

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09183

研究課題名(和文) ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の作用増強による膀胱癌新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel combination therapies enhancing the activity of histone deacetylase inhibitors

研究代表者

佐藤 全伯 (Sato, Akinori)

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、共同利用研究施設、病院並びに防衛・泌尿器科学・講師)

研究者番号：00296675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、進行膀胱癌に対するヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬の作用を他の薬剤を用いて増強する手法での新規治療開発を行った。HIVプロテアーゼ阻害薬ritonavirとHDAC阻害薬panobinostatの併用、ritonavirとHDAC阻害薬vorinostatの併用、HMG-CoA還元酵素阻害薬simvastatinとHDAC阻害薬romidepsinの併用およびritonavirとHDAC-プロテアソーム阻害薬RTS-V5の併用が効果的に膀胱癌細胞を死滅させること及びその作用機序について解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、膀胱癌細胞において、一般に固形癌に対してはその効果が限られているヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の作用を他の既存薬剤を用いて増強することに成功した。本研究結果は、現時点で根治的な治療法が存在しない進行膀胱癌に対する新規治療法開発への基盤となることが期待される。また、既存薬剤を使用することは、新規薬剤開発のコストと時間を短縮する上でも有用である。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the way to enhance the activity of the histone deacetylase (HDAC) inhibitors by combining them with other drugs to develop novel combination therapies against advanced bladder cancer. We found that the below drug combinations kill bladder cancer cells effectively and also clarified the mechanisms of their action: the HIV protease inhibitor ritonavir and the HDAC inhibitor panobinostat, ritonavir and the HDAC inhibitor vorinostat, the HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin and the HDAC inhibitor romidepsin, and ritonavir and the HDAC-proteasome inhibitor RTS-V5.

研究分野：泌尿器癌に対する新規治療法の開発

キーワード：ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 ヒストンアセチル化 小胞体ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私の研究室では、これまで一貫して泌尿器癌に対する既存薬の併用による新規治療の開発を行ってきた。膀胱癌に対しては、HIV プロテアーゼ阻害薬 ritonavir とプロテアソーム阻害薬 ixazomib の併用 (Sato A et al. Cancer Sci 2017) および HIV プロテアーゼ阻害薬 ritonavir と nelfinavir の併用 (Sato A et al. Oncol Res 2017) が小胞体ストレスを誘導し、細胞増殖抑制に有効であることを示した。Ritonavir は細胞内薬物代謝酵素 CYP3A4 および薬物排出ポンプ P-glycoprotein を抑制し、併用薬の booster として働くが、この2つの研究により、膀胱癌においても ritonavir が booster 効果を発揮することが確認された。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 (HDACi) は、ヒストンをアセチル化し、エピジェネティクスの機序で抗腫瘍効果を発揮する薬剤である。ヒストンの低アセチル化は浸潤性膀胱癌と関連しており、HDACi の膀胱癌治療への応用は合理的と考えられる。しかしながら、膀胱癌は HDACi に対する感受性が低く、HDACi 単独での増殖抑制効果は限られている。そこで、booster として、ritonavir を始めとした HIV プロテアーゼ阻害薬と併用することで HDACi の細胞内濃度を上昇させ、効果的にヒストンをアセチル化できると仮定した。

一方で、HDACi は、分子シャペロンをアセチル化して抑制することで、細胞内に生じた異常蛋白の修復を妨げ、細胞内に増加させる働きを持つ。これらの異常蛋白は通常、プロテアソームで分解されるが、HIV プロテアーゼ阻害薬はプロテアソーム阻害作用も有するため、増加した異常蛋白の分解を妨げ、細胞内に蓄積することで小胞体ストレスを誘導すると考えられる。つまり、HDACi と HIV プロテアーゼ阻害薬の併用は、ヒストンアセチル化に加えて、小胞体ストレス誘導を介しても抗腫瘍効果を示すものと考えられた。

さらに、例えばヒストンをアセチル化する作用を持つ薬剤等も HDACi の作用を増強する可能性があり、本研究では、単に HIV プロテアーゼ阻害薬による HDACi の作用増強に留まらず、併用により HDACi の作用を増強する可能性がある薬剤については積極的にその併用効果を検討していくこととした。

2. 研究の目的

現時点で、転移をきたした進行膀胱癌に対する根治的な治療法は存在しない。新しいアプローチによる治療法の開発が急務である。本研究は、HDACi の作用を他の既存薬を併用することで増強するという新しい発想による膀胱癌新規治療法開発を行うことを目的とした。また、こういった併用は、メカニズム的にヒストンアセチル化のみならず、小胞体ストレスも誘導することが予想されるため、これまでの膀胱癌の治療戦略とは全く異なる作用機序を有する新規治療法の開発につながるものと考えられた。

3. 研究の方法

細胞増殖抑制効果の検討

膀胱癌培養株として J82、T24 および UMUC3 を用いた。薬剤としては、HDACi (panobinostat、vorinostat、romidepsin)、ritonavir、プロテアソーム阻害薬 ixazomib、HDAC-プロテアソーム阻害薬 RTS-V5、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 simvastatin を、研究成果の項で示す組合せで投与し (以下、併用療法) 細胞の viability を MTS assay にて検討した。結果を Chou と Talalay らの方法で combination index を算出して解析し、併用効果の相乗性について検討した。

アポトーシス誘導能の検討

併用療法を施行し、Annexin-V 陽性細胞をフローサイトメトリーで検出した。また、western blot 法でアポトーシス関連蛋白の発現の変化を検討した。

細胞周期および細胞周期関連蛋白発現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。また、western blot 法で細胞周期関連蛋白の発現を検討した。

ヒストンアセチル化および小胞体ストレス誘導の検討

併用療法を施行し、ヒストンアセチル化および小胞体ストレスの誘導 (GRP78、HSP70、ERp44 および Ero-1L 等の発現増加) を western blot 法により検討した。さらに小胞体ストレス誘導の原因として、異常蛋白の蓄積の有無をユビキチン化蛋白の発現で調べた。また異常蛋白の蓄積によるオートファジー誘導についても検討した。

In vivo における併用療法の検討

ヌードマウスを用いて膀胱癌皮下腫瘍モデルを作成し、マウスをコントロール群、単剤投与群 (2群) および併用療法群に分け、腹腔内投与による治療を行った。腫瘍体積、体重の変化を測定し、治療効果と副作用について検討した。治療終了後、マウスを安楽死させ、切除した腫瘍よ

り蛋白を抽出して western blot 法によりアポトーシス、ヒストンアセチル化および小胞体ストレスの誘導の有無を検討した。

併用療法における小胞体ストレス誘導の役割の検討

併用療法における小胞体ストレス誘導を蛋白合成阻害薬 cycloheximide を用いて抑制した上で ~ の実験を行い、併用療法における小胞体ストレス誘導の役割について検討した。

4. 研究成果

(1) Ritonavir と panobinostat の併用

Ritonavir と panobinostat の併用は、相乗的にアポトーシスを誘導し、膀胱癌細胞の増殖を抑制した。また、細胞周期関連蛋白である cyclin D1 と cyclin-dependent kinase 4 の発現を抑制し、細胞周期解析における sub-G1 fraction を有意に増加した。併用の作用機序としては、ritonavir が panobinostat によるヒストンアセチル化を相乗的に増強しており、予想通り、ritonavir の booster 効果が示された。一方で、本併用は小胞体ストレスも誘導した。Cycloheximide が本併用の殺細胞効果を減弱したことから、ヒストンアセチル化に加えて小胞体ストレス誘導も重要な作用メカニズムであることが示された。さらに、これらの作用が AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化と関連していることが見出され、AMPK を活性化する薬剤である抗糖尿病薬 metformin と panobinostat の併用もヒストンアセチル化を増強することで膀胱癌を死滅することが示された。

(2) Ritonavir と vorinostat の併用

Ritonavir と panobinostat の併用と同様の作用機序で、ritonavir と vorinostat の併用も相乗的にアポトーシスを誘導し、殺細胞効果を示すことが確認された。

(3) Ixazomib と vorinostat の併用

Ritonavir がプロテアソーム阻害作用を持つこと、ritonavir と vorinostat の併用が相乗的な殺細胞効果を示すこと及びプロテアソーム阻害薬 ixazomib がヒストンをアセチル化することに注目し、ixazomib と vorinostat の併用についても研究を行った。本併用は、仮定通り、相乗的にヒストンアセチル化と小胞体ストレスを誘導した。さらに併用は、AMPK の発現を増強し、mTOR 経路を阻害した。また、cycloheximide を用いて併用による小胞体ストレス誘導を阻害すると、ヒストンアセチル化とアポトーシス誘導は有意に抑制され、本併用における小胞体ストレス誘導の重要性が示された。

(4) Simvastatin と romidepsin の併用

HMG-CoA 還元酵素阻害薬 simvastatin が AMPK 活性化を介してヒストンをアセチル化することに着目し、simvastatin と romidepsin の併用についても研究を行った。併用は in vitro で相乗的な殺細胞効果を示すのみならず、in vivo においても、明らかな副作用なく、有意に腫瘍の増大を抑制した。作用機序の面では、相乗的なヒストンアセチル化と小胞体ストレス誘導が示された。仮定通り、併用は、AMPK を活性化し、相乗的にヒストンをアセチル化するとともに、小胞体ストレスも誘導した。この作用機序は、in vivo の切除腫瘍を用いた検討でも証明された。さらに併用は、PPAR の発現を増加して、ROS 産生を促進した。PPAR activator である rosiglitazone を用いた検討では、PPAR の活性化が膀胱癌増殖抑制に関与していること及び小胞体ストレスを誘導することも示された。さらに、cycloheximide を用いた検討により、小胞体ストレス誘導と PPAR の活性化の間に positive feedback cycle が存在することが明らかになった。なお、TCGA データベースを用いた解析では、PPAR 高発現の膀胱癌患者の予後は、低発現の患者より良好であることが示された。

(5) Ritonavir と RTS-V5 の併用

Bonn 大学の Hansen らが開発した HDACi とプロテアソーム阻害薬の性質を併せ持つ RTS-V5 を使用し、その作用を ritonavir を用いて増強する研究を、国際共同研究として実施した。RTS-V5 と ritonavir の併用はアポトーシスを誘導し、相乗的に膀胱癌増殖を抑制した。この併用効果は in vivo においても証明された。Ritonavir は RTS-V5 によるヒストンのアセチル化および α -tubulin のアセチル化を促進しており、ritonavir による RTS-V5 への booster 効果が示された。さらに、併用はユビキチン化蛋白を蓄積し、小胞体ストレスを誘導するとともに、AMPK の発現を増加し、mTOR 経路を抑制した。併用はオートファジーも相乗的に惹起しており、これはユビキチン化蛋白蓄積および AMPK による mTOR 経路の抑制と一致する結果であった。なお、併用によるヒストンアセチル化と小胞体ストレス誘導については、in vivo においても証明された。膀胱癌細胞自体が CYP3A4 を発現していること、また、CYP3A4 阻害薬である cobicistat と RTS-V5 の併用が、ritonavir との併用と同様の効果および作用メカニズムを示したことから、本研究でみられた ritonavir の booster 効果では CYP3A4 が重要な役割を果たしているものと推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okubo Kazuki, Miyai Kosuke, Kato Kimi, Asano Takako, Sato Akinori	4. 巻 14
2. 論文標題 Simvastatin-romidepsin combination kills bladder cancer cells synergistically	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101154 ~ 101154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tranon.2021.101154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 OKUBO KAZUKI, RESSING NINA, SCHULZ WOLFGANG A., HANSEN FINN K., ASANO TAKAKO, SATO AKINORI	4. 巻 41
2. 論文標題 The Dual Histone Deacetylase-Proteasome Inhibitor RTS-V5 Acts Synergistically With Ritonavir to Induce Endoplasmic Reticulum Stress in Bladder Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5987 ~ 5996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15417	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kazuki Okubo, Makoto Isono, Takako Asano, Akinori Sato	4. 巻 12
2. 論文標題 Metformin augments panobinostat's anti-bladder cancer activity by activating AMP-activated protein kinase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 669-682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tranon.2019.02.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 大久保和樹、浅野貴子、佐藤全伯
2. 発表標題 Simvastatinとromidepsinの併用は膀胱癌細胞を効果的に死滅する：AMPKとPPAR の活性化を介した相乗的なヒストンアセチル化による新規治療アプローチ
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuki Okubo, Takako Asano, Akinori Sato
2. 発表標題 Simvastatin augments anticancer activity of romidepsin in bladder cancer cells by causing AMP-activated protein kinase activation and histone acetylation
3. 学会等名 The 35th European Association of Urology Congress (Virtual) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akinori Sato
2. 発表標題 Die verschwundene Proteine: where are they?
3. 学会等名 The 12th Triennial Meeting German-Japanese Confederation of Urology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akinori Sato, Takako Asano, Kazuki Okubo
2. 発表標題 Vorinostat and ixazomib cause bladder cancer apoptosis synergistically by inducing endoplasmic reticulum stress
3. 学会等名 The 35th European Association of Urology Congress (Virtual) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akinori Sato, Takako Asano, Makoto Isono, Kazuki Okubo
2. 発表標題 Panobinostat and ritonavir cause bladder cancer apoptosis by inducing endoplasmic reticulum stress and histone acetylation synergistically
3. 学会等名 The 114th American Urological Association Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保和樹、浅野貴子、佐藤全伯
2. 発表標題 Simvastatin and romidepsin kill bladder cancer cells by causing AMPK activation and histone acetylation
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保和樹、浅野貴子、佐藤全伯
2. 発表標題 Simvastatin potentiates anticancer activity of romidepsin in bladder cancer cells by causing AMP-activated protein kinase activation and histone acetylation
3. 学会等名 第71回西日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤全伯、浅野貴子、大久保和樹、磯野誠、浅野友彦
2. 発表標題 Panobinostatとixazomibの併用は小胞体ストレスとヒストンアセチル化を誘導し膀胱癌細胞増殖を抑制する
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大久保和樹、佐藤全伯、浅野貴子、磯野誠、浅野友彦
2. 発表標題 Panobinostat と metformin の併用は AMP activated protein kinase を介して蛋白アセチル化と小胞体ストレスを誘導し、膀胱癌細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤全伯、大久保和樹、磯野誠、浅野貴子、浅野友彦
2. 発表標題 Panobinostat and ixazomib induce endoplasmic reticulum stress and histone acetylation in bladder cancer cells
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大久保和樹、佐藤全伯、浅野貴子、磯野誠、浅野友彦
2. 発表標題 Metformin augments panobinostat 's activity by activating AMPK in bladder cancer cells
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akinori Sato, Takako Asano, Makoto Isono, Kazuki Okubo
2. 発表標題 Cobicistat, a potent CYP3A4 inhibitor, acts synergistically with oprozomib to cause endoplasmic reticulum stress in bladder cancer cells
3. 学会等名 The 33rd European Association of Urology Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akinori Sato, Takako Asano, Makoto Isono, Kazuki Okubo
2. 発表標題 Panobinostat and ritonavir cause bladder cancer apoptosis by inducing endoplasmic reticulum stress and histone acetylation synergistically
3. 学会等名 The 114th American Urological Association Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保和樹
2. 発表標題 ヒストンアセチル化およびAMPKを介した膀胱癌治療戦略の探求
3. 学会等名 平成30年度 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://researchmap.jp/zenpaku https://www.researchgate.net/profile/Akinori-Sato-4
--

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	University of Bonn	Heinrich Heine University Duesseldorf	