

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08075

研究課題名(和文) がん細胞のHDAC阻害剤感受性を規定する分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism for determining the sensitivity of HDAC inhibitors in cancer cells

研究代表者

尾崎 恵一 (Ozaki, Kei-ichi)

大阪薬科大学・薬学部・教授(移行)

研究者番号：50252466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞における活性化ERK-MAPキナーゼ経路の遮断は、エピジェネティック異常を是正する新しい抗がん剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)感受性の上昇を生じるが、その感受性を規定する分子機構は未だ不明である。本研究では、エストラジオール添加によってERK経路の活性化が誘導できる二つの3T3-Raf-ER細胞とLK2-Raf-ER細胞において、アポトーシス誘導因子Bimに対する応答がHDACi感受性決定には非常に重要であることを明らかにした。すなわち、BimはHDACi感受性バイオマーカーとなる可能性がある。さらに、今後はERK経路下流のキナーゼMNKについても解析を進める。

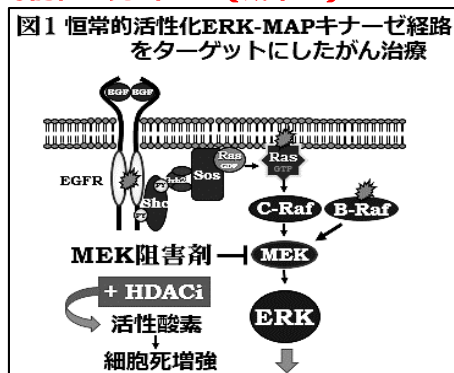
研究成果の概要(英文)：Blockade of constitutive activation of ERK-mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway in cancer cells increases the sensitivity of cells for new anticancer and epigenetic drug, histone deacetylase inhibitor(HDACi), however, the molecular mechanism which prescribes its sensitivity is now, unclear. In two model cells, 3T3-Raf-ER cells (normal cell model) and LK2-Raf-ER cells (cancer cell model) in which activation of ERK-MAPK pathway is induced by estradiol, proapoptotic factor Bim was very important to determine the HDACi-sensitivity in both cells. Bim could be a biomarker for determining HDACi-sensitivity. Next, we are planning to analyze the downstream kinase MNK as a new molecular target.

研究分野：生化学 分子生物学

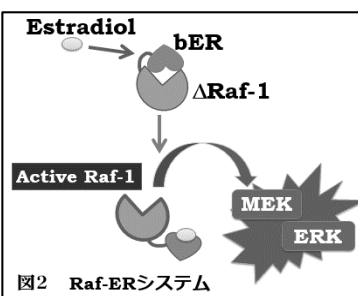
キーワード：HDAC阻害剤 ERK-MAPキナーゼ Bim がん分子標的

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子の突然変異(ジェネティック異常)を伴わない、DNAのメチル化やヒストンのアセチル化などのエピジェネティック異常による遺伝子発現異常と発がんとの関与が明らかになり、その異常を改善するエピジェネティック薬、**ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)**は新しい抗がん剤として注目されている。しかし、その抗腫瘍効果発現のための重要な標的や、治療予測バイオマーカーも不明確であり、未だに適応は皮膚T細胞リンパ腫のみで、抗がん剤としての適応がん種は限られたままである。一方、申請者は、これまで10年以上HDACiの抗がん作用に注目し、以下のような知見を明らかにした。細胞増殖シグナルの中心であるERK-MAPキナーゼ経路が、多くのがん細胞でEGFR、Ras、B-Raf等の活性化型変異(ジェネティック異常)により恒常的に活性化していることに注目し、その経路遮断剤(MEK阻害剤)による制がんを試みる過程で、HDACiとの併用が劇的な活性酸素蓄積、細胞死増強を誘導することを発見した(図1) [Biochem. Biophys. Res. Commun. (2006) (2010) (2013)] ⇒すなわち**ERK活性がHDACi感受性を低下させている可能性を見出した(成果A)**



そこで、**成果A**を踏まえ、ERK経路の活性化を誘導できる培養細胞システムを用いてHDACi感受性とERK活性化レベルとの相



関について詳細に検討した。図2の様

図2 Raf-ERシステム

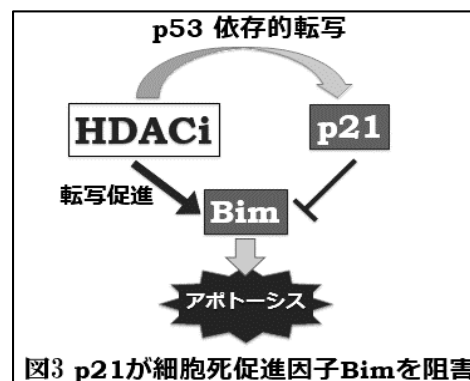
路が活性化される NIH3T3:ΔRaf-1:ER [Martin McMahon 博士より供与、Mol. Cell. Biol. 13: 6241(1993)] (以下 3T3-Raf-ER 細胞)に加えて、申請者らの研究室で同様のシステムをヒト肺がん細胞株 LK-2 に導入した LK2-Raf-ER 細胞に対して、E₂ 処理前後のHDACi感受性の变化を解析したところ、両システムで、全く逆の結果となった。ERK活性化誘導により、3T3-Raf-ER 細胞ではHDACi感受性の上昇、LK2-Raf-ER 細胞ではHDACi

感受性が低下した。⇒すなわち**ERKの活性化によってHDACi感受性は変化するが、細胞のタイプによっては全く逆の結果になる可能性を見出した。(成果B)**

ERK経路とHDACi感受性に関しては、他のグループの報告があり、活性化Rasの誘導により、HDACi感受性の上昇が見られた [Cancer Res. 67: 8477-8485(2007)]. この結果は、活性化ERKの上昇がHDACi感受性を増強するという点で、申請者らの3T3-Raf-ER細胞と同様の現象であるが、RAS/RAFの活性化起点の違いから、申請者らとは異なるメカニズムである可能性を見出しつつある。

次に、今後のHDACiの固形がんへの適応拡大を視野に入れた、ヒト各種固形がん細胞株に対するHDACi (HC-toxin) 感受性の解析の結果、**p53変異型の高感受性グループ**と**p53野生型の低感受性グループ**に分かれた。さらに、RNAi法による発現抑制実験により、HDACi感受性規定因子として、p53ではなく、p53ターゲット遺伝子であり、HDACiで誘導されることが知られる**CDKインヒビターp21**を見出した。HDACiで誘導されるp21発現を抑制すると、apoptosis mediatorであるBimの発現上昇とともにHDACi誘導性細胞死が増加した [第18回日本がん分子標的治療学会学術集会(2014)発表] ⇒**HDACiによって誘導されるp21がBimを阻害して細胞死を抑制している可能性を見出した(成果C)**

(図3)、HDACi感受性とp21との関係については、HDAC阻害物質と考えられるButyrateによる大腸がん細胞のアポトーシスをp21は阻害している [Oncogene 20, 3387-3398 (2001)] や、p21は、そもそもapoptosis阻害分子である [Mol Cancer Ther 1, 639-649 (2002)] との報告がある。

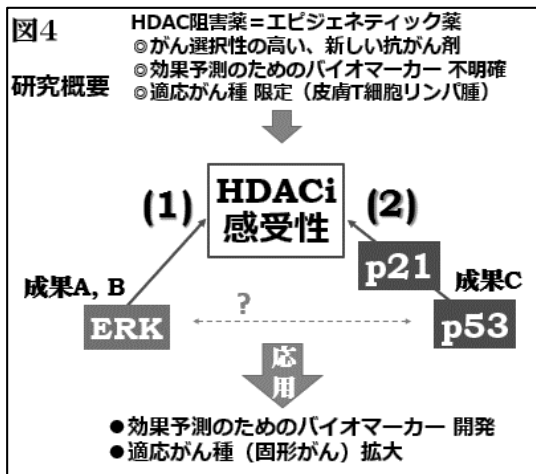


2. 研究の目的

DNAメチル化やヒストン修飾による遺伝子発現の制御 = **エピジェネティクス**の異常を是正する新しい抗がん剤、**ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)**は、がん選択性の高い薬剤であるが、未だに適応は難治性皮膚T細胞リンパ腫のみである。今後、個々のがんの遺伝子情報に基づいた「**がんの個別化治療**」において、適応がん種を拡大し、より有効なHDACi使用のためには、がん細胞のHDACi感受性を予測するための**バイオマ**

「カー」研究は急務である。申請者は、これまでがん細胞における活性化 ERK-MAP キナーゼ経路の遮断が劇的な HDACi 感受性の上昇を生じること、p53 野生型がん細胞ではその下流の p21 が HDACi 感受性の低下に働くことを見出している。そこで、本研究では、(1)ERK 活性化レベルと HDACi 感受性との関係と(2)p21 による HDACi 感受性低下の分子機構の二点に焦点をあてて解析することで、**HDACi 感受性を規定する分子機構の解明**をめざした。

3. 研究の方法



(1) **成果 A & B** から、ERK 活性化レベルと HDACi 感受性は相互に関連すると考えられるが、ERK 経路活性化誘導モデルでは、二種類の細胞タイプによって全く逆の結果になることから、**ERK 下流にその感受性を正、負に調節しうる規定因子**が存在する可能性がある。従って、3T3-Raf-ER 細胞と LK2-Raf-ER 細胞について、ERK 下流シグナルを比較検討した。また、正常、がん細胞、p53 遺伝子型の違いで、応答が異なる可能性も視野に入れて検討した。

(2) **成果 C** から、HDACi による Bim 発現と p53 由来の p21 発現による Bim の阻害効果とのバランスが HDACi 感受性を規定する可能性があり、**p21 と Bim の発現を解析した。**

⇒これらの 2 項目の解析を中心にする、**HDACi 感受性を規定する分子機構の解明**をめざした。

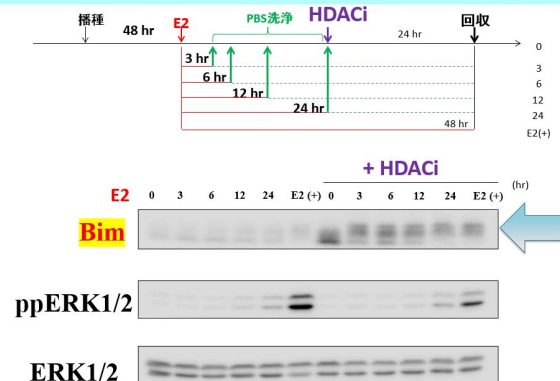
4. 研究成果

ERK活性化誘導			
Raf-ER	親細胞株	p53遺伝子型	HDACi感受性
3T3-Raf-ER	NIH-3T3 マウス繊維芽細胞	野生型	↑
LK2-Raf-ER	LK-2 ヒト肺がん細胞	変異型	↓

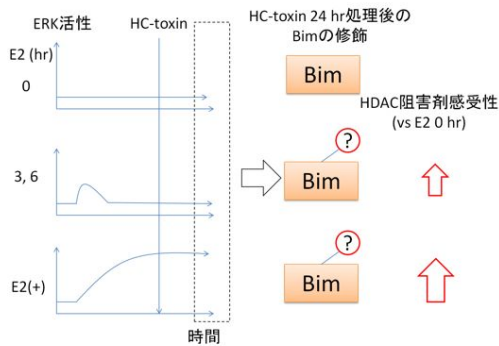
図5 2つのRaf-ERシステム

1) 図5の様に、2つのRaf-ERシステム、3T3-Raf-ER細胞とLK2-Raf-ER細胞について、ERK活性化誘導がHDACi感受性に関して異なる結果を生じる。エストラジオール(E2)添加によってERK-MAPキナーゼ経路の活性化が誘導できる3T3-Raf-ER細胞において、ERK経路の活性化が一過性の場合でも程度は小さいものの、ERK経路を持続的に活性化させた場合と同様に、HDAC阻害剤に対する感受性が亢進した。この結果は、ERK経路が一過性に活性化されただけで、HDAC阻害剤感受性が亢進した細胞にスイッチされることを示している。さらに、その感受性変化に関与する分子としてアポトーシス促進因子Bimに注目した。BimはERKによってリン酸化されることが報告されている分子であるが、HDAC阻害剤によって発現誘導されると同時に、**ERKの活性化がすでに鎮静化した一過性活性化細胞においても顕著なバンドシフトを示す**ことが分かり(下図)、ERK経路によるHDAC阻害剤感受性の制御を担う分子の一つとして重要な因子となる可能性を見出した。

3T3-Raf-ER細胞におけるERK活性とBimの関係



3T3-Raf-ER cell



BimはERK経路によるHDAC阻害剤感受性の制御を担う分子の一つとして注目される

一方、LK2-Raf-ER細胞においては、Bimがアポトーシス誘導因子、p21はアポトーシス抑制因子として働き、がん細胞ではこれらが重要なHDACi感受性マーカーであることに間違

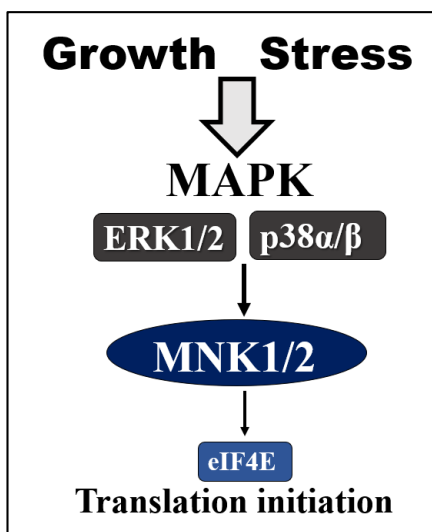
HDAC阻害剤、E2併用処理時におけるHDAC阻害剤単独処理との比較

細胞	HDAC阻害剤感受性	p21	Bim	E2除去時のHDAC阻害剤感受性
3T3-Raf-ER	↑	↑	→(shift up)	↑
LK2-Raf-ER	↓	↑	↓	(→)

いなかった。

すなわち、いかなる細胞に対しても **Bimに対する応答**がHDACi感受性決定には非常に重要であることが改めて判明した。

2) これまでERK経路遮断薬であるMEK阻害剤とHDAC阻害剤との併用効果に関する数々の制がん研究実績から、がん細胞のHDAC阻害剤に対する感受性決定にはERK活性化レベルが大きな意味をもつことを明らかにしてきた。一方、**ERK経路下流のキナーゼでタンパク質合成翻訳開始マシーナリーの制御中心であるMNK**は、近年MAPキナーゼ(ERK/p38)制御下で発がん・がん細胞の増殖に關与する



分子と考えられ、新規がん分子標的として注目されつつある。MNKを分子標的とし、これまでの申請者らの研究成果を生かして **MNK阻害剤とHDAC阻害剤との併用効果**について検討した。

ERK経路の恒常的活性化がみられるヒトがん細胞において、ERK経路遮断薬であるMEK阻害剤とHDAC阻害剤との併用効果に近いレベルの相乗効果を、下流のMNKキナーゼ阻害剤(CGP57380)とHDAC阻害剤との併用によっても再現できた。一方、構造の異なるMNK阻害剤(ETP-45835)とHDAC阻害剤との併用効果はほとんど見られなかった。さらに、ERK経路下流のキナーゼでタンパク質合成翻訳開始マシーナリーの制御中心であるMNKは、現在まで二つのMAPキナーゼであるERKおよびp38の制御下で調節されると報告されているが、各種MAPキナーゼ阻害剤を用いて再検討した結果、三つ目のMAPキナーゼである**JNKもMNK上流MAPキナーゼとして働く可能性を見出した**。しかも、MNK1とMNK2アイソフォームでそれぞれ固有のシグナル経路を有していると考えられた。このことは、MNK1とMNK2に対する阻害効果の特異性が微妙に異なる二種類のMNK阻害剤(CGP57380およびETP-45835)とHDAC阻害剤との併用効果の違い(一貫性のない結果)を反映している可能性もある。

今後は、さらに詳細にMNK1とMNK2各アイソフォーム特異的シグナル経路明らかにするとともに、**ERK経路下流のがん治療標的**としての可能性をアイソフォームごとに解明していく必要がある。

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 8 件)

1)Hattori Y, Nakamura A, Hanaya S, Miyanabe Y, Yoshiki Y, Kikuchi T, Ozaki K, Onishi H:

Effect of chondroitin sulfate on siRNA biodistribution and gene silencing effect in mice after injection of siRNA lipoplexes.

***J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 41: 401-409, 2017**

2) Hattori Y, Kikuchi T, **Ozaki K**, Onishi H: Evaluation of *in vitro* and *in vivo* therapeutic anti-tumor efficacy by transduction of polo-like kinase 1 and heat shock transcription factor 1 small interfering RNA.

***Exp. Ther. Med.* 14: 4300-4306, 2017**

3) Hattori Y, Kikuchi T, Nakamura M, **Ozaki K**, Onishi H: Therapeutic effects on liver- and lung-metastasized tumors of combination therapy with protein kinase N3 small interfering RNA and doxorubicin.

***Oncol. Lett.* 14: 5157-5166, 2017**

4) **Ozaki K**, Awazu M, Tamiya M, Iwasaki Y, Harada A, Kugisaki S, Tanimura S, Kohno M: Targeting the ERK signaling pathway as a potential treatment for insulin resistance and type 2 diabetes.

***Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 310: E643-E651, 2016**

5) Furuoka M, **Ozaki K**, Sadatomi D, Mamiya S, Yonezawa T, Tanimura S, **Takeda K**: TNF- α Induces caspase-1 activation independently of simultaneously induced NLRP3 in 3T3-L1 cells.

***J. Cell. Physiol.*, 231: 2761-2767, 2016**

6) Hattori Y, Arai S, Kikuchi T, **Ozaki K**, Kawano K, Yonemochi E: Therapeutic effect for liver-metastasized tumor by sequential intravenous injection of anionic polymer and cationic lipoplex of siRNA.

***J. Drug Target.*, 24: 309-317, 2016**

7) Hattori Y, Yoshiike Y, Kikuchi T, Yamamoto N, **Ozaki K**, Onishi H: Evaluation of the injection route of an anionic polymer for small interfering RNA delivery into the liver by sequential injection of anionic polymer and cationic lipoplex of small interfering RNA.

***J. Drug Deliv. Sci. Tec.*, 35: 40-49, 2016**

8) Hattori Y, Shibuya K, Kojima K, Miatmoko A, Kawano K, **Ozaki K**, Yonemochi E: Zoledronic acid enhances antitumor efficacy of liposomal doxorubicin.

***Int. J. Oncol.*, 47: 211-219, 2015**

〔学会発表〕(計 5 件)

1, 古岡真菜、**尾崎恵一**、谷村 進、**武田 弘**
資3T3-L1細胞のTNF- 応答におけるNLRP3
の役割：2017 年度 生命科学系学合同年次
大会（神戸）2017年12月

2, 小笠原慎, 井上潤子, 大谷侑平, 金谷祥
吾, 水野和史, 藤井忍, 藤井俊裕, **尾崎恵**
一, 福永理己郎 CRISPR/Cas9 システムによ
るMnk1/Mnk2 ノックアウト HeLa細胞の作成
とシグナル伝達経路の解析：2017 年度 生
命科学系学合同年次大会（神戸）2017年12
月

3, **尾崎恵一**、栗津緑、谷村進、河野通明
ERK-MAP キナーゼ経路を標的とした糖尿病
治療の可能性：第90回 日本内分泌学会学
術集会（京都）2017年4月

4, 菊地拓人, 服部喜之, **尾崎恵一**, 大西
啓：PKN3 siRNA リボレックスとドキシソルビ
シンの併用療法による肝ならびに肺転移乳
がんに対する抗腫瘍効果の検討．第32回
日本DDS 学会学術集会：2016年6月（静岡）

5, 菊地拓人, 服部喜之, 吉池悠貴, 山本菜摘, 尾崎恵一, 大西啓: 負電荷ポリマーとsiRNAリポプレックス連続投与による肝臓へのsiRNA 送達における負電荷ポリマーの種類と投与法の検討: 日本薬剤学会第31回年会, 2016年5月(岐阜)

[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

<http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushitu/yakugakukyokucenter.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾崎 恵一 (OZAKI, Kei-ichi)
大阪薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 50252466

(2)研究分担者

武田 弘資 (TAKEDA, Kohsuke)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授
研究者番号: 10313230

(3)連携研究者

無し ()

(4)研究協力者

柿本 貴子 (KAKIMOTO, Takako)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・大学院生