

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06773

研究課題名(和文)膵臓癌におけるヒストンアセチル化阻害による細胞周期関連シグナルの解明

研究課題名(英文) Analysis of cell cycle related signals for inhibition of histone acetylation in pancreatic cancer cells

研究代表者

小野 宏晃 (ONO, Hiroaki)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60466901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンのアセチル化はDNA複製・修復や細胞周期などに影響を与えると考えられています。本研究では膵臓癌におけるヒストンアセチル化と細胞周期との関連性に着目し実験を行いました。これら分子メカニズムを詳細に解明することで、新規治療薬としての可能性を検証しました。我々の解析からは、H3K9AcなどのヒストンH3アセチル化が膵臓癌細胞株において活性化していること、またヒストンのアセチル化抑制に伴い膵臓癌細胞株で細胞増殖抑制とアポトーシスとの関連性を示しました。この現象にはサイクリンB1やCDC2といった細胞周期関連遺伝子の発現低下を介してG2/Mにおける細胞周期停止をきたしたことを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：Histone Acetylation plays a significant role in DNA replication and regulation of cell cycle. We tried to investigate its relationship between Histone acetylation and cell cycle especially in pancreatic cancer. Our study has shown evidence that Histone acetylation such as H3K9Ac and H3K27Ac is activated in pancreatic cancer cell lines. Furthermore, C646, which is a biological inhibitor of Histone acetylation, inhibited cell cycle and induced cell apoptosis of pancreatic cancer cell lines as well. Cell cycle related genes of cyclin B1 and CDC2 were also inhibited by C646 treatment. These data suggested that down-regulation of Histone acetylation induced G2/M cell cycle arrest through inhibition of cell cycle related genes at transcriptional level.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵臓癌 細胞周期 抗がん剤 腫瘍外科 分子細胞学

1. 研究開始当初の背景

ヒストンのアセチル化が、DNA 複製・修復や細胞周期などに影響することは知られているが、膵臓癌におけるヒストンアセチル化と細胞周期との関連性は明らかになっていない。

申請者は米国ミシガン州立大学留学中に、膵臓癌のキードラッグである Gemcitabine (ジェムザール) の抗がん剤感受性と転写補因子である p300 との関連性を解明する基礎研究に従事していた。そこで膵臓癌細胞株において、p300 は Gemcitabine 投与によりクロマチンに結合することで活性化し、p300 RNA 干渉 (p300 siRNA) によりその機能を抑制すると、膵臓癌における Gemcitabine 感受性が増加することを発見した。(p300 inhibition enhances gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer, Ono H et al; Oncotarget 2016)

p300 はヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) 活性も有している。そこで申請者は HAT 阻害剤である C646 を用いて、膵臓癌における Gemcitabine 抗がん剤感受性や細胞増殖能に与える影響について調べた。そこで C646 は膵臓癌における Gemcitabine の抗がん剤感受性を増加させる (publishing data; 上記) と同時に、膵臓癌の細胞増殖を抑制することを見出した。

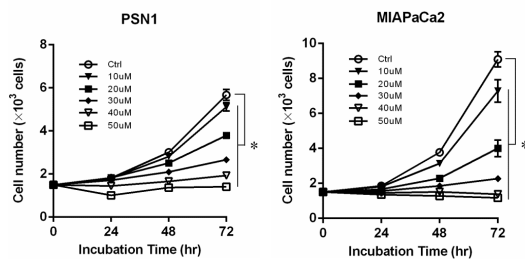


図 1; WST-8

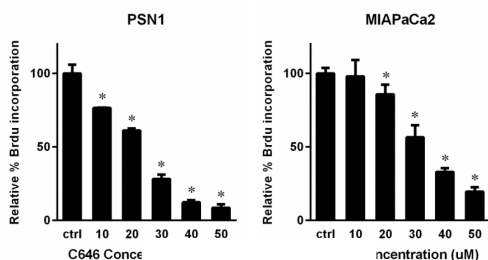


図 2; Brdu assay

図 1・2 は、HAT 阻害剤である C646 と膵臓癌細胞株 PSN1、MIA PaCa2 において細胞増殖能との関連性を調べている。(図 1; WST-8 assay, 図 2; Brdu assay) C646 は、濃度依存的に膵臓癌細胞株の細胞増殖能を有意に抑制した。(*: p<0.05)

ヒストンのアセチル化・脱アセチル化はタンパク質の翻訳後修飾の一つで、遺伝子の転

写活性に重要である。特に、ヒストンのアセチル化は遺伝子発現を活性化し、転写レベルを正に制御しているとされる。HAT 阻害剤である C646 はヒストンアセチル化を阻害する。しかし、C646 に関連してアセチル化の変化により抑制される細胞周期や細胞増殖に関連する遺伝子群やシグナル経路については明らかになっていない。

そこで上記データを得て、膵臓癌において C646 は細胞周期に関連する遺伝子のヒストンアセチル化を阻害して、膵臓癌の増殖能が抑制されていると考えた。

2. 研究の目的

膵臓癌は本邦において罹患数・死亡数ともに増加している。腫瘍悪性度が高く早期発見が困難であることから、外科手術を中心とした集学的治療を行っても既存の治療法では根治は困難である。膵臓癌の予後改善には、新規分子標的治療薬の開発が取り組むべき喫緊の課題である。

ヒストンのアセチル化が、DNA 複製・修復や細胞周期などに影響することは知られているが、膵臓癌におけるヒストンアセチル化と細胞周期との関連性は明らかになっていない。本研究ではヒストンアセチル基転移酵素 (HAT; Histone Acetyltransferase) 阻害剤と膵臓癌特異的な細胞増殖・細胞周期に関連した分子メカニズムを詳細に解明し、新規治療薬としての可能性を検証することを本研究の主たる目的とした。

3. 研究の方法

膵臓癌細胞株におけるヒストンアセチル化、特に Histone H3 に着目しヒストンのアセチル化の指標となる既知のリジン残基 (H3 リジン 9/14/18/27 など) のアセチル化をウエスタンブロット法にて調べた。また C646 によるこれらリジン残基のアセチル化活性抑制の濃度依存的な影響を調べた。

本研究では、数種類の膵臓癌細胞株 (PSN1、MIA PaCa2、Panc1 など) を用いて、膵臓癌におけるこれらヒストンリジン残基 (9、14、18、27 番) のアセチル化をウエスタンブロット法で調べ、膵臓癌細胞株におけるヒストンアセチル化を観察した。

また HAT 阻害剤である C646 の膵臓癌におけるこれらヒストンリジン残基に与える影響は不明であったため、濃度依存的なヒストンアセチル化阻害活性をウエスタンブロット法にて調べた。(PSN1、MIA PaCa2; C646 10-50uM)

フローサイトメトリー解析により C646 における細胞周期への影響 (どの細胞周期停止が起きているか) を調べた。細胞周期はサイクリンと CDK (サイクリン依存的キナーゼ) との相互作用により調節されている。そのため、サイクリンや CDK など細胞周期関連シグナルのタンパクレベルならびに転写レベルの活性を調べた。

フローサイトメトリー分析により、C646 により誘導された細胞増殖低下と細胞周期との関連性を観察した。膵臓癌における C646 によるヒストンアセチル化阻害と細胞周期との関連性は明らかとなっていない。過去の他の癌腫における報告では、C646 は白血病細胞でメラノーマ細胞において G1/S cell cycle arrest を誘導することが知られている。(Gao et al. 2013; Bowers et al. 2010) 一方、非小細胞肺癌においては C646 は Mitotic catastrophe を誘導することが知られていた。(Oike et al. 2014)

G2/M 期における細胞周期停止に関してはサイクリン A、サイクリン B、CDK1 などが関与するとされている。これら G2/M 細胞周期関連遺伝子の転写・発現レベル解析を行った。(ウエスタンブロット法・リアルタイム RT-PCR)

4. 研究成果

5 種類の膵臓癌細胞株 (BxPC3、Hs766T、MIAPaCa2、PSN1、Panc1) においてヒストンアセチル化は活性化していることが明らかとなった。ウエスタンブロット法にて 9, 18, 27 番目といったヒストンリジン残基におけるヒストンアセチル化が癌細胞株において活性化していた。(図 3)

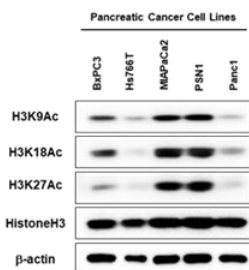


図 3; ウエスタンブロット法によるヒストンアセチル化発現解析

またこれら活性化したヒストンアセチル化は C646 により抑制された。これら抑制効果の濃度依存的な影響を確認した。(図 4)

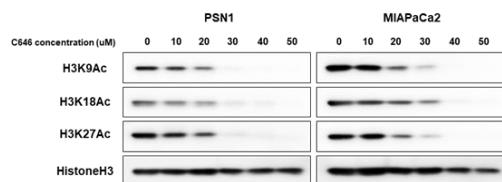


図 4; ウエスタンブロット法によるヒストンアセチル化の濃度依存的な発現解析

C646 投与により膵臓癌細胞株における細胞の増殖が抑制されていることから、フローサイトメトリー解析により細胞周期解析を行った。C646 投与により膵臓癌において G2/M 細胞周期停止が誘導されることが分かった。これら細胞周期停止はヒストンアセチル化

の抑制と一致して認められており、ヒストンアセチル化阻害と G2/M 細胞周期停止との関連性が示唆された。(図 5)

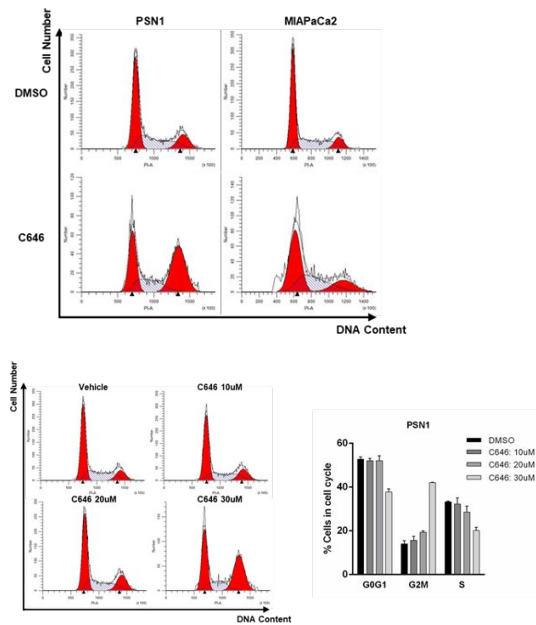


図 5; フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析

G2 から M 期へ移行する細胞周期に関連する遺伝子群のタンパクレベルならびに転写レベルでの発現解析を行った。サイクリン B1 や CDD2 の発現が低下しており、これら発現低下は転写レベルでの抑制であることが明らかとなった。(図 6)

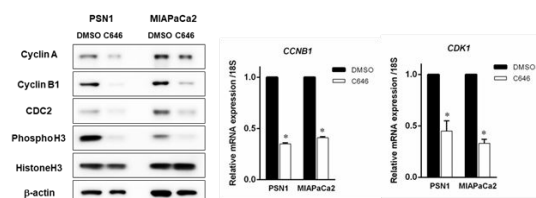


図 6; ウエスタンブロットおよびリアルタイム RT-PCR 法による G2/M 細胞周期関連遺伝子発現解析

これら実験結果から、膵臓癌においてヒストンアセチル化は発現亢進しており、これらヒストンアセチル化を阻害剤により抑制させることは、膵臓癌における治療ターゲットとなりうるということが明らかとなった。C646 投与によるヒストンアセチル化阻害に伴う細胞の増殖を抑制させるメカニズムとして、G2 から M 期へ移行させる遺伝子群の転写レベルでの発現低下を介して細胞増殖を低下させることを明らかとした。

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 2 件)

小野宏晃、ヒストンアセチル基転移酵素阻害剤 C646 は G2/M 細胞周期停止を介し膵臓癌細胞株における細胞増殖を抑制する、第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017 年

小野宏晃、ヒストンアセチル化阻害による膵臓癌の細胞周期とジェムザール感受性への影響と解析、第 48 回日本膵臓学会、2017 年

〔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

小野 宏晃 (ONO, Hiroaki)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・肝胆膵外科・助教
研究者番号：60466901