

平成30年6月21日現在

機関番号：82406

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07457

研究課題名(和文) ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬と抗HIV薬の併用による腎癌新規治療法の開発

研究課題名(英文) Research on the development of novel renal cancer therapies using histone deacetylase inhibitors and anti-HIV drugs in combination

研究代表者

浅野 貴子 (ASANO, TAKAKO)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・泌尿器科学・助教)

研究者番号：40779336

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)：ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬単独での効果的な小胞体ストレス誘導は困難である。HIVプロテアーゼ阻害薬は分子シャペロンおよびプロテアソーム阻害作用を持つと共にP-glycoprotein阻害作用も有するため、両者の併用が効果的に小胞体ストレスとヒストンアセチル化を誘導すると仮定し研究を行った。HDAC阻害薬entinostatとHIVプロテアーゼ阻害薬ritonavirの併用は腎癌細胞においてアポトーシスを誘導し、相乗的に細胞増殖を抑制した。また、予測通り、小胞体ストレスおよびヒストンアセチル化を誘導した。マウス皮下腫瘍モデルを用いた検討でも、併用は有意に腫瘍の増大を抑制した。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to induce endoplasmic reticulum (ER) stress by using the histone deacetylase (HDAC) inhibitor alone. On the other hand, the HIV protease inhibitor not only inhibits molecular chaperones and proteasomes but also P-glycoproteins. I postulated that combining an HDAC inhibitor and an HIV protease inhibitor would induce ER stress and histone acetylation effectively. The combination of the HDAC inhibitor entinostat and the HIV protease inhibitor ritonavir induced apoptosis and inhibited renal cancer growth synergistically. As expected, the combination induced ER stress and histone acetylation. In murine subcutaneous tumor models, the combination inhibited tumor growth significantly.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：癌 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

私の所属する研究室では、一貫して泌尿器癌における小胞体ストレス、ヒストンアセチル化に関する研究を行い、その重要性を示して来た。ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬は、ヒストンアセチル化により、アポトーシスを誘導する。これらは、すでに血液がんを中心に臨床応用されているが、固形癌における効果は限定的である。一方で HDAC 阻害薬はヒストン以外にも、様々な分子をアセチル化することで、その機能を制御することが知られている。

Unfolded protein は、分子シャペロンによって修復されるが、この修復が失敗した場合は、ユビキチン化され、蛋白分解機構であるプロテアソームにより分解される。HDAC 阻害薬は、分子シャペロンをアセチル化することで、その機能を抑制し、細胞内に unfolded protein を増加する方向に働く。unfolded protein の増加は小胞体ストレスを誘導し、細胞をアポトーシスに至らせるが、通常、これらの unfolded protein は、上述した通り、プロテアソームによって分解されるため、多くは細胞内に蓄積されない。つまり、HDAC 阻害薬単独では、効果的に癌細胞を死滅させる程度の小胞体ストレスを誘導することは困難である。

一方で、HIV プロテアーゼ阻害薬は、分子シャペロンを抑制すると共に、プロテアソームの機能も抑制する。更に、特に腎細胞癌において重要な薬剤耐性機序である薬剤排出ポンプ P-glycoprotein を抑制し、併用された薬剤の細胞内濃度を上昇させる働きを持つ。

そこで HDAC 阻害薬と HIV プロテアーゼ阻害薬を併用することを着想した。すなわち、HDAC 阻害薬と HIV プロテアーゼ阻害薬は、共に分子シャペロンを抑制することで、細胞内に unfolded protein を増加させ、かつ、HIV プロテアーゼ阻害薬がプロテアソームを抑制することで、増加した unfolded protein は分解されずに細胞内に蓄積し、効果的に小胞体ストレスを誘導、アポトーシスを惹起すると考えた訳である。更には、HIV プロテアーゼ阻害薬の P-glycoprotein 抑制作用により、HDAC 阻害薬の癌細胞内での濃度が上昇することで、ヒストンアセチル化、分子シャペロン抑制といった作用が更に増強されると考えた。

2. 研究の目的

HDAC 阻害薬は、分子シャペロンを抑制することで細胞内に unfolded protein を増加する。HIV プロテアーゼ阻害薬は分子シャペロンおよびプロテアソーム阻害作用を持つと共に、P-glycoprotein を抑制し、併用された薬剤の細胞内濃度を上昇する働きを持つ。そこで私は、HDAC 阻害薬と HIV プロテアーゼ阻害薬を併用することで、小胞体ストレスを誘

導するのみならず、HDAC 阻害薬の細胞内濃度を上昇させることで、ヒストンアセチル化を増強し、腎癌細胞を死滅出来ると仮定した。本研究では、腎癌細胞株を用い、HDAC 阻害薬と HIV プロテアーゼ阻害薬の併用について、その効果と詳細なメカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

当研究室で保有する腎癌培養細胞株 786-O, 769-P, Caki-2 を使用し、HDAC 阻害薬である entinostat と、HIV プロテアーゼ阻害薬である ritonavir を用いた併用療法を下記の方法で行った。

細胞増殖抑制効果の検討

併用療法を行い、増殖抑制効果を MTS assay にて検討した。次いで colony formation assay を行い、コロニー形成阻害能について検討した。結果は、CalcuSyn ソフトウェアを用いて解析し、combination index を算出、相乗性を検討した。

アポトーシス誘導の検討

併用療法を施行し、アポトーシス誘導を annexin-V assay で検出した。また western blot 法で caspase 3, cleaved poly(ADP-ribose) polymerase, NOXA の発現を検討した。

細胞周期の変化に関する解析

併用療法を施行し、細胞周期の変化をフローサイトメトリーにて解析した。更に western blot 法にて cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 の発現の変化を検討した。

小胞体ストレス誘導とヒストンアセチル化の検出

併用療法を施行し蛋白を抽出した。Western blot 法で、併用療法による小胞体ストレスの誘導 (glucose-regulated protein 78, heat shock protein 70, endoplasmic reticulum resident protein 44, endoplasmic oxidoreductin-1-like protein の発現上昇) およびヒストンアセチル化を検討した。また、unfolded protein の直接的な蓄積をユビキチン化蛋白の蓄積で検討した。

オートファジー誘導の検討

オートファジーは新たな不要蛋白除去機構であり、蓄積した unfolded protein はオートファジーで処理される可能性がある。過剰なオートファジーは細胞死を誘導するとされており、併用療法のメカニズムの一つである可能性がある。そこで、併用療法によるオートファジー誘導について、オートファジーのマーカーである LC3- の発現を western blot 法で検出し、検討した。

In vivo における併用療法の抗腫瘍効果の検討

Caki-2 を用いて腎癌マウス皮下腫瘍モデルを作成し、併用療法の in vivo における効果を検討した。マウスをコントロール群、entinostat 投与群、ritonavir 投与群、併用療法群に分け、腹腔内投与による治療を行った。腫瘍体積を測定し、治療効果について検討した。また、致命的な副作用がないか、検討を行った。

4. 研究成果

HDAC 阻害薬 entinostat と HIV プロテアーゼ阻害薬 ritonavir の併用療法は、相乗的な小胞体ストレスおよびヒストンアセチル化を誘導し、腎癌細胞を死滅した。以下に詳細を示す。

<Cell viability assay>

48 時間の併用療法を行い、cell viability の変化を MTS assay を用いて検討した。併用療法は、全ての細胞株において効果的に癌細胞を死滅させた。Chou と Talalay らの方法で isobologram 解析を行ったところ、両者の併用効果は相乗的であることがわかった (combination index < 1)。

<Colony formation assay>

Colony formation assay では、併用療法による有意なコロニー形成阻害能を認めた ($p < 0.05$)。

<アポトーシスの誘導>

48 時間の併用療法を行い、annexin-V assay を行ったところ、相乗的なアポトーシス誘導能が確認出来た。更に、western blot 法による検討では、併用療法は、アポトーシス関連蛋白である active caspase 3, cleaved poly(ADP-ribose) polymerase, NOXA の発現を増加し、併用療法によるアポトーシス誘導が裏付けられた。

<細胞周期の解析>

48 時間の併用療法後の細胞周期解析では、著明な sub-G1 fraction の増加が確認された。また、western blot 法による解析では、細胞周期関連蛋白である cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 の発現抑制がみられた。

<小胞体ストレスおよびヒストンアセチル化の誘導>

48 時間の併用療法後に蛋白を抽出し、小胞体ストレスおよびヒストンアセチル化の誘導について検討した。

併用療法は、glucose-regulated protein 78, heat shock protein 70, endoplasmic reticulum resident protein 44, endoplasmic oxidoreductin-1-like protein

の発現を上昇させ、小胞体ストレスの誘導が示された。一方で、併用療法は、ヒストンアセチル化も増強した。更に、併用療法は、LC3-II の発現を増加し、オートファジーの誘導も確認出来た。また、unfolded protein の蓄積についてはユビキチン化蛋白の蓄積で検討し、併用療法による unfolded protein の蓄積が示された。さらに興味深いことには、併用療法は HDAC1, 3, 6 の発現を抑制した。この発現抑制は、ヒストンアセチル化増強の一つのメカニズムと考えられた。

<In vivo における効果>

In vivo における併用療法の抗腫瘍効果の検討は Caki-2 を用いたヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いて行った。

マウスをコントロール群、entinostat 投与群 (2 mg/kg)、ritonavir 投与群 (50 mg/kg)、併用群に分け、それぞれ腹腔内投与による治療を 10 日間行った。併用群においては腫瘍の増大が有意に抑制された ($p = 0.0284$)。一方で、致死的な副作用は認められなかった。

次に、マウスを安楽死させた後に腫瘍を摘出し、western blot 法による検討を行ったが、アポトーシス誘導、小胞体ストレス誘導、ヒストンアセチル化に関しては、各群間で関連蛋白に発現において有意な差を認めなかった。今後、免疫組織化学による検討を予定している。

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

1. Asano T., Sato A., Okubo K., Isono M., Asano T. (2017): Ritonavir, a potent inhibitor of CYP3A4, enhances the anticancer effects of entinostat in renal cancer cells in vitro and in vivo. The 112 th American Urological Association Annual Meeting at Boston, USA.
2. 浅野貴子、佐藤全伯、大久保和樹、磯野誠、浅野友彦. (2017): 腎癌細胞において entinostat と ritonavir の併用は相乗的にヒストンアセチル化と小胞体ストレスを誘導する. 第 105 回日本泌尿器科学会総会、鹿児島.
3. Asano T., Sato A., Okubo K., Isono M., Asano T. (2016): Ritonavir synergizes with entinostat to cause histone acetylation and endoplasmic reticulum stress in renal cancer cells. 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浅野 貴子 (ASANO, Takako)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・助教

研究者番号：40779396