。一方で、EMT をおこした細胞は、間葉上皮転換とよばれる逆の現象をおこすことから、EMT は可逆的なものであり、種々の因子によって制御されていると考えられる。代表的な例として、炎症性サイトカインである TGF- $\beta$  は、EMT を誘導する因子として知られている (Yamada D, et al.: Eur J Cancer 2013, 1725-40)。

我々は、EMT が可逆的であることから、epigenetics に着目し、特にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC inhibitor) と EMT についての研究を行ってきた。ヒストンのアセチル化、脱アセチル化は遺伝子の制御にとって重要な役割を担っている。ヒストンが高アセチル化されている染色体領域は遺伝子の転写が活発であることから、アセチル化によって遺伝子の発現は正に調節し、脱アセチル化により負に調節されていると考えられている。HDAC inhibitor は脱アセチル化を阻害することから、種々の遺伝子の発現を正に制御すると考えられる。HDAC inhibitor は、その他にもアポトーシス作用などが報告されており、その作用の多様性から、世界中で癌に対する有効性の検討がなされており、その有効性の報告も増加してきている (Dizon DS et al.: Int J Gynecol Cancer 2012, 979-86; Fakih MG et al.: Cancer Chemother Pharmacol 2012, 743-51)。

HDAC inhibitor は種々の細胞において

EMT を抑制することが報告されているが、その詳しい作用機序や、胆道癌における効果についての報告はほとんど存在しない。

胆道癌において TGF- $\beta$  は EMT の誘導に深く関与しており、TGF- $\beta$  の制御は EMT の抑制につながる可能性がある。HDAC inhibitor は正常肝細胞や中皮細胞で TGF- $\beta$  のシグナル伝達分子である SMAD4 の核内移行を阻害することで、TGF- $\beta$  による EMT の誘導を阻害すると報告されている (Kaimori A, et al.: Hepatology 2010, 1033-45; Chung CL et al.: Am J Respir Cell Mol Biol 2012, 437-45)。これらの報告から、癌細胞においても、HDAC inhibitor が TGF- $\beta$  の働きを阻害することで EMT を抑制し、化学療法抵抗性を制御できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、EMT 制御の観点から、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の胆道癌における効果とその作用機序を明らかにし、化学療法の効果に乏しい胆道癌の治療成績の向上を目指すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、胆道癌細胞株である MzChA-1 と TFK-1 およびこれらの細胞株を GEM に反復曝露することで樹立した GEM 耐性株 (MzChA-1<sub>GR</sub>、TFK-1<sub>GR</sub>) を使用した。HDAC 阻害剤は、多くの臨床試験で用いられている vorinostat を選択した。

#### (1) class I HDAC (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8) の発現レベルおよび HDAC 活性と TGF- $\beta$ 、化学療法抵抗性の関係性についての検討

胆道癌細胞株 (MzChA-1) の親株と TGF- $\beta$  曝露株、GEM 耐性株 (MzChA-1<sub>GR</sub>) における class I HDAC の mRNA レベルでの発現を qRT-PCR 法で比較することで、TGF- $\beta$  および GEM 耐性と HDAC の発現の関係性について検討する。また HDAC 活性についても、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay を用いてこれらの細胞株で比較を行い、HDAC の発現と化学療法抵抗性の関係性について検討する。

#### (2) GEM 耐性株における TGF- $\beta$ の siRNA 導入による TGF- $\beta$ と EMT および化学療法抵抗性の関係性についての検討

MzChA-1 と MzChA-1<sub>GR</sub> において、TGF- $\beta$  の発現レベルを qRT-PCR 法で比較する。その結果を踏まえ、MzChA-1<sub>GR</sub> に対して TGF- $\beta$  の siRNA を導入し、TGF- $\beta$  をノックダウンすることによる EMT および化学療法抵抗性に与える影響について検討し、胆道癌における EMT および化学療法抵抗性と TGF- $\beta$  の関係性について明らかにする。

### (3) vorinostat が TGF- $\beta$ により誘導される EMT および化学療法抵抗性に与える影響についての検討

TGF- $\beta$  は胆道癌において EMT および化学療法抵抗性を誘導することが報告されている。TGF- $\beta$  によって誘導された EMT および化学療法抵抗性に対して vorinostat が与える影響を調べるため、MzChA-1 の親株、TGF- $\beta$  曝露株、TGF $\beta$  + vorinostat 曝露株の 3 群間で、EMT 関連因子の発現変化と GEM 耐性の変化を qRT-PCR および MTT assay を用いて検討した。

### (4) vorinostat が GEM 耐性株において EMT および化学療法抵抗性に与える影響についての検討

胆道癌の GEM 耐性株では TGF- $\beta$  が高発現していることから、GEM 耐性株においても、TGF- $\beta$  が EMT を誘導している可能性がある。TGF- $\beta$  が高発現している GEM 耐性株に対して vorinostat が与える影響を、EMT 関連因子の発現変化と GEM 耐性の変化を qRT-PCR および MTT assay を用いて検討した。

### (5) vorinostat が TGF- $\beta$ に関連した EMT の誘導を制御する機序についての検討

vorinostat が EMT を抑制する機序を明らかにするために、親株、TGF- $\beta$  曝露株、TGF- $\beta$  + vorinostat 同時曝露株の 3 種において、TGF- $\beta$  のシグナル伝達分子である SMAD2、SMAD3、SMAD4 の細胞全体あるいは核での発現変化を western blotting を用いて比較検討した。

### (6) *in vivo* における vorinostat と GEM 併用効果についての検討

MzChA-1 と MzChA-1<sub>GR</sub> を NOD/SCID マウスの皮下に注射することで親株と GEM 耐性株の皮下腫瘍モデルを作成し、*in vivo* における vorinostat と gemcitabine の併用効果を検討した。さらに、腫瘍モデルマウスの皮下腫瘍および転移巣(肺)の組織を用いて SMAD4 の免疫組織染色を行い、細胞実験で得られた結果との整合性を検討した。

## 4. 研究成果

胆道癌細胞株 (MzChA-1) の親株と GEM 耐性株 (MzChA-1<sub>GR</sub>) における class I HDAC (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8) の mRNA レベルでの発現比較において、いずれの HDAC も GEM 耐性株で有意に発現が上昇していた ( $p < 0.05$ )。HDAC 活性についても、親株と比較して TGF- $\beta$  曝露株と GEM 耐性株において活性が上昇していた ( $p < 0.05$ )。

GEM 耐性株では TGF- $\beta$  が高発現していることから、GEM 耐性株に対して TGF- $\beta$  の siRNA を用いて TGF- $\beta$  のノックダウンを行ったところ、EMT の抑制および GEM 耐性の減弱を認めた ( $p < 0.05$ )。この結果から、胆道癌の GEM 耐性は TGF- $\beta$  による EMT の誘導と深く関係があり、TGF- $\beta$  を阻害することで化学療法耐性が減弱することが示唆された。

2 種の胆道癌細胞株 (MzChA-1、TFK-1) において、親株を TGF- $\beta$  に曝露することで EMT および GEM 耐性が誘導されたのに対し、vorinostat と TGF- $\beta$  に同時に曝露した場合、EMT および GEM 耐性の誘導はみられなかった。GEM 耐性株 (MzChA-1<sub>GR</sub>、TFK-1<sub>GR</sub>) を vorinostat に曝露した場合も、EMT は抑制され、GEM 耐性の減弱を認めた。

vorinostat が胆道癌の EMT を抑制する機序を調べるため、TGF- $\beta$  のシグナル伝達分子である SMAD2、SMAD3、SMAD4 の発現を western blotting を用いて比較したところ行ったところ、核蛋白において、TGF- $\beta$  曝露株で p-SMAD2、p-SMAD3、SMAD4 の発現上昇がみられ、TGF- $\beta$  + vorinostat 曝露株ではこのような発現上昇はみられなかった。

胆道癌細胞株 (MzChA-1、TFK-1) およびそれぞれの GEM 耐性株 (MzChA-1<sub>GR</sub>、TFK-1<sub>GR</sub>) を NOD/SCID マウスの皮下に注射することで胆道癌皮下腫瘍モデルを作成した。このマウスを用いた vorinostat の効果の検討では、GEM 耐性株の皮下腫瘍モデルにおいて、GEM 単剤群と比較して GEM + vorinostat 併用群で生存期間の有意な延長を認めた ( $p < 0.05$ )。GEM 耐性株の皮下腫瘍モデルにおいて、増大した皮下腫瘍と転移巣(肺)の腫瘍組織を採取し、SMAD4 の免疫組織化学染色を行った。その結果、皮下腫瘍、転移巣共に GEM 単剤群では腫瘍細胞の核が強く染色されたのに対し、GEM + vorinostat 併用群では核はほとんど染色されなかった。

これらの結果から、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である vorinostat は、TGF- $\beta$  のシグナル伝達阻害を介して EMT および化学療法抵抗性を抑制し、胆道癌に対する新規治療薬となり得る可能性が示唆された。

## 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)

Sakamoto T, Kobayashi S, Yamada D, Nagano H, Tomokuni A, Tomimaru Y, Noda T, Gotoh K, Asaoka T, Wada H, Kawamoto K, Marubashi S, Eguchi H, Doki Y, Mori M. A Histone Deacetylase Inhibitor Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition and Attenuates Chemoresistance in Biliary Tract Cancer. *PLoS One*. 2016 Jan 4;11(1):e0145985. doi: 10.1371/journal.pone.0145985.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 胆道癌細胞株における HDAC 阻害剤を用いた上皮間葉転換の制御。阪本卓也, 小林省吾, 富丸慶人, 和田浩志, 濱直樹, 川本弘一, 江口英利, 梅下浩司, 永野浩昭, 土岐祐一郎, 森正樹. 第 114 回日本外科学会学術集会, 2014 年 04 月, 京都

- 市。
2. 胆道癌における HDAC 阻害剤を用いた上皮間葉転換と化学療法抵抗性の制御。 阪本卓也，小林省吾，和田浩志，友國晃，富丸慶人，浅岡忠史，川本弘一，江口英利，梅下浩司，永野浩昭，土岐祐一郎，森正樹。第 115 回日本外科学会学術集会，2015 年 04 月，名古屋市。
  3. HDAC 阻害剤を用いた胆道癌における上皮間葉転換と化学療法抵抗性の制御。 阪本卓也，小林省吾，友國晃，富丸慶人，和田浩志，濱直樹，川本弘一，丸橋繁，江口英利，梅下浩司，永野浩昭，土岐祐一郎，森正樹。第 69 回日本消化器外科学会総会，2014 年 07 月，郡山市。
  4. 胆道癌における HDAC 阻害剤を用いた SMAD4 核内移行の制御。 阪本卓也，小林省吾，和田浩志，浅岡忠史，川本弘一，丸橋繁，江口英利，永野浩昭，土岐祐一郎，森正樹。第 70 回日本外科学会総会，2015 年 07 月，浜松市。
  5. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が胆道癌細胞株の上皮間葉転換に与える影響。 阪本卓也，小林省吾，和田浩志，富丸慶人，友國晃，浅岡忠史，川本弘一，丸橋繁，江口英利，梅下浩司，永野浩昭，土岐祐一郎，森正樹。第 24 回日本がん転移学会学術集会，2015 年 7 月，大阪市。

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

阪本卓也 (SAKAMOTO, Takuya)

大阪大学・医学部付属病院・医員

研究者番号：40645074