

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 30 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591700

研究課題名（和文）

HSP90 阻害剤とヘパラーゼ核内移行検出システムを応用した新規分子標的治療法

研究課題名（英文）Investigation of novel therapeutic alternative to gastrointestinal cancer using a HSP90 inhibitor

研究代表者

山辻 知樹 (YAMATSUJI TOMOKI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40379730

研究成果の概要（和文）：HSP90 は細胞内分子シャペロンで、正常細胞にも存在するが、悪性腫瘍細胞に多く発現し、癌化にかかわるタンパク質と相互作用することから、悪性腫瘍に対する新規治療のターゲットとして注目されている。我々はこれまでヘパラーゼと HSP90 の相互作用と核内移行についての研究を進めてきたが、新規 HSP90 特異的阻害剤 AU922 を導入し、癌の悪性度と細胞の分化を直接制御する新規治療法を開拓することを目指す。各種消化器培養癌細胞に AU922 を導入して細胞増殖抑制効果と分子生物学的機構の解明を行った。

研究成果の概要（英文）：Heat shock protein 90 (HSP90), a molecular chaperone, has provoked great interest as a promising molecular target for cancer treatment, due to its involvement in regulating the conformation, stability and functions of key oncogenic proteins. The aim of our study was to evaluate the antitumor effects of a novel HSP90 inhibitor, AU922. AU922 potently inhibited the proliferation of cancer cells. We demonstrated that the novel HSP90 inhibitor AU922 exhibits a potent antitumor effect in cancer cells, providing a novel therapeutic alternative for cancer treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
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：消化器外科学

キーワード：HSP90、核内移行、ヘパラーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1)HSP90 とその阻害剤について

HSP90 は主要な細胞内分子シャペロンのひとつであり、細胞ストレス状況の下でその発現量が増大する。HSP90 は正常細胞にも多く存在するが、悪性腫瘍細胞には恒常的に多く発現され、その癌化にかかわる多くのタンパク質と相互作用することが知られている。この

ことから、HSP90 は悪性腫瘍に対する新規治療のターゲットとして注目を集めている。HSP90 の阻害薬として知られているゲルダナマイシンは HSP90 の ATP-binding ポケットに結合してそのシャペロン機能を抑制し、HSP90 依存性のクライアントタンパク質の不活性化・分解を引き起こす。ゲルダナマイシンと同様の HSP90 阻害効果を持つ 17-AAG は、

培養癌細胞の増殖の抑制や、実験動物モデルでの腫瘍縮小を誘導することが報告されている。また、近年技術の発展が目覚ましい分子標的薬として数種類のHSP90特異的阻害剤が開発された。合成開発されたHSP90特異的阻害剤の一つであるAUY922はそのHSP阻害効果の高さとその特異性から、最も臨床応用に近いと考えられている(Bergstrom et al, J Nuc Med 49:1204-1210, 2008)。

(2) HSP90とヘパラーゼの核内移行
 癌の転移・再発の克服は癌治療において最大の課題である。癌が血行性転移するために癌細胞は毛細血管の基底膜を破って血管外へ浸潤する。癌細胞は細胞骨格の主成分ヘパラン硫酸プロテオグリカンを分解する酵素：ヘパラーゼを分泌して基底膜を破壊する。我々はヘパラーゼを発見し、命名した中島元夫との共同研究により、これまで多くの癌組織でヘパラーゼの発現が増強し(Takaoka M, et al. Lab Invest. 83:613-22. 2003)、癌の転移・浸潤という臨床的悪性度に直接関与していること(Okawa T, et al. Clin Cancer Res. ;11:7995-8005. 2005)を発表した。続いてヘパラーゼの細胞質から核内への移行によって癌の悪性度と分化が制御されることを初めて示した(Kobayashi et al. Differentiation 74: 235-243. 2006)。さらにヘパラーゼ核内移行検出システムを用いて、ヘパラーゼの核内移行に細胞内分子シャペロンであるHSP(Heat shock protein)90が直接関与していることを示した。癌の転移・浸潤・分化に関わるヘパラーゼの核内移行と細胞遊走能はHSP90阻害剤であるゲルダナマイシンや17-AAGによって抑制されることを明らかにした。

2. 研究の目的

ヘパラーゼ核内移行システムを、新規HSP90特異的阻害剤AUY922と組み合わせることで、癌の増殖に重要なタンパク質のシャペロンとして知られているHSP90の機能を抑制すると同時に癌の悪性度と細胞の分化を直接制御し得る可能性がある。

本研究は、HSP90特異的阻害剤AUY922の消化器悪性腫瘍に対する効果とその機序を解明し、消化器悪性腫瘍の新規治療剤として臨床応用への道を拓くことを目的とする。癌の浸潤・転移能を生物学的に制御し、既知の化学療法に不応あるいは耐性をもつ悪性腫瘍に対する新しい治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 消化器癌細胞に対するHSP90阻害剤

AUY922の増殖抑制効果の検討：ヒト食道癌培養細胞TE-1, TE-4, TE-8およびTE-10、胃癌細胞NUGC-3, NUGC-3/IL、膵癌細胞

PANC-1, MIAPACA-2およびBxpc3にAUY922を各種濃度で加えて、トリパンプルー染色にて細胞増殖曲線を求める。

- (2) 培養癌細胞の増殖シグナルの検討：食道癌培養細胞TE-1, TE-4, TE-8, TE-10においてどのような増殖シグナルが関与しているか、癌の増殖に関連する各種タンパク質の発現をウェスタンブロット法にて検索した。
- (3) AUY922による増殖抑制効果の分子生物学的機構の解明：AUY922で刺激したTE-1, TE-4, TE-8における各種タンパク質の発現をウェスタンブロット法にて検索し、増殖シグナルに対するAUY922の影響を調べる。
- (4) HSP90とヘパラーゼ核内移行システム：上記食道癌培養細胞において抗HSP90抗体を用いて免疫沈降法を行い、HSP90とヘパラーゼの結合や核内移行へ関与を検索する。

4. 研究成果

- (1) 消化器癌細胞に対するHSP90阻害剤AUY922の増殖抑制効果：

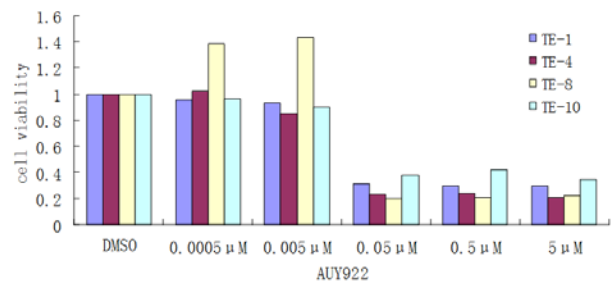


図1 食道癌培養細胞に対するAUY922の増殖抑制効果

ヒト食道癌培養細胞TE-1, TE-4, TE-8およびTE-10にAUY922を各種濃度で加えて、細胞増殖効果を確認した(図1)。細胞増殖抑制効果は細胞株による差異が認められた。

胃癌細胞NUGC-3, NUGC-3/IL(5FU耐性株)に対するAUY922の増殖抑制効果を確認した。既存の化学療法薬5FUの耐性に関わらず、AUY922はNUGC3細胞に対し、同等の増殖抑制効果を示した(図2および3)。

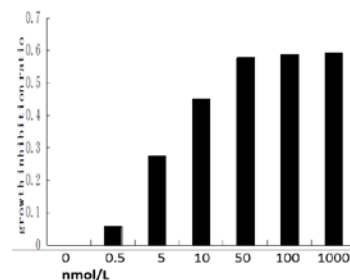


図2 胃癌細胞 NUGC3に対するAUY922の増殖抑制効果

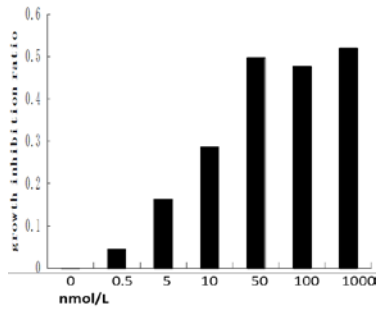


図3 5FU耐性胃癌細胞NUGC3 ILに対するAUY922の増殖抑制効果

膵癌細胞PANC-1、MIAPACA-2およびBxpc3にAUY922を各種濃度で加えて、AUY922の増殖抑制効果を確認した(図4)。3種類の膵癌培養細胞のうち、PANC-1、とMIAPACA-2に対する増殖抑制効果を確認した。一方Bxpc3に対する増殖抑制効果は弱く、AUY922に対して耐性であると考えられた。

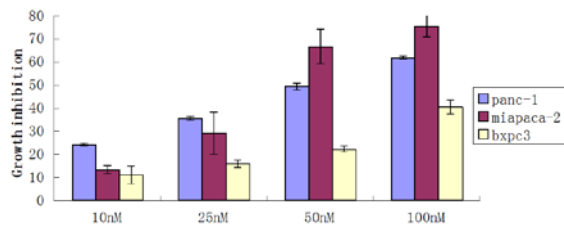


図4 膵癌培養細胞に対するAUY922の増殖抑制効果

(2) 癌培養細胞の増殖シグナルの検討
TE-1, TE-4, TE-8, TE-10においてどのような増殖シグナルが関与しているか、各種タンパク質の発現を検索した。Akt及びリン酸化Akt抗体を用いて増殖シグナルに対する影響を調べたところ、TE-1およびTE-8でリン酸化Aktの抑制を認められた(図5)。また、TE-4においてPTENの発現低下が認められた(図6)。図1で示されたAUY922に対する感受性の差がPTENの発現によって制御されている可能性が示唆された。

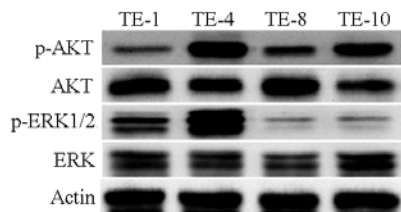


図5 食道癌細胞におけるAktおよびERKの発現

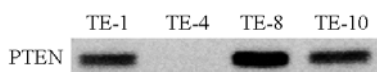


図6 食道癌細胞におけるPTENの発現

(3) AUY922による増殖抑制効果の分子生物学的機構の解明：AUY922で刺激したTE-4, TE-10における各種タンパク質の発現を検索した。TE-4においては、AUY922の刺激によってリン酸化Aktの明らかな抑制が認められた(図7)。AUY922による増殖抑制効果にPTEN/Aktシグナルが関与している可能性が示唆された。

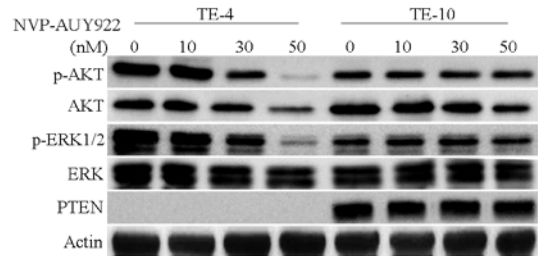


図7 HSP90阻害剤AUY922が食道癌細胞の増殖シグナルに与える影響

- (4) 抗HSP90抗体にてHSP90の発現を確認したが、いずれの刺激時間においても発現量に変化を認めなかった。
- (5) HSP90とヘパラーゼ核内移行：上記培養細胞において抗HSP90抗体を用いて免疫沈降法を行ったところ、HSP90とヘパラーゼが複合体を形成しており、HSP90とヘパラーゼの核内移行の強い関係が示された。
- (6) 癌転動物モデルにおけるHSP90阻害剤の抗腫瘍効果の検討：ヌードマウスを用いた癌腹膜播種転移モデルに対して、AUY922の抗腫瘍効果を検討する基礎実験を行っている。抗腫瘍効果の検討を通じて得られたHSP90阻害剤の適正用量・投与時間の設定を行う。
- (7) 消化器癌培養細胞を用いて行った上記(1)～(6)の研究成果をまとめて日本消化器外科学会総会および米国癌学会にて発表した。また、食道癌培養細胞を用いて行った上記(1)～(6)の研究成果をもとに、AUY922による癌細胞増殖抑制効果の分子生物学的機構についての論文執筆を行い、癌の細胞生物学を専門とする欧文誌に投稿し、査読の結果、受理された。

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2件)

- ① Xiao-hong Bao, Munenori Takaoka, Hui-fang Hao1, Takuya Fukazawa, Tomoki Yamatsuji, Kazufumi Sakurama1, Nagio

Takigawa, Motowo Nakajima, Toshiyoshi Fujiwara, Yoshio Naomoto, Antiproliferative effect of HSP90 inhibitor NVP-AUY922 is determined by the expression of PTEN in esophageal cancer. Oncology Report 査読有 2012 in press 掲載決定

- ② Okui T, Shimo T, Hassan NM, Fukazawa T, Kurio N, Takaoka M, Naomoto Y, Sasaki Antitumor effect of novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 against oral squamous cell carcinoma, Anticancer Res 査読有 Vol131, 2011, 1197-1204

[学会発表] (計 3件)

- ① 高岡宗徳、山田貴子、木下真一郎、林 次郎、深澤拓也、繁光 薫、山辻知樹、吉田和弘、森田一郎、猶本良夫. HSP90 阻害剤 NVP-AUY922 による食道癌にたいする抗腫瘍効果は PTEN の発現により変化する 第 66 回日本食道学会学術集会 2012 年 6 月 22 日 於長野県軽井沢
- ② Munenori Takaoka, Xiaohong Bao, Huifang Hao, Takuya Fukazawa, Tomoki Yamatsuji, Yasuko Tomono, Kazufumi Sakurama and Yoshio Naomoto. HSP90 inhibitor NVP-AUY922 exhibits the potent antiproliferative effect in gastrointestinal cancer cells with a lack of PTEN expression. AACR Annual Meeting 2012. 2012 年 4 月 2 日 於米国シカゴ
- ③ 高岡宗徳、Hao Huifang、Bao Xiaohong、山辻知樹、深澤拓也、友野靖子、木下真一郎、林次郎、繁光薫、吉田和弘、森田一郎、猶本良夫. 消化器悪性腫瘍に対する新規治療戦略としての heat-shock protein 90 阻害剤の可能性. 第 66 回消化器外科学会総会 2011 年 7 月 於名古屋

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山辻知樹 (YAMATSUJI TOMOKI)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40379730

(2) 研究分担者

猶本良夫 (NAOMOTO YOOSHIO)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：00237190

深澤 拓也 (FUKAZAWA TAKUYA)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：20379845

(3) 連携研究者