

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19590148  
 研究課題名 (和文) ヒストン脱アセチル化酵素阻害を基盤とした新規がん分子標的療法の開発  
 研究課題名 (英文) Molecular targeted cancer therapy with HDAC inhibitors

研究代表者  
 尾崎 恵一 (Ozaki Keiichi)  
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
 研究者番号：50252466

## 研究成果の概要：

ERK-MAP キナーゼ経路という細胞増殖に必須な経路の異常かつ恒常的活性化のみられるがん細胞では、その経路遮断薬である MEK 阻害剤と新しい抗がん剤であるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤との併用によって、相乗的な抗がん作用が発現する。その細胞死増強効果は、ミトコンドリア傷害と抗酸化酵素の発現抑制が連動し、致命的な活性酸素の蓄積に至ることで発現した。さらに、ヌードマウスに移植したヒト癌細胞に対しても、併用による相乗効果が劇的に認められ、これらは今後の HDAC 阻害剤を用いた癌治療において重要な知見となる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：オーダーメイド医療、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、がん分子標的療法、ERK

## 1. 研究開始当初の背景

「HDAC 阻害剤の感受性増強剤としてのシグナル経路 (ERK-MAP キナーゼ経路/PI3 キナーゼ経路) 遮断薬の有効性の発見」

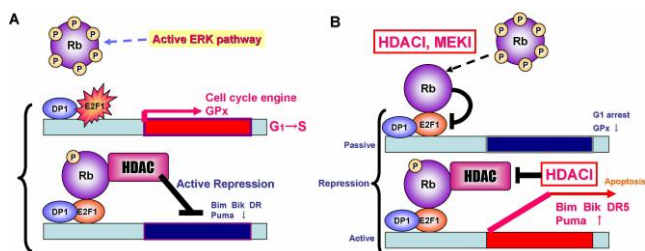
細胞の増殖・生存シグナルの中心である ERK-MAP キナーゼ経路や PI3 キナーゼ経路の

恒常的活性化を示すがん細胞 (EGFR, Ras, B-Raf, PI3K 等の活性型変異、PTEN の機能喪失変異等を原因とする) において、その経路遮断剤を併用することで HDAC 阻害剤に対する感受性が 50~100 倍増強されることを、申請者らは

世界に先駆けて見出した。低濃度 HDAC 阻害剤と各シグナル阻害剤の併用処理により、がん抑制遺伝子 Rb の脱リン酸化(活性化)と Rb によって負に制御される転写因子 E2F1 のダウンレギュレーションの増強が見られ、活性酸素の細胞内蓄積とともにミトコンドリア経路を介した顕著なアポトーシスが誘導された。これは、50~100 倍の高濃度 HDAC 阻害剤単独処理によって誘導される現象と同様であった。なお、Rb は HDAC と転写抑制複合体を形成することが知られている。本併用効果が認められるがん細胞では、oncogenic な増殖・生存シグナルによって抑制された Rb 経路 (E2F1 の異常活性化) が HDAC 阻害剤の標的となっている可能性を見出した。そこで、HDAC 阻害剤の抗がん作用メカニズムとして、Rb-E2F1 経路による遺伝子転写制御に注目している。

## 2. 研究の目的

(1)HDAC 阻害剤と MEK 阻害剤との併用による細胞死誘導増強の分子機構を明らかにし、HDAC 阻害剤の腫瘍選択的な制癌作用発現のメカニズムを解明すること。(申請者らが見出した知見から、次のような仮説を立てた。主に E2F1 の 2 方向性の転写活性制御を中心に解析し、以下の仮説証明を試みることで目的を達成する。)



\*「HDAC 阻害剤の主なターゲットは、多くの癌細胞で活性化されている Rb-E2F1 経路である。」(図 A:ERK 経路の恒常的に活性化された癌細胞では、高リン酸化された Rb は不活性化され、転写因子 E2F1 が活性化されて増殖能が高く、抗酸化酵素 GPx の発現レベルも高い。一方、E2F1 のもう 1 つの背反する活性であるアポト

シス誘導能は、HDAC によって抑制されている。)

\*\*「Rb による転写因子 E2F1 抑制機構として、passive repression および、低リン酸化 Rb-HDAC 複合体が関与する active repression との二通りがあり、後者によってアポトーシス誘導因子の発現が厳密におさえられている。」(図 B:ERK 経路の活性化された癌細胞を MEK 阻害剤、HDAC 阻害剤で処理することにより、Rb が復活し E2F1 を抑えることで G1 停止、GPx の発現低下がおこる。一方、アポトーシス誘導因子の抑制は HDAC 阻害剤によって解除され、Bim などの発現誘導によりミトコンドリアの膜透過性が亢進し、ROS 放出がすすむ。)

①癌細胞における Rb-E2F1 経路、ERK 経路、HDAC の活性化レベルの相関を調べる。また、E2F1 経路が活性化している Rb 変異細胞、活性化型 Ras 導入細胞、逆に Rb や E2F1 を siRNA でノックダウンさせた癌細胞などを用いることで HDAC 阻害剤感受性との関連を見出す。

②抗 Rb, E2F1, HDAC 抗体を用いた、クロマチン免疫沈降法によって関連遺伝子を各種調べることで、Rb-HDAC を介したアポトーシス誘導因子に対する active repression の存在を調べる。

(2)HDAC 阻害剤と MEK 阻害剤との併用による細胞死誘導増強効果を、Xenograft モデルによって検証し、HDAC 阻害を基盤とした効果的ながん分子標的療法の開発に向けた基礎的データを集積すること。

(関西大学・上里新一教授らのグループにより、次のことが明らかにされているHDAC阻害剤の提供をうけることになり、動物実験が可能となった。)

新規HDAC阻害剤K-32, K-197, K-198が、いくつかのヒト癌細胞株に対して増殖阻害活性を有し、特に、K-32に関しては、マウス白血病細胞P388移植動物モデル実験において顕著な延命効果(5匹中1匹は腫瘍完全消失:CR)が認められている。一方、このK-32を基本構造とし、2-アミノベンズアミド基をもつK-198は、癌細胞の増殖抑制効果は臨床試験中のHDAC阻害剤であ

るSAHA(一部、アメリカで認可)、MS-275と同程度の活性を有しながら、正常細胞に対してはより低毒性を示す。また、ヒト血漿中代謝安定性試験においては、K-198は臨床開発中の経口HDAC阻害剤MS-275に匹敵する代謝安定性を示しており、動物実験に最も適していると考えられる。以上の知見をもとに、移植に用いるヒト癌細胞はB-RAF活性型変異によりERK-MAPキナーゼ経路の恒常的活性化の見られるヒト大腸癌細胞株を用いて担癌ヌードマウスを作成し、新規HDAC阻害剤(今のところ安定性、安全性の高いK-198が望ましいと考えている。)単独、及びMEK阻害剤 PD184352との併用による抗腫瘍活性、毒性について検討する。

### 3. 研究の方法

(1)Rb のE2F1 抑制メカニズム(=HDAC 阻害剤の作用メカニズム)の解明—

①Rb, E2F1, HDAC 間の相互作用を各種癌細胞株における内因性レベルおよび 293T 細胞における過剰発現系において解析した。

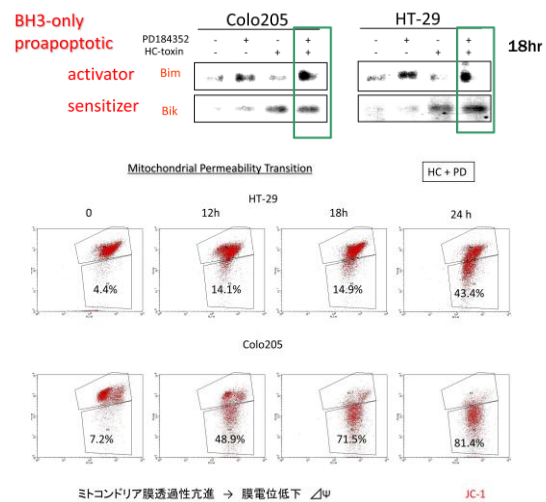
②Rb 経路異常(Rb 変異・欠損、ERK/PI3K 経路=Rb 抑制シグナルの亢進、E2F1 やHDAC の高発現など)の有無で分類したがん細胞株を、HDAC 阻害剤、シグナル伝達遮断剤、あるいはそれらを組み合わせて処理した。そこで、E2F1 応答性遺伝子(細胞周期促進・アポトーシス誘導因子)のプロモーター活性を調べるとともに、その発現レベルや時間変動をマイクロアレイやクロマチン免疫沈降法(CHIP)によって解析した。特に、アセチル化ヒストン, HDAC1-3, E2F1, Rb に対する抗体を用いた CHIP アッセイを行うことで、「RB による E2F1 応答遺伝子の発現抑制における HDAC 依存性」について検討した。

(2) *in vivo* xenograft model における新規 HDAC 阻害剤 K-32, K-197, K-198 と MEK 阻害剤 PD184352 併用による抗腫瘍活性について検討した。

### 4. 研究成果

(1) BRAF active mutant を有するヒト大腸がん細胞株(HT29, Colo205)に対して、MEK 阻害剤(PD184352)と HDAC 阻害剤(HC-toxin)との併

用処理によって、下図のように apoptosis 誘導因子である Bim や Bik などの BH-3 only protein の誘導とミトコンドリア傷害(膜電位の低下)が継時的にすすむ。したがって、ROS の最大の発生部位としてはミトコンドリアが考えられ、かつ、抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼの発現抑制による抗酸化力低下が連動することによって、致命的な ROS 蓄積に至ることを明らかにした。また、その遺伝子発現制御には Rb-E2F1 経路が関わっていると考えられ、現在クロマチン免疫沈降法によりさらに詳細に解析している。



(2) 担癌ヌードマウス(xenograft model)に対する本併用効果の検討を行うにあたって、新規 HDAC 阻害剤 K-32, 197, 198 (関西大学上里教授より提供)を用いた併用効果について解析したところ、*in vitro* 効果については認められたものの、*in vivo* レベルでは著しく弱かった。そこで、新たに経口 HDAC 阻害剤として臨床開発のすすむ MS-275 を用いて併用効果を検討した。B-RAF 活性型変異により ERK 経路の恒常的活性化のみられるヒト大腸癌細胞株 HT-29 の担癌ヌードマウスを作成し、MS-275 単独、および MEK 阻害剤 PD184352 との併用効果を検討したところ、併用による相乗効果が劇的に認められた(下図・右)。以上より、本併用療法の有効性が

*in vivo* レベルにおいても証明され、副作用軽減、制がん作用増強の観点から今後の HDAC 阻害剤を用いた癌治療において重要な知見である。



#### 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 6 件)

- ① S. Tanimura, A. Uchiyama, K. Watanabe, M. Yasunaga, Y. Inada, T. Kawabata, K. Iwashita, K. Ozaki and M. Kohno. “Blockade of constitutively activated ERK signaling enhances cytotoxicity of microtubule-destabilizing agents in tumor cells.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 650-655(2009) 査読あり
- ② 尾崎恵一, 谷村進, 河野通明「細胞内シグナル伝達経路の選択的遮断を基盤としたがん治療戦略」*ファルマシア* 44 巻, 219-224 (2008)
- ③ K.Ozaki, F. Futaba, M.Tanaka, T.Sakamoto, S.Tanimura and M.Kohno. “Histone deacetylase inhibitors enhance the chemosensitivity of tumor cells with cross-resistance to a wide range of DNA-damaging agents”. *Cancer Sci.* **99**, 376-384 (2008) 査読あり
- ④ S. Tanimura, A. Hirano, J. Hashizume, M. Yasunaga, T. Kawabata, K. Ozaki and M. Kohno. “Anticancer drugs upregulate HspBP1 and thereby antagonize the

prosurvival function of Hsp70 in tumor cells.” *J. Biol. Chem.* **282**, 35430-35439 (2007) 査読あり

- ⑤ Y. Fujiwara, Y. Hosokawa, K. Watanabe, S. Tanimura, K. Ozaki and M. Kohno. “Blockade of the phosphatidylinositol-3-kinase Akt signaling pathway enhances induction of apoptosis by microtubule-destabilizing agents in tumor cells in which the pathway is constitutively activated.” *Mol. Cancer Ther.* **6**, 1133-1142 (2007) 査読あり
- ⑥ K.Ozaki. “Targeted molecular strategies for cancer therapy based on the blockade of oncogenic pathways in human tumor cells” *J.Pharm. Soc. Japan* **127**, 983-991(2007) 査読あり

[学会発表](計 10 件)

- ① T.Sakamoto, K.Ozaki, N.Baba, K.Fujio, S. Tanimura, M.Kohno. “Blockade of constitutively activated ERK signaling enhances cytotoxicity of HDAC inhibitors in tumor cells” *The Second Asian Symposium on Pharmaceutical Sciences in Nagasaki* (長崎) 2009 年 3 月
- ② 積佳江, 尾崎恵一, 坂野 喜子, 河野通明「PI3 キナーゼ/Akt 経路遮断剤とドキシソルビシンの併用による細胞死誘導増強:セラミドの関与」*Biochemistry and Molecular Biology* 2008 (神戸) 2008 年 12 月
- ③ 尾崎恵一, 田中将人, 河野通明 “Molecular mechanism via which solid tumors become chemoresistant under hypoxic conditions.” 第 67 回 日本癌学会総会 (名古屋) 2008 年 10 月
- ④ 坂元利彰, 尾崎恵一, 河野通明 “Molecular mechanism for the enhanced cell death induced by the combination of HDAC

inhibitors and MEK inhibitors.” 第 67 回日本  
癌学会総会（名古屋） 2008 年 10 月

- ⑤ 積佳江, 尾崎惠一, 河野通明 「PI3キナー  
ゼ/Akt 経路遮断剤とドキシソルビシの併用に  
よる細胞死誘導増強—セラミドの関与」  
第24回 日本薬学会九州支部大会（福岡）  
2007 年 12 月
- ⑥ 田中将人, 尾崎惠一, 河野通明 「低酸素  
環境下における癌細胞の抗癌剤耐性獲の  
分子機構」 第24回 日本薬学会九州支部  
大会（福岡） 2007年12月
- ⑦ 坂元利彰, 馬場伸幸, 尾崎惠一, 河野通  
明 「HDAC 阻害剤と MEK 阻害剤の併用  
による細胞死誘導の分子機構」 第 24 回  
日本薬学会九州支部大会（福岡） 2007 年  
12 月
- ⑧ 尾崎惠一, 小杉正生, 坂元利彰, 河野通  
明 “Effective chemotherapeutic strategies  
for the treatment of lung adenocarcinoma  
cells harboring EGFR mutation 第 66 回  
日本癌学会総会（横浜） 2007 年 10 月
- ⑨ 河野通明, 谷村進, 尾崎惠一 “Targeting  
the ERK signaling pathway in cancer  
therapy” 第 66 回日本癌学会総会（横浜）  
2007 年 10 月
- ⑩ 藤原雄介, 渡邊一石, 谷村進, 尾崎惠一,  
河野通明 “Blockade of the PI3K-Akt  
pathway selectively enhances induction of  
apoptosis by microtubule-destabilizing  
agents.” 第 66 回日本癌学会総会（横浜）  
2007 年 10 月

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

尾崎 惠一 (Ozaki Keiichi)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号:50252466