

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590166

研究課題名（和文）HDAC 阻害剤による「がんの個別化治療」確立のための基礎的検討

研究課題名（英文）Basic research on personalized treatment of cancer by HDAC inhibitors

研究代表者

尾崎 恵一 (OZAKI KEI-ICHI)

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（和文）：新規な抗癌剤であるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤は、ERK-MAP キナーゼ経路の恒常的活性化した癌細胞に選択性が高い。さらに、MEK 阻害剤によって本経路を遮断することで、顕著な HDAC 阻害剤感受性増強に至る分子機構を明らかにした。また、チロシンキナーゼ阻害剤であるいくつかの分子標的薬耐性がんにも有効であることを、*in vitro*、および xenograft による動物実験によって証明した。これらの成果は、今後の HDAC 阻害剤によるがんの個別化治療に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Histone deacetylase (HDAC) inhibitors which are promising anti-tumor agents have high selectivity to the cancer cell in which the ERK-MAP kinase pathway is constitutively activated. The molecular mechanism which results in remarkable HDAC inhibitor sensitivity by blockade of this pathway with MEK inhibitors was clarified. Moreover, *in vitro* and the animal experiment with xenograft model proved that it is effective also in the cancers which are resistant to some molecular-targeted drugs such as tyrosine kinase inhibitors. It is expected that these results will be useful for the personalized treatment of cancer by HDAC inhibitors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

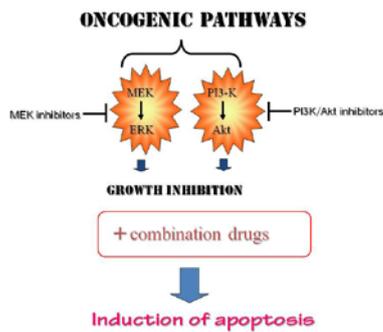
1. 研究開始当初の背景

1) がん分子標的治療における標的経路
多くのがん細胞において、恒常的な活性化がみられる二大経路：ERK-MAP キナーゼ経路と

PI3 キナーゼ/Akt 経路に対して、それらの経路を特異的に遮断するキナーゼ阻害剤をもちいてがん細胞を処理すると、選択的な増殖阻害には至るが、アポトーシス誘導には至

らない。そこで、両経路遮断薬に既存、新規な抗癌剤を組み合わせる併用効果を検討したところ、いくつかの組み合わせで劇的なアポトーシスを誘導できることを見出した(図1)。本研究テーマは、そのうち、ERK 経路遮断薬 MEK 阻害剤と、新規な抗癌剤として注目されているヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤との組み合わせによる劇的な併用効果を対象としたものである。

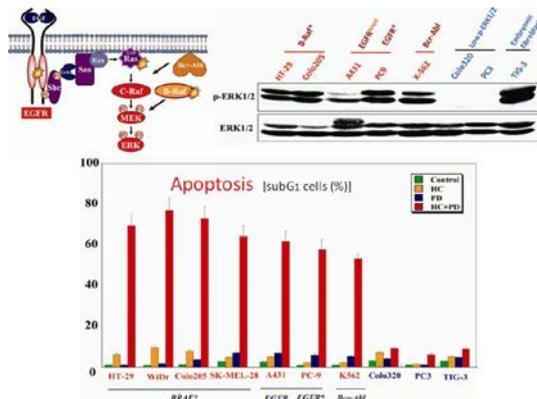
(図1)



2) MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤との併用効果

ERK 経路の恒常的活性化の認められる多くのがん細胞に対して、MEK 阻害剤は HDAC 阻害剤に対する感受性を大幅に増強することが可能であることを見出した。さらに、アポトーシスの mediator として、活性酸素種 ROS が重要であることを明らかにしている。

(図2) BRAF, EGFR, Bcr-ABL などの上流分子の活性化型変異に起因する ERK 経路の恒常的活性化がん細胞に対して、MEK 阻害剤 (PD184352) と HDAC 阻害剤 (HC) との併用は有効である。



2. 研究の目的

「HDAC 遮断を基盤したがん化学療法」において、以下の項目を研究目的とする。

- 1) HDAC 阻害剤の抗がん作用発現のメカニズム、HDAC 阻害剤に感受性の高いがん細胞を特定し、バイオマーカー同定を試みる。
- 2) MEK 阻害剤 (PD184352) と HDAC 阻害剤 (HC) との併用効果の有効性の検討と分子機構の

解明 (*in vitro* レベル)

3) Xenograft モデルを用いた、*in vivo* 動物実験における MEK 阻害剤 (PD184352) と HDAC 阻害剤 (HC) との併用効果の有効性の検証。

3. 研究の方法

1) ERK 経路の活性化レベルの高いがん細胞株に HDAC 阻害剤高感受性が確認されたことから、エストロゲン受容体と Raf-1 が融合した遺伝子を発現させ、エストロゲン添加によって ERK 経路の活性化が誘導できる NIH-3T3RafER (RafER) 細胞をもちいて、ON/OFF で HDAC 阻害剤の感受性を調べるとともに、細胞内分子の解析を行った。同時に、ERK 経路の活性化レベルの異なるがん細胞群についても、同様に解析した。

2) チロシinkinナーゼ阻害型分子標的薬の主流である、Imatinib Gefitinib に耐性であるがん細胞群に対して、MEK 阻害剤と HDAC 剤との併用療法の有効性を検討した。

さらに、その併用効果のメカニズム解明のために ROS の細胞内蓄積の分子機構に焦点をあてて解析した。

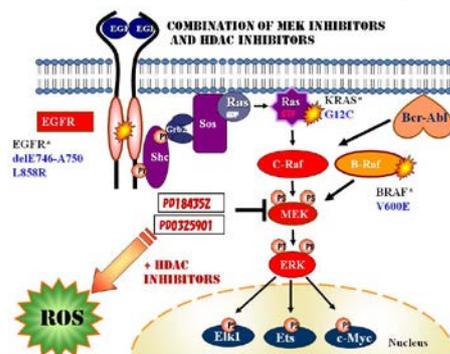
3) BRAF 活性化型変異 HT-29 大腸癌細胞株、EGFR 活性化型変異 gefitinib 耐性 H1650 肺がん細胞株をヌードマウスに移植し、MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤との併用療法の効果を検討した。

4. 研究成果

1) ERK 経路の活性化レベルの高い細胞ほど、HDAC 阻害剤感受性は高い傾向にあることが明らかになった。ただし、p53 遺伝子型については、正常細胞においては、HDAC 阻害剤感受性増強に寄与するが、がん細胞については、逆に HDAC 阻害剤感受性の減弱に機能する可能性を見出した。これらの結果は、ERK 経路の活性化レベルや p53 遺伝子型が HDAC 阻害剤感受性のバイオマーカーとして重要であることを示唆している。

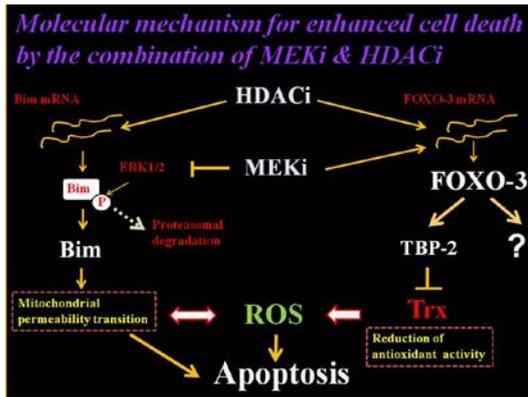
2) Imatinib Gefitinib に耐性であるがん細胞群に対して、MEK 阻害剤と HDAC 剤との併用療法は極めて有効である事を明らかにした。

(図3) MEK 阻害剤 (PD184352) と HDAC 阻害剤 (HC) との併用は ROS 蓄積、細胞死を誘導



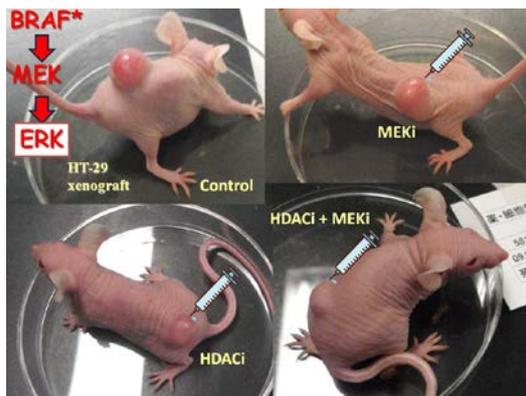
ROS の細胞内蓄積の分子機構としては(図4)の様に、HDAC 阻害剤と MEK 阻害剤によって誘導される転写因子 FOXO-3 のターゲット遺伝子である TBP-2(Thioredoxin Binding Protein-2) という抗酸化タンパク質 Thioredoxin を阻害して細胞内の抗酸化レベルを減弱させる分子の誘導と、両薬剤によって増強されるアポトーシス誘導性 Bim によるミトコンドリア傷害との連動によるものと考えられた。

(図4)



3) BRAF 活性化型変異 HT-29 大腸癌細胞株、EGFR 活性化型変異 gefitinib 耐性 H1650 肺がん細胞株の xenograft モデルに対して、MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤との併用療法は極めて有効であることがわかった。

(図5)HT-29 xenograft model に対する併用効果は腫瘍のサイズをみても顕著であった。

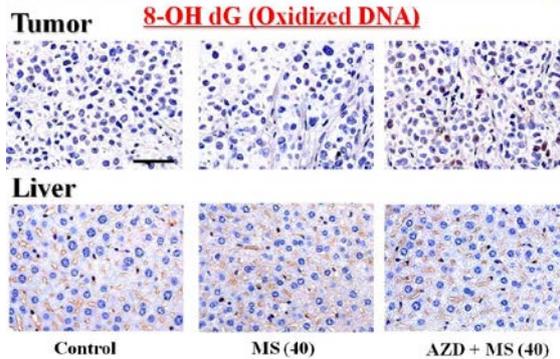


更に、細胞死の mediator としての ROS の細胞内蓄積を、DNA stress マーカーである 8-ODdG に対する免疫染色で解析したところ、xenograft 特異的に併用により ROS のダメージが観察された。

(図6)H1650-xenograft に対する併用効果

肝実質細胞への影響はなく、腫瘍特異的にダメージが加わったと考えられた。

Co-administration of AZD6244 and MS-275 induces oxidative stress in tumor xenografts.



従って、HDAC 阻害剤+MEK 阻害剤併用療法が極めて有効ながん化学療法となる可能性を見出した。ただし、がん細胞の ERK 活性化レベルや p53 遺伝子型に留意した治療が重要であると考えられ

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 4 件)

- 1, "Blockade of constitutively activated ERK signaling enhances cytotoxicity of microtubule-destabilizing agents in tumor cells." S. Tanimura, A. Uchiyama, K. Watanabe, M. Yasunaga, T. Kawabata, K. Ozaki and M. Kohno. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378: 650-655 (2009)
- 2, "Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway enhances the therapeutic efficacy of microtubule-destabilizing agents in human tumor xenograft models." K. Watanabe, S. Tanimura, A. Uchiyama, T. Sakamoto, T. Kawabata, K. Ozaki, and M. Kohno. *Clin. Cancer Res.* 16: 1170-1178 (2010)
- 3, "Blockade of the ERK or PI3K-Akt pathway enhances the cytotoxicity of histone deacetylase inhibitors in tumor cells

resistant to gefitinib or imatinib.” K.Ozaki, M.Kosugi, N.Baba, T.Sakamoto, K.Fujio, S. Kimura and M.Kohno.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 391:1610-1615 (2010)

4, “Targeting the extracellular signal-regulated kinase pathway in cancer therapy” M. Kohno, S. Tanimura, and K.Ozaki
Biol. Pharm. Bull., 34:1781-1784 (2011)

〔学会発表〕(計 8 件)

- 1, HDAC 阻害剤と MEK 阻害剤の併用による細胞死増強の分子機構
坂元利彰, 尾崎恵一, 馬場伸幸, 藤尾康祐, 梶川修平, 河野通明
第 18 回日本アポトーシス研究会学術集会
2009 年 8 月 (長崎)
- 2, MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用による抗腫瘍効果増強-xenograft での検討
坂元利彰, 藤尾康祐, 梶川修平, 尾崎恵一, 河野通明
第 26 回日本薬学会九州支部大会
2009 年 12 月 (福岡)
- 3, イマチニブ抵抗性 Bcr-Abl 変異(T315I)白血球細胞に対する効果的治療法の開発
馬場伸幸, 尾崎恵一, 河野通明
第 26 回日本薬学会九州支部大会
2009 年 12 月 (福岡)
- 4, がん細胞における ERK 経路活性化と HDAC 阻害剤感受性の相関
梶川修平, 坂元利彰, 藤尾康祐, 尾崎恵一, 河野通明
第 9 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2010 2010 年 9 月 (京都)
- 5, Blockade of the ERK pathway enhances the

therapeutic efficacy of HDAC inhibitors in human tumor xenograft models.

T.Sakamoto, K.Fujio, S.Kajikawa, S.Uesato, K.Watanabe, S. Tanimura, K.Ozaki, M. Kohno.

第 69 回日本癌学会学術総会,
2010 年 10 月 (大阪)

6, HDAC 阻害剤と MEK 阻害剤の併用による細胞死誘導増強 - FOXO 転写因子ファミリーの役割

藤尾康祐, 梶川修平, 坂元利彰, 尾崎恵一, 河野通明

第 27 回日本薬学会九州支部大会
2010 年 12 月 (長崎)

7, HC-toxin and PD184352 synergistically up-regulate Bim and TBP-2 to induce the enhanced ROS accumulation and cell death.
K.Ozaki, K, Fujio, T, Sakamoto, S, Kajikawa, and M, Kohno.

第 70 回 日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 (名古屋)

8, ERK 経路の活性化及び p53 遺伝子型と HDAC 阻害剤感受性の相関

梶川修平, 坂元利彰, 尾崎恵一, 河野通明

第 34 回 日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 (横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 恵一 (OZAKI KEI-ICHI)

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

(2) 研究協力者 (大学院生)

坂元利彰 (博士後期課程)

藤尾康祐 (修士課程)

梶川修平 (修士課程)

