

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790940  
 研究課題名 (和文) アセチル化修飾による細胞周期制御の分子機構と乳癌抑制に向けた新規標的分子の探索  
 研究課題名 (英文) Molecular mechanism of vorinostat-induced cytotoxicity in human breast cancer cells  
 研究代表者  
 上原 範久 (UEHARA NORIHISA)  
 関西医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：30368211

研究成果の概要 (和文)：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) は、様々な癌細胞に細胞周期停止、分化および細胞死を誘導するが、その機序の詳細は未知である。我々は、ヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 への vorinostat 処理が、増殖抑制およびアポトーシスを誘導することを確認した。増殖抑制機序として、新たに SCF ユビキチンリガーゼ複合体分子 Skp2、Cks1 発現抑制に伴う p21、p27 の蓄積を見出した。さらに、アポトーシス誘導において、p38 MAPK の活性化が必須であることを発見した。本研究により得られた知見は、HDAC 阻害剤の抗癌効果における Skp2、Cks1 および p38MAPK の新たな機能のみならず、癌治療効果増強への応用の可能性が期待される。

研究成果の概要 (英文)：

Vorinostat is an inhibitor of histone deacetylases that effectively suppresses proliferation of various cancer cells by inducing cell cycle arrest and/or apoptosis. However, signaling events leading to apoptosis in response to vorinostat is not fully understood. In the present study, we found that vorinostat induced G2/M cell cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells. Vorinostat-treated MDA-MB-231 cells exhibited the accumulation of p27 protein, which inversely correlated with the Skp2 and Cks1 expression, the components of SCF<sup>Skp2-Cks1</sup> ubiquitin ligase complex. Our results constitute novel evidence that the elevation of p21 and p27 level by vorinostat may be in part due to the down-regulation of Skp2 and Cks1. Furthermore, we found that vorinostat triggered the intrinsic apoptosis pathway, which was associated with the accumulation of acetylated histone H3. Our data provide strong evidence that the activation of p38 MAPK is a crucial event in the apoptotic response to vorinostat in MDA-MB-231 cells. These findings could provide useful insights into more effective cancer therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：HDAC inhibitor, G2/M arrest, Skp2, Cks1, apoptosis, p38MAPK, breast cancer

## 1. 研究開始当初の背景

癌の発症には、遺伝子の変異の他、DNA のメチル化あるいはヒストンタンパク質の翻訳後修飾による遺伝子配列の変化を伴わない遺伝子発現調節の異常、すなわちエピジェネティクス制御異常が関与することが知られている。このエピジェネティクスを制御する酵素の一つであるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を標的とした特異的阻害剤は抗癌活性を有しており、癌の治療・創薬の分野において注目を集めている。HDAC 阻害剤の抗癌効果は、アセチル化ヒストンの蓄積を介した細胞増殖、分化、細胞死関連遺伝子群の調節に起因すると考えられているが、その詳細な機構は未だよく知られていない。

## 2. 研究の目的

我々は、アセチル化修飾によるエピジェネティクス制御を介した乳癌の予防・治療への応用を研究の全体構想として掲げ、本研究において、HDAC 阻害剤によるアセチル化修飾を介した細胞周期制御機構を遺伝子・タンパク質レベル解明し、乳癌抑制の新規標的分子の探索を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) アセチル化修飾を介した細胞周期制御機構の解析

#### 乳癌細胞株と材料

ヒト乳癌細胞株 MCF-7 および MDA-MB-231 は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。細胞は、牛胎児血清 10% を含む DMEM 培地で 5% CO<sub>2</sub> 環境下 37°C にて培養した。HDAC 阻害剤 vorinostat は DMSO に溶解し 50 mM ストック溶液とした。

#### 細胞増殖の解析

Vorinostat による細胞増殖変化は MTT 法により検討した。

#### 細胞周期解析

MDA-MB-231 および MCF-7 細胞は、Vorinostat 処理 24~72 時間後、エタノール固定、PI 染色を行い FACSCaliber により解析した。

#### ウェスタンブロット法

MDA-MB-231 および MCF-7 細胞を Vorinostat 処理 24~72 時間後、タンパク抽出を行い、細胞周期関連タンパク (p21, p27, p57, Cyclin A, Cyclin B1, Cdk1, Cdk2, Cdk4, Cdk6, Skp2, Cks1) の発現変化は、各特異的抗体を用いてウェスタンブロット法により検討した。

#### Real-time PCR

上記細胞周期関連遺伝子の vorinostat 処理後の発現変化は、各特異的プライマーを用い、

real-time PCR 法により解析した。

#### パルスチェイス法

p21, p27, p57 タンパクの安定性は、細胞への vorinostat 処理後、cycloheximide 添加し、経時的にタンパク量の変化をデンストメトリーにより定量することで解析した。

### (2) アセチル化修飾を介したアポトーシス誘導機構の解析

#### アポトーシス解析

Vorinostat による乳癌細胞へのアポトーシス誘導は terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay および annexin V assay により解析した。

#### ウェスタンブロット法

Vorinostat 処理およびタンパク抽出は (I) と同様に行い、アポトーシス関連タンパク (Bax, Bak, Bim, Bcl-2, Bcl-XL, survivin, XIAP, caspase-3) および MAP キナーゼファミリータンパク (ERK1/2, p38MAPK, JNK および各リン酸化フォーム) の発現変化は、各特異的抗体を用いて検討した。

#### RNAi

p38MAPK のノックダウンは、21 分子の特異的 siRNA 分子を作製し、リポフェクション法により乳癌細胞株へ導入することで行った。

## 4. 研究成果

### (1) アセチル化修飾を介した細胞周期制御機構の解析

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) は抗腫瘍活性を有しており、その効果と作用機序が注目されている。我々は、HDACi による乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞の増殖抑制機序の解析を行った。MDA-MB-231 を vorinostat 存在下で 72 時間培養を行い、細胞増殖を MTT 法により検討した。その結果、vorinostat 濃度依存的に増殖抑制が確認され、IC<sub>50</sub> は 5.6 μM であった (Figure 1)。

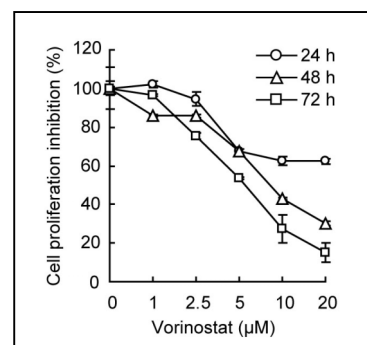


Figure 1

また、フローサイトメトリーによる細胞周期解析の結果、vorinostat 処理により、G2/M 期の顕著な蓄積がみられた (Table 1)。

	Vorinostat ( $\mu\text{M}$ )				
	0	1.25	2.5	5	10
G1	58.1	61.29	71.26	65.04	62.51
S	28.92	26.24	11.87	6.38	5.44
G2/M	12.98	12.47	16.87	28.59	32.05

\*vorinostat 処理後 24 時間

Table 1. vorinostat による細胞周期変化

次に、MDA-MB-231 細胞を 5.0  $\mu\text{M}$  vorinostat 存在下で 72 時間培養を行い、細胞周期関連分子の発現変化をウェスタンブロットにより解析した結果、Cyclin A、Cyclin B1 及び Cdk1 の顕著な発現低下がみられた (未記載データ)。一方、CDK インヒビターである p21、p27 の発現が著しく増加していた (Figure 2)。

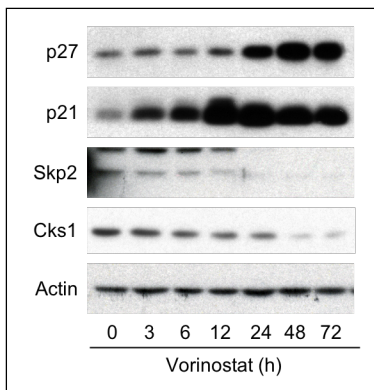


Figure 2

また real-time PCR 解析の結果、*cyclin A*、*cyclin B1*、*cdk1* および *p21* mRNA 量はタンパク発現量と相関しており、これらの発現は転写レベルでの調節によるものと考えられた。しかしながら、vorinostat 処理後の *p27* mRNA 量の上昇は見られなかったことから、*p27* の発現亢進は分解抑制によるタンパク安定化が原因であると考えられた。そこで、シクロヘキシミド処理後の *p27* および *p21* タンパクの半減期を追跡実験により検討したところ、vorinostat 処理により、いずれのタンパクの半減期が顕著に延長することを見出した (Figure 3)。

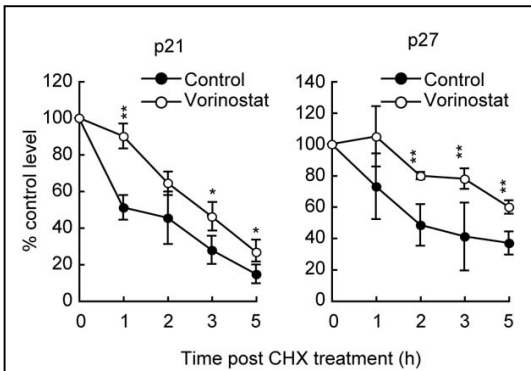


Figure 3

次に、*p27* の分解に関わる SCF ユビキチンリガーゼ複合体の重要な構成分子である *Skp2* および *Cks1* の発現を検討した。その結果、vorinostat 処理により、*Skp2* および *Cks1* mRNA (未記載データ) およびタンパク発現量の発現低下がみられ、*p27* 発現と逆相関していた (Figure 2)。

以上本研究において、vorinostat は MDA-MB-231 細胞に G2/M アレストを誘導し、その細胞周期停止において、①Cyclin A、Cyclin B1 および Cdk1 の発現低下、②p21 および *p27* タンパク質の発現上昇がみられた。さらに③SCF 複合体構成分子である *Skp2* および *Cks1* mRNA およびタンパク質発現低下に伴う p21 および *p27* タンパク質の安定化を見出した (Figure 4)。

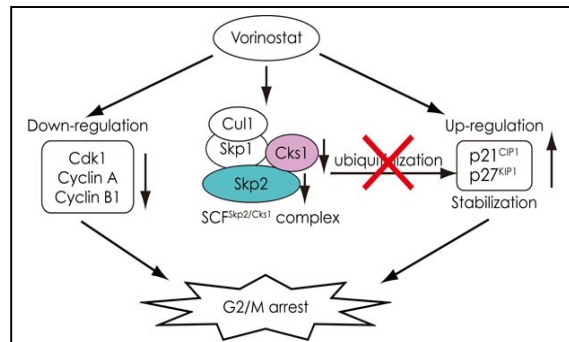


Figure 4

vorinostat による *Skp2* および *Cks1* の発現抑制機構の詳細は未だなされておらず、非常に新規性が高いと考える。さらに *Cks1* は、*Skp2* 同様に *p27* の分解に重要な役割を果たすことがノックアウトマウスの実験から証明されており、乳癌において高発現していることから、乳癌抑制の重要なターゲットであると考えられる。

## (2) アセチル化修飾を介したアポトーシス誘導機構の解析

vorinostat による細胞死誘導は、癌細胞増殖抑制における重要な機序である。しかしながら、生存、細胞死に対する重要なシグナル伝達分子である MAP キナーゼ (ERK1/2、p38、JNK) の役割は未だ詳細な検討が行われていない。そこで我々は、vorinostat の MDA-MB-231 細胞に対する細胞死誘導効果とその機序の詳細について、MAP キナーゼの関与とともに検討した。MDA-MB-231 を 5.0  $\mu\text{M}$  vorinostat 存在下で 72 時間培養を行い、アポトーシス誘導の評価を TUNEL 法により検討した結果、処理後 24 時間後において顕著なアポトーシス誘導が検出され (~20%)、72 時間後 (~10%) まで確認された (Figure 5)。

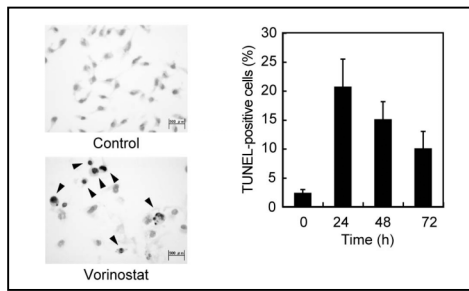


Figure 5

また、アポトーシス関連分子の発現変化をウェスタンブロット法により解析した結果、アポトーシス促進タンパクである Bim、Bak、caspase-3 の発現上昇および抗アポトーシスタンパクの Bcl-XL、XIAP、survivin の発現低下が観察された (Figure 6)。

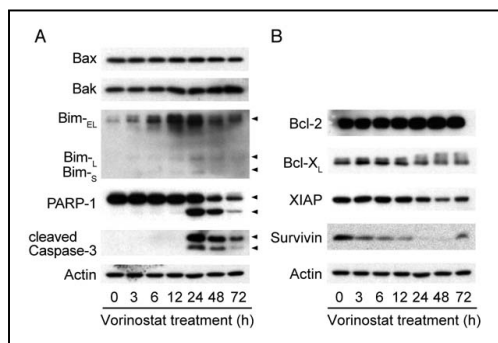


Figure 6

次に、MAP キナーゼ (ERK1/2、p38、JNK) 活性化の関与をリン酸化特異的抗体を用いたウェスタンブロットにより検討した。その結果、vorinostat 処理により、ERK1/2 の不活性化、p38 および JNK の顕著な活性化が認められた (Figure 7)。

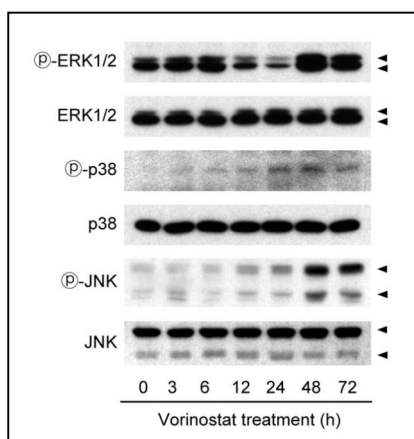


Figure 7

興味深いことに、vorinostat によるアポトーシス誘導の経時変化と p38 MAPK の活性化の強い相関がみられた (Figure 6 and 7)。そ

こで、vorinostat のアポトーシス誘導における p38 活性化の役割に関して検討を行った。siRNA による p38 MAPK をノックダウンした後、vorinostat に対する細胞死感受性変化を、アネキシン V 染色後、フローサイトメトリーにより解析した。その結果、p38 MAPK ノックダウン細胞において、コントロールと比較して顕著な陽性細胞の減少がみられた (Figure 8)。また、p38 MAPK ノックダウン細胞において、コントロールと比較し vorinostat 処理後の caspase-3 活性化の抑制および Bcl-XL、survivin の発現レベルの維持が観察された。

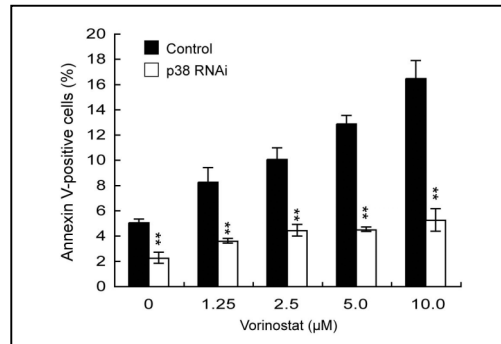


Figure 8

以上より、p38MAPK は caspase-3 および Bcl-XL、survivin 制御を介して、vorinostat によるアポトーシス誘導に必須であることが明らかとなった。

本研究において、ヒト乳癌細胞への HDAC 阻害剤処理による増殖抑制において、SCF 複合体構成分子 Skp2 および Cks1 の発現抑制の重要性とそれに関連する分子メカニズムの一端を明らかにした。さらに、p38MAPK が癌抑制において重要な標的分子となりうることを示唆する証拠を得たとともに、HDACi による癌治療・予防への応用に新たな知見を寄与しうる意義ある研究成果と考える。

### 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)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 上原 範久 “Role of p38MAPK in a cell-death pathway triggered by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) in human breast cancer cells” 日本癌学会 2009 年 10 月 2 日、パシフィコ横浜
- 2) 上原 範久 “ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による MAP キナーゼシグナルを介した乳癌細胞死誘導機序” 日本病理学会 2009 年 5 月 2 日、京都国際会議場
- 3) 上原 範久 “ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による Skp2, Cks1 発現制御と p27 の安定化” 日本分子生物学会 2008 年

12月11日、神戸国際会議場

- 4) 上原 範久 “Molecular mechanisms of suberoylanilide hydroxamic acid-induced G2/M arrest in human breast cancer (MDA-MB-231) cells” 日本癌学会  
2008年10月28日、名古屋国際会議場
- 5) 上原 範久 “ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の乳癌細胞増殖抑制機序とp38MAPK活性化の関与” 日本病理学会  
2008年5月16日、ホテル日航金沢

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上原 範久 (UEHARA NORIHISA)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号：30368211

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：