

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：27102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893215

研究課題名(和文) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の抗癌活性の新たなスクリーニング法の開発

研究課題名(英文) To develop a novel screening method of histone deacetylase (HDAC) inhibitor having anticancer activity

研究代表者

藤井 誠子 (FUJII, SEIKO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80714659

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)：様々な癌の治療法があるがヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)のようなエピジェネティックな修飾は腫瘍の成長に関係し、それらを阻害するHDAC阻害剤は、癌治療において注目されている。

今回の研究において我々はKy-2という2つのHDAC阻害剤(TSA, TPX)からなるハイブリッドコンパウンド型の新規HDAC阻害剤を使用しヒト扁平上皮癌細胞に対する細胞増殖能、細胞周期、細胞周期およびアポトーシス関連タンパク質の発現を解析した。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic modifications such as histone deacetylation are commonly related to tumor development and histone deacetylase (HDAC) inhibitors have been shown to be potential drugs for cancer treatment. Ky-2 is a novel HDAC inhibitor produced by a combination of the HDAC inhibitors TSA and TPX.

In the present study, we investigated the effectiveness of Ky-2 to induce cell cycle and apoptosis in oral squamous carcinoma cells. In addition, we examined the signaling pathway related to the cell cycle and apoptosis in Ky-2-treated oral squamous carcinoma cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：HDAC阻害剤 口腔癌 テロメラ ゼ

## 1. 研究開始当初の背景

最近の研究から、癌細胞にはジェネティックな遺伝子異常に加えて、エピジェネティックの異常が蓄積していることが明らかになってきた。これに対し、ヒストン修飾異常を標的とした治療薬であるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤が開発され、臨床への応用が試みられている。申請者が所属する九州歯科大学は、九州工業大学と全国初の「歯工学連携」を締結し、その中で新規 HDAC 阻害剤 Ky-2 の開発を共同で行ってきた。

これまで申請者は、*in vitro* の実験系で、マウスミエローマ細胞およびヒトミエローマ細胞、ヒト扁平上皮癌細胞に対する Ky-2 の効果を、分子生物学的手法を用いて検討してきた。Ky-2 は、既存の HDAC 阻害剤と比較し、より低濃度で著しい細胞増殖抑制を認め、細胞周期の停止やアポトーシスを誘導した。また、*in vivo* の実験系において、マウス脾臓から抽出した B 細胞ならびに T 細胞に対し、Ky-2 は細胞死を誘導しなかった。このことから、新規の HDAC 阻害剤である Ky-2 は、正常細胞に対して抗腫瘍効果を認めず、癌細胞には細胞毒性を持つことが明らかとなり、*Biochemical and Biophysical Research Communications* (2013 年) および *Journal of Biophysical Chemistry* (2012 年) に報告してきた。

また、一般的に癌組織の多くでテロメラーゼ活性化が起きていることが報告され、特に肺癌や食道癌組織では顕著に観察されている。正常細胞では、p53 や Rb 遺伝子などの癌抑制因子の働きにより細胞分裂が停止されるが、癌細胞では、これらの遺伝子に変異が生じ、テロメラーゼ活性が増加し、癌細胞は異常に増殖していく。

テロメラーゼ活性測定法 TRAP (Telomeric repeat amplification protocol) assay (図 3) があるが、高額な機器が必要で、複雑な専門的な操作を必要とし、7 時間以上の時間

がかかる欠点があげられた。そこで、申請者が所属する顎顔面外科学分野と九州工業大学は、電気化学的テロメラーゼ活性測定法 (Sato, S., et al. *Analytical Chemistry* 2005. Sato, S., et al. *Journal of Organometallic Chemistry* 2008) を用いた癌診断システムを開発中である。このシステムを利用することで、約 30 分で判定可能で、操作も非常に簡便である。このシステムを使用し、Ky-2 が誘導するエピジェネティックな効果が、癌組織のテロメラーゼ活性の変化にどのような影響を与えるかを検討し、HDAC 阻害剤だけでなくテロメラーゼ阻害の効果を併せ持つ新規 HDAC 阻害剤の臨床応用開発を目指すことが今回の背景であった。

## 2. 研究の目的

現在、様々な癌治療法が存在する中で、効果的な治療方法としてテーラーメイド治療が行われている。患者の癌遺伝子タイプに応じた治療であるということから、より適切な治療法や、より効果的な抗癌剤、さらに副作用の発生頻度予測が可能となる。しかし、検査は高価で長時間を要し、患者に大きな負担をともなうことから、遺伝子自体にターゲットをおいたエピジェネティクスな効果をもつ薬剤開発が求められている。我々は、九州工業大学と共同で、新規のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を開発し、様々な癌細胞に対する致死活性発現に関する研究を行ってきた。また一方で、癌細胞におけるテロメラーゼ活性を簡便かつ迅速に調べる診断システムを九州工業大学と共同で開発中である。そこで、新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を作用させた際のテロメラーゼ活性変化を開発中のシステムにて解析し、薬剤感受性とテロメラーゼ活性の相関を解析し、癌細胞のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に対する感受性の違いが、治療予後にどのように関わるかについて、テロメラーゼを指標として調べるのが今回の研究目的であった。

### 3. 研究の方法

#### A. 癌細胞の維持

ヒト口腔癌由来の癌細胞株；ヒト扁平上皮癌細胞 (Ca9-22、BHY、HSC-3 細胞) を培養し細胞の維持を行った。

#### B. 細胞増殖能の判定 (Ky-2 感受性試験)

- 各細胞を 96 well plate に  $4 \times 10^5$  cells/well 播種。
- 各 HDAC inhibitor (Ky-2 および比較対象として SAHA を使用) を、1/2 dilution にて濃度調整し 細胞へ添加。
- 44 時間、培養。
- WST-1 を添加後、さらに 4 時間培養。
- 対照波長 450 nm、630 nm にて吸光度を測定。

#### C. 細胞周期の解析

- 各細胞を 6 well plate に  $1 \times 10^6$  cells/well 播種。
- Ky-2 (1  $\mu$ M) にて処理後、0、12、24、36 時間後 PI 染色を行い FACS にて測定。

#### D. アポトーシスの解析

- 各細胞を  $1 \times 10^6$  cells/well 播種。
- Ky-2 にて処理し 0、6、12、24 時間後細胞を回収し保存。
- SDS lysis buffer にて可溶化後 protein assay。
- Western blotting 解析。

#### E. テロメラゼ活性の解析

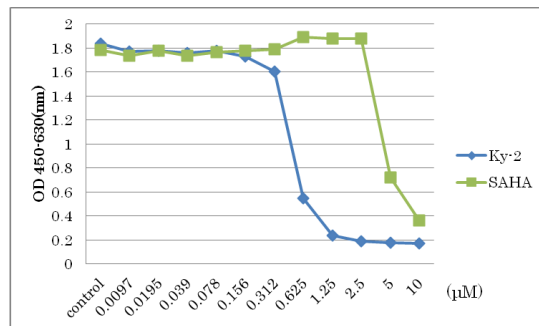
各細胞から mRNA を抽出し cDNA の合成を行いリアルタイム PCR にて TERT の発現量を比較した。

### 4. 研究成果

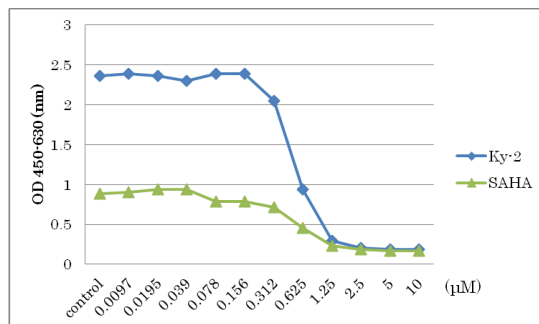
#### B.

WST-1 assay によって濃度依存的に細胞増殖能を抑制していることが分かった。また、比較試薬として既存の HDACi である SAHA を使用したが Ky-2 は、より低濃度で細胞増殖を抑制した。

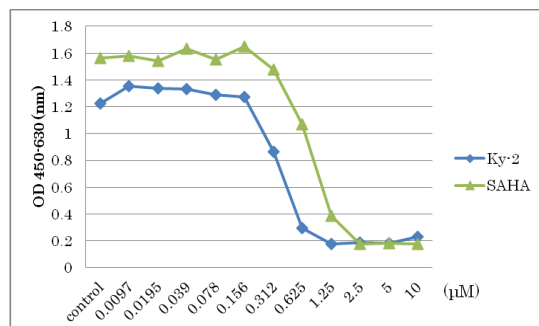
Ca9-22 cell:



BHY cell:

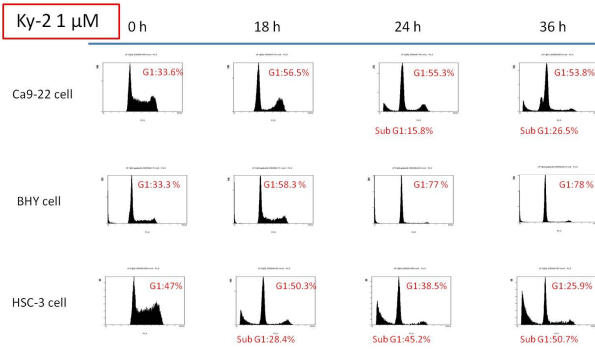


HSC-3 cell:



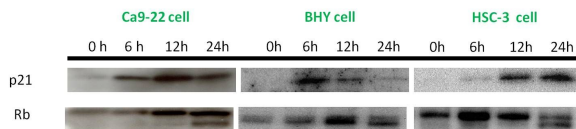
C.

FACS で解析したところ、Ca9-22 細胞および HSC-3 細胞にて G1 期での細胞周期の停止、および sub G1 期の細胞の割合の増加が認められた。

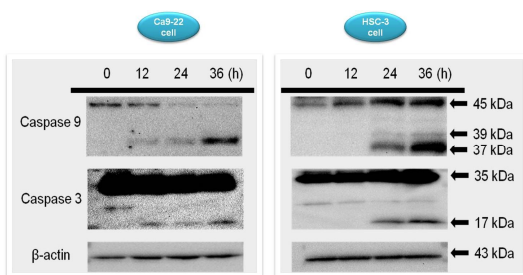


D.

細胞周期関連タンパク p21、Rb の発現をウエスタンブロット法で確認したところ、Ky-2 処理後の細胞において、p21 の発現上昇ならびに Rb の低リン酸化が認められた。



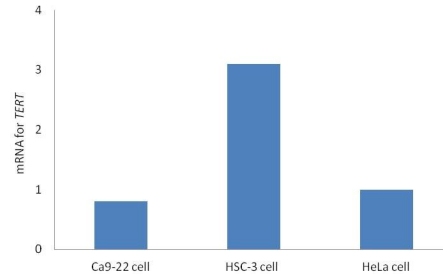
また、アポトーシス関連タンパク質 Caspase9,3 についてタンパク質発現レベルを確認した。



Ca9-22 細胞では 12 時間より活性型 caspase9、caspase3 タンパクの発現が確認できた。また、HSC-3 細胞では 24 時間より活性型 caspase9、caspase3 タンパクの発現が確認できた。

E.

Ca9-22 細胞および HSC-3 細胞から mRNA を抽出しテロメラゼの発現をリアルタイム PCR にて確認したところ、TERT の発現の上昇が認められた。



以上の結果より

1. ヒト扁平上皮癌細胞株に新規 HDAC 阻害剤 Ky-2 および 比較対象として既存の SAHA を投与したところ、極めて低濃度の Ky-2 により細胞増殖の抑制が認められた。

2. Ky-2 投与は、ヒト扁平上皮癌細胞において G1 期における細胞周期停止および、細胞周期関連タンパクの発現を誘導した。

3. Ky-2 は、ヒト扁平上皮癌細胞にアポトーシスを誘導した。さらに、このアポトーシスは Caspase 依存性シグナル経路により誘導されることが明らかになった。

4. また、ヒト扁平上皮癌細胞における TERT の発現を確認することができた。

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0件)

〔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  
藤井 誠子 (ふじい せいこ)

研究者番号：80714659

(2)研究分担者  
なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
なし ( )  
研究者番号：