

令和元年5月23日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09399

研究課題名(和文) HDAC class IIa阻害によるアポトーシス誘導を応用した新規膵癌治療の開発

研究課題名(英文) HDAC inhibition against pancreatic cancer

研究代表者

小野 道洋 (Michihiro, Ono)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80634675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌細胞株に対して、選択的HDAC class IIa 阻害剤TMP269の抗腫瘍効果を検討したところ、細胞周期抑制効果を介した細胞増殖抑制効果が認められた。PCRアレイ、qPCR、ウエスタンブロッティングの結果、HDAC class IIa阻害により転写調節因子FOXO3aの転写活性化を介して、下流のCDKやCyclinの発現抑制を惹起し、細胞周期停止をもたらしていることが明らかとなった。さらにFOXO3a下流のp21の発現亢進も認められ、これはp53欠損細胞株においても認められたことから膵癌治療において有望なターゲットとなりうると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通常の化学療法剤では極めて難治性の膵癌診療において、選択的HDAC class IIa 阻害剤が細胞増殖抑制効果を示し、新規治療戦略の可能性を示した。特にp53やRASなど、遺伝子異常が通常の化学療法剤の治療抵抗性に関与しているが、TMP269がp53欠損株においても、p53非依存性にp21の発現増強を介して、細胞増殖抑制効果を示しており、治療抵抗性の克服に対しても、可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is highly chemo-resistant associated with oncogenic mutations such as KRAS and/or p53. Selective class IIa HDAC inhibitor TMP269 treatment showed increased FoxO3a expression in a dose dependent manner with immunoblotting and modest cell growth inhibition effect at 57.5 μ M of IC50 dose for 48-hour treatment against AsPC-1 in MTT. G1/S arrest was observed with cell cycle assay. Upregulated p21Waf1/Cip1 and downregulated CDK2 and 4/6 and cyclin D1 and D2 expressions were further observed, consistent with inducing G1/S arrest and transcriptionally activated FoxO3a. Importantly, upregulated p21Waf1/Cip1 was observed in AsPC-1 p53 null cell line, suggesting independent with p53 pathway. These findings suggest upregulated FoxO3a induced by HDAC class IIa inhibition activated its transcription and resulted in cell growth inhibition.

研究分野：胆道・膵臓系腫瘍

キーワード：HDAC阻害剤 膵癌 細胞周期停止

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の異常発現が, epigenetic gene modification を介して腫瘍の発症と進展に関与する (Bolden JE, et al. Nature reviews Drug discovery 2006;5(9):769-784) ことから, HDAC inhibitor (HDACi) が epigenetic drug として, 広く研究されてきた. HDAC は, Class (HDAC1,2,3,8), Class (HDAC4,5,6,7,9,10), Class (Sirt1-7) および Class (HDAC11) に分類され, Class はさらに Class a (HDAC4,5,7,9) および b (HDAC6,10) に細分化される. HDAC は, Class HDAC によるヒストン脱アセチル化だけではなく, 1700 以上の非ヒストンタンパクの脱アセチル化に関与する (Choudhary C, et al. Science 2009 14;325(5942):834-840). 近年 HDAC のヒストン脱アセチル化以外の機能さらには各 Class, Isoform 毎の機能が徐々に解明され, Class-selective HDACi によるヒストン以外をターゲットとした新規抗腫瘍治療薬開発が期待されている.

Class a HDAC は, 核および細胞質をシャトルし, 主に転写調節因子活性に関与する (Martin M, et al. Oncogene 2007;26(37):5450-5467). 申請者らは, HDAC4 が ER stress 下で誘導される転写調節因子 activating transcription factor 4 (ATF4) を阻害して, アポトーシスを抑制していることに着目し, HDAC4 阻害が, ATF4 および ATF4 下流のアポトーシス促進転写調節因子 C/EBP homologous protein (CHOP) の発現増強を介して, アポトーシスを誘導することを報告した. さらには, 選択的 HDAC Class a inhibitor, TMP269 が, proteasome inhibitor Carfilzomib 誘導下の ER stress 環境において, ATF4 および CHOP の発現を強く誘導して強力なアポトーシスを誘導し, 著明な細胞障害をもたらすこと (Fig.1) を見出し, 選択的 HDAC Class a inhibitor による抗腫瘍効果を初めて報告した (Kikuchi S, et al. Leukemia).

乏血性腫瘍である膵癌は, 低酸素適応を制御する転写因子である Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) を恒常的に発現している. HIF-1 は, 転移能の亢進やアポトーシス抵抗性に関与し, その過剰発現は予後不良に関与することが知られており, 治療ターゲットとして注目されている. Geng らは, HDAC4 が HIF-1 lysine の脱アセチル化を介して HIF-1 を活性化させることおよび HDAC4 の阻害により HIF-1 が抑制されることを報告した (Geng et al, J Biol Chem. 2011;286(44):38095-102). さらに Kato らは, HDAC7 が HIF-1 の活性に関与すること (Kato et al, J Biol Chem. 2004;279(40):41966-74), Ouaisi らは, 膵癌細胞が非膵癌膵細胞と比較して, HDAC7 の発現が高いことおよび HDAC7 高発現群は, 低発現群と比較し予後不良であることを報告した (Ouaisi et al. PLoS One. 2014;9(9):e108520, Ann Surg Oncol;15(8):2318-2328). これらの報告から, 膵癌細胞において, Class a HDAC が, HIF-1 を介して, 腫瘍細胞の生存および治療抵抗性に関与することが想定され, HDAC class a をターゲットとした新たな膵癌治療薬の可能性が想起された.

2. 研究の目的

本邦で年間 20000 人程度が新たに診断される膵癌は, 早期診断が困難なことから 80% 以上の症例が切除不能進行膵癌として化学療法が施行される. GEM あるいはフツ化ピリミジン系抗がん剤である S-1 が主に使用されてきたが, Key drug である GEM 単独療法の治療成績は, 生存期間中央値 5.6 か月, 1 年生存率約 18% (Burris et al, JCO, 1997) と十分ではない. 近年いくつかの Phase study の結果を受け, 5 FU, CPT-11 および oxaliplatin 3 剤併用療法である FOLFIRINOX 療法, GEM 併用 nab-paclitaxel 療法および GEM 併用 erlotinib 療法の 3 療法が新たに使用可能となった. 遠隔転移を有する切除不能進行膵癌を対象とした FORFIRINOX 療法第 相試験では, GEM 単独療法 (6.8 か月) に対する FORFIRINOX 療法 (11.1 か月) の有意な平均生存期間の延長効果が認められたものの (Conroy et al, NEJM, 2011), 未だ満足のものではない. 膵癌治療では, あらたな治療ストラテジーの確立が急務であり, 殺細胞性化学療法薬や分子標的治療薬に限らず, あらたな治療コンセプトを有する新規治療薬の検討, 開発が必要である. 本研究では, 膵癌細胞における選択的 HDAC class a 阻害剤の抗腫瘍効果について明らかにし, 新規膵癌治療剤としての選択的 HDAC class a 阻害剤の可能性を検討することを目的とする.

3. 研究の方法

(1) 膵癌における HDAC class IIa の発現解析

膵癌細胞株を用いて, ウェスタンブロッティング法により各アイソザイムの発現を検討した. さらに Public open の Gene expression profiling data を用いて, 膵癌手術検体における各 HDAC class IIa アイソザイムの mRNA 発現量を比較検討した.

(2) TMP269 による細胞増殖抑制効果の検討

96 ウェルプレートに核細胞株を播種し, 24 時間培養後に指定の濃度の TMP269 を添加して, 48 時間培養した. 処理後 44 時間時点で MTT 液を添加し, 遮光のうえ, さらに 4 時間培養し, 可溶化液で処理後の吸光度をマイクロプレートリーダーで計測し, コントロール群を 100% として, 各処理群の細胞増殖程度を計算した. さらに, FACS を用いて, 細胞周期解析を行った. 結果は, FACS DIVA を用いて解析した.

(3) アポトーシス解析

ウェスタンブロッティング法を用いてアポトーシス解析を行った.

(4) 細胞周期停止の機序の解析

アポトーシス関連の PCR アレイを用いて、TMP 処理後の各遺伝子の発現を検討した。発現が亢進した遺伝子のうち、FoxO3a に着目して、TMP269 処理後の発現変化をウエスタンブロットング法を用いて解析した。さらに FoxO3a 下流の細胞周期停止に関わる各蛋白の発現解析を行った。

(5) プロテアソーム阻害剤との併用効果の検討

前述の MTT アッセイを用いて、TMP269 およびカルフィルゾミブ単剤、併用療法の細胞増殖抑制効果を検討した。さらにウエスタンブロットング法を用いて、併用時の FoxO3a の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 膵癌における HDAC class IIa アイソザイムの発現

膵癌細胞株を用いて、HDAC class IIa 各アイソザイムの発現をウエスタンブロットング法を用いて解析した。AsPC-1、MIA PaCa-2、PANC-1、BxPC-3 の各膵癌細胞株において、HDAC class IIa 各アイソザイムは、発現強度の差異は認めるものいずれも発現を認め、選択的 HDAC class IIa 阻害剤のターゲットとしての存在を確認した。(Figure 1)

次に、Publuc open の gene expression profiling data (GSE 15471) を用いて、膵癌手術検体の癌部 (T) 及び非癌部 (N) における HDAC class IIa アイソザイムの発現を検討した。HDAC4 と 9 で、癌部の mRNA の発現が高い傾向が示唆された。(Figure 2)

Figure 1

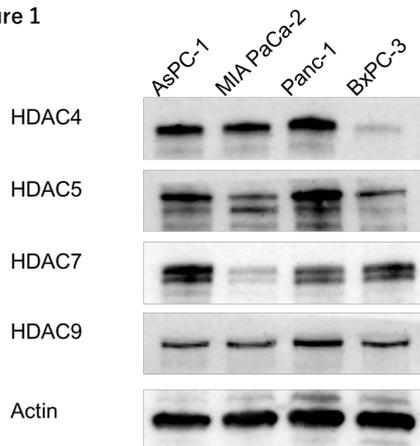
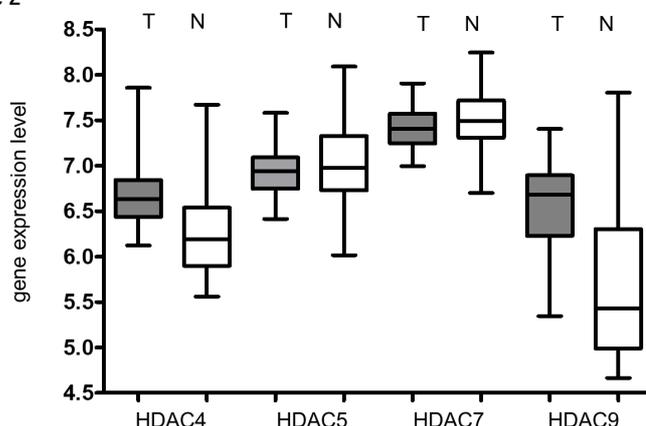


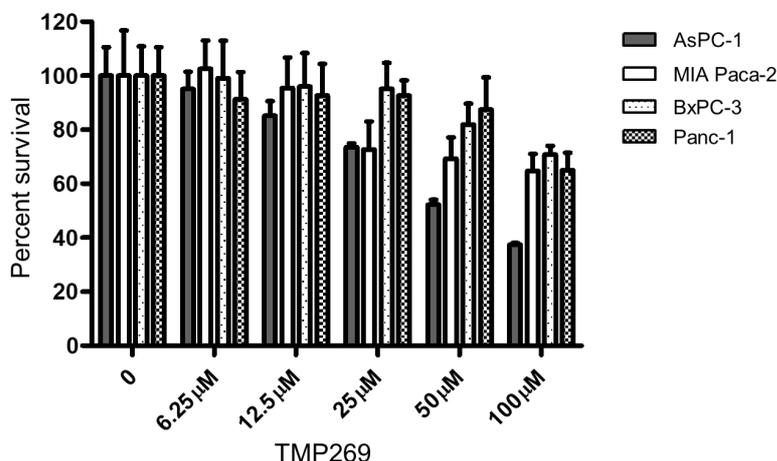
Figure 2



(2) 選択的 HDAC class IIa 阻害剤による膵癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果の検討

選択的 HDAC class IIa 阻害剤 TMP269 による 48 時間処理下での細胞増殖抑制効果を MTT アッセイを用いて、検討を行った。高用量ではあるものの濃度依存性に細胞増殖抑制効果を認め、とくに AsPC-1 において最も細胞増殖抑制効果が認められ、IC50 は 57.5 μ M であった。(Figure 3)

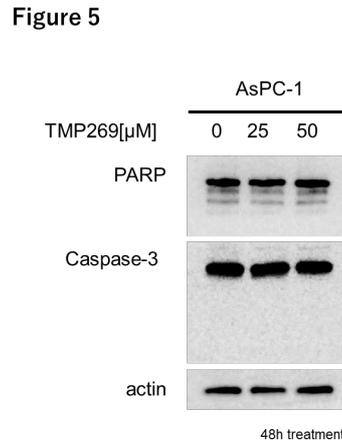
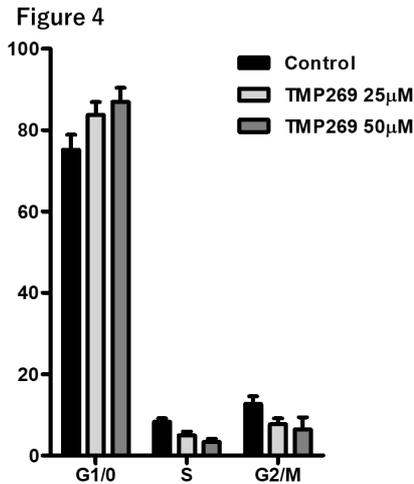
Figure 3



(3) TMP269 による細胞増殖抑制効果の機序の検討

最も細胞増殖抑制効果が認められた AsPC-1 細胞株を用いて、機序を検討した。フローサイトメトリー法を用いて、細胞周期解析を行ったところ、濃度依存的に G1 アレス

トが認められた。(Figure 4) ウェスタンブロッティング法を用いて、アポトーシスの誘導効果を検証したが、PARP、Caspase-3いずれも Full length の発現低下、Cleaved form の発現増強を認められず、細胞増殖抑制効果は主に、アポトーシス誘導ではなく、細胞周期抑制効果によるものと考えられた。(Figure 5)



さらに、G1 アレストの詳細な機序を検討するため、TMP269 処理後の AsPC-1 細胞株の mRNA の発現変化を、アポトーシス関連蛋白に限定した PCR アレイを用いて網羅的に解析した。(Figure 6A) 細胞周期に関連して、発現亢進が認められた P21 protein-activated kinase および Forkhead box O3 (FoxO3) に注目した。(Table 1) FoxO3a は、P21 の上流に位置する転写調節因子で、これまでの報告から Class IIa HDAC の基質として、転写調節因子が広く知られており、TMP269 の G1 アレストにおける直接的な標的として考慮された。TMP269 処理後の FoxO3a の発現を qPCR およびウェスタンブロッティング法を用いて検討したところ、濃度依存的な RNA レベル、蛋白レベルでの発現亢進を認めた。(Figure 6B、C)

Figure 6

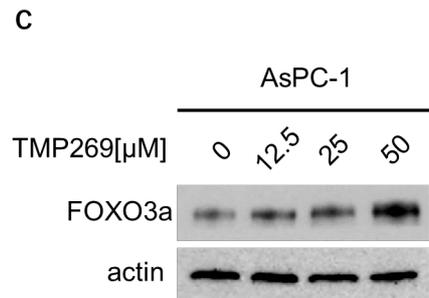
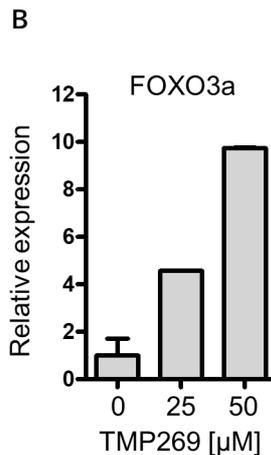
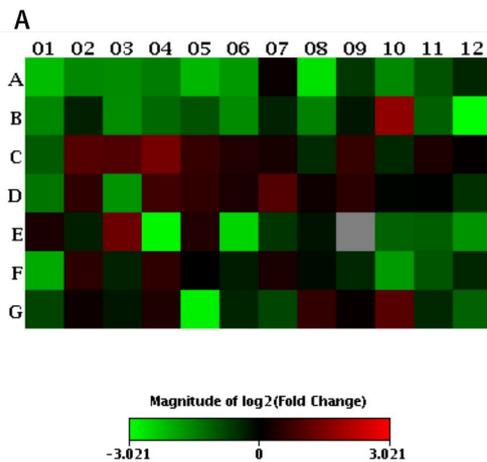


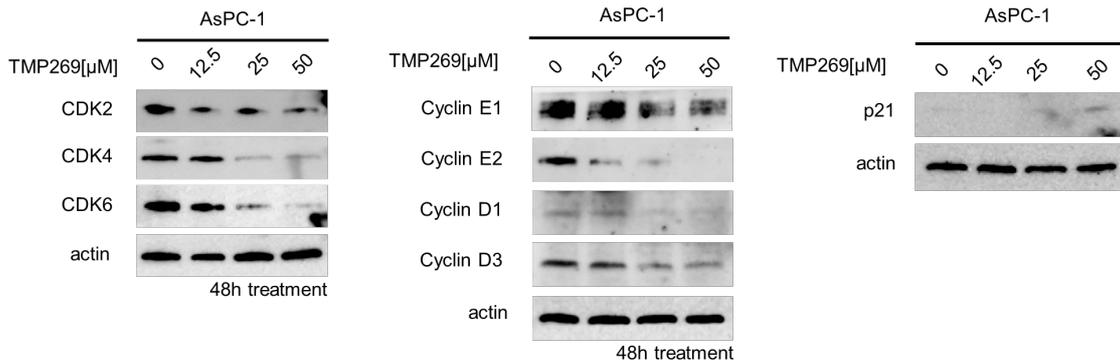
Table 1

| Position | RefSeq | Number | Gene Symbol | Description | Fold Regulation |
|----------|-----------|--------|-------------|--|-----------------|
| B10 | NM_000639 | | FASLG | Fas ligand (TNF superfamily, member 6) | 3.31 |
| C04 | NM_005311 | | GRB10 | Growth factor receptor-bound protein 10 | 2.65 |
| E03 | NM_002576 | | PAK1 | P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1 | 2.43 |
| G10 | NM_000548 | | TSC2 | Tuberous sclerosis 2 | 2.01 |
| C02 | NM_001455 | | FOXO3 | Forkhead box O3 | 1.99 |
| D07 | NM_002746 | | MAPK3 | Mitogen-activated protein kinase 3 | 1.97 |

(4) TMP269 による細胞周期抑制効果の解析

さらに、G1/S check point に関与する蛋白の発現を解析したところ、濃度依存的な CDK2、4、6 および Cyclin E1、E2、D1、D3 の発現低下を認めた。これら CDK および Cyclin は、転写調節因子 FoxO3a の下流に位置しており、TMP269 による FoxO3a の発現亢進をもたらした転写活性化に合致し、かつ G1 アレストの誘導にも合致する結果であった。さらに、p21 の発現亢進も認められ、AsPC-1 は p53 遺伝子欠損の細胞株であるため、この結果が、p53 非依存性にもたらされた可能性が示唆された。(Figure 7)

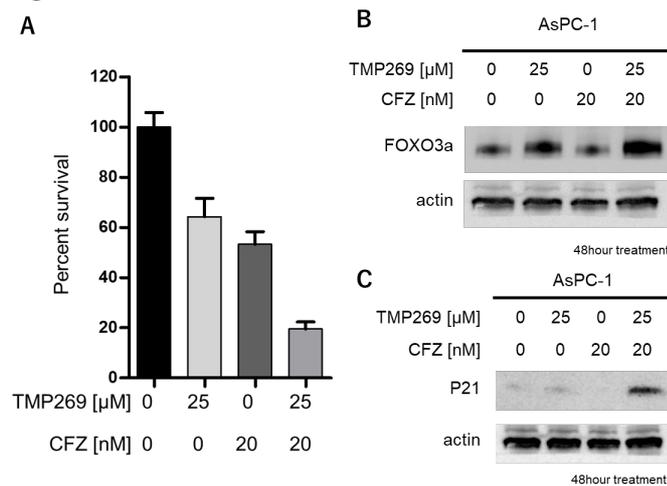
Figure 7



(5) Proteasome 阻害剤との併用効果の検討

転写調節因子 FoxO3a は、細胞質中でプロテアソームによる分解を恒常的に受けて、核中での転写活性化が調整されていることから、プロテアソーム阻害剤との併用により FoxO3a の核内移行をより高めることで、TMP269 との相乗効果による転写活性化が期待された。プロテアソーム阻害剤カルフィルゾミブ (CFZ) との併用療法は、TMP269 あるいは CFZ 単独療法より増強された細胞増殖抑制効果が認められた。(Figure 8A) 併用療法によりより FoxO3a の発現は、タンパクレベルでより増強が認められ、さらに増強された P21 発現亢進が認められたことから、細胞増殖抑制効果の増強は、FoxO3a の転写活性化によりもたらされたと考えられた。

Figure 8



これらの結果から、選択的 HDAC class IIa 阻害剤 TMP269 は、FoxO3a の転写活性化を介して、細胞周期停止を介した抗腫瘍効果をもたらすことが示された。また、その効果は、プロテアソーム阻害剤との併用により増強し、さらには、P53 非依存性に P21 発現亢進をもたらしたことから、P53 遺伝子異常の発現率の高い膀胱癌において、有望な治療選択となりうる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。