

機関番号 : 32607  
 研究種目 : 若手研究 (B)  
 研究期間 : 2009~2010  
 課題番号 : 21791409  
 研究課題名 (和文) 多剤耐性ユーイング肉腫細胞に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の効果  
 研究課題名 (英文) The antitumor effect of histone deacetylase inhibitor against multidrug-resistant Ewing's sarcoma cells  
 研究代表者  
 岡田 貴充 (OKADA TAKAMITSU)  
 北里大学・医学部・講師  
 研究者番号 : 70525550

## 研究成果の概要 (和文) :

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 SAHA は apoptosis 抵抗性を示す多剤耐性 Ewing 肉腫細胞株に対して autophagic cell death といわれる apoptosis とは異なる programmed cell death を誘導し抗腫瘍効果を発揮していることが判明した。

また、SAHA は多剤耐性 Ewing 肉腫のマウスモデルにおいても、副作用なく抗腫瘍効果を発揮できることも判明した。

## 研究成果の概要 (英文) :

We showed that histone deacetylase inhibitor SAHA induced apoptosis against parental drug-sensitive Ewing's sarcoma cells, however induced autophagic cell death against multidrug-resistant cells which was resistant to the apoptotic signals.

Furthermore, we showed that SAHA exhibited the antitumor effect against the animal model of multidrug-resistant Ewing's sarcoma.

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 外科系臨床医学・整形外科学

キーワード : 多剤耐性因子, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤, オートファジー, ユーイング肉腫, アポトーシス抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫、Ewing 肉腫は若年者の骨・軟部組

織に発生する腫瘍であり、小児がんのおよそ 3%を占める再発・遠隔転移傾向の強い、悪

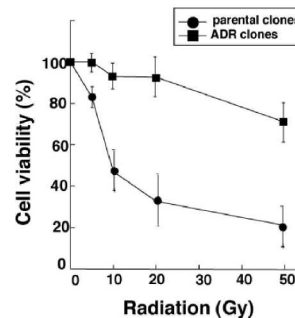
性度の高い腫瘍である。様々な治療法の進歩により、5年生存率がいずれも約60%に改善したが、再発例の5年生存率は20%前後と依然として著しく不良であり、新たな治療法の開発が必要である。再発例に対する治療では、外科療法に加え、セカンドラインケモセラピーを追加しても予後は改善できないとの報告があり、再発した腫瘍は既存の抗癌剤に対して耐性を獲得していることが考えられる。骨肉腫、Ewing肉腫に対する抗癌剤として、Doxorubicinは全てのレジメに含まれるkey drugであるが、DoxorubicinはP-glycoprotein(P-gp)、MRP1といわれる多剤耐性因子の一つであるEfflux pumpの基質となるため、骨肉腫・Ewing肉腫の多剤耐性機序にはP-gp、MRP1が関与していることが示唆される。Ewing肉腫では11番染色体と22番染色体の間で染色体相互転座が認められ、その結果、EWS-Flil1融合遺伝子が形成され、これが異常な転写因子として機能し、細胞周期抑制因子であるp21<sup>cip1</sup>およびp27<sup>kip1</sup>の発現を抑制することを見いだしてきた(Tanaka et al. J Clin Invest. 1997, Matsumoto et al. Br J Cancer 2001, Nakatani et al. J Biol Chem. 2003, Matsunobu et al. Clin Cancer Res. 2004)。

このEWS-Flil1により発現抑制されるp21<sup>cip1</sup>を標的とした最近開発された分子標的治療薬として、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬(HDACIs)がある。HDACIsは新規抗癌剤として近年特に有望視されており、我々はその一つであるFK228がEwing肉腫に対して有効であることを報告した(Sakimura et al. Int J Cancer 2005)。そこで私はP-gp、MRP1の発現を示す多剤耐性骨肉腫・Ewing肉腫細胞株を樹立し、これらへのFK228の抗腫瘍効果を調べたが、HDACIsの中でもFK228が属すCyclic-tetrapeptide群はP-gp、MRP1の基質となり、これらを発現する腫瘍に対しては交叉耐性を示すことが明らかになったため(Okada et al. Int J Cancer 2005)、これらに有効なHDACIsの存在を調査することが必要となった。HDACIsのなかで他のcategoryに属すsuberoylanilide hydroxamic acid(SAHA)がこれら多剤耐性骨肉腫・Ewing肉腫細胞に抗腫瘍効果を示すこと明らかにできた。

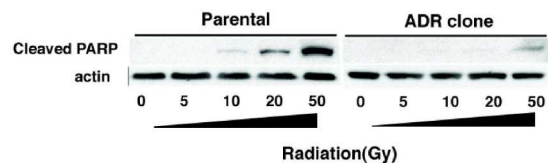
直近のこの研究においてSAHAの抗腫瘍メカニズムを解析したが注目すべき事を明ら

かにした。我々が樹立した多剤耐性骨肉腫細胞であるMNNG/ADRはEfflux pumpであるP-gp、MRP1を発現することにより様々な薬剤に対して耐性を示しているが、このMNNG/ADRはX線に対しても強い耐性があり、X線による

A.



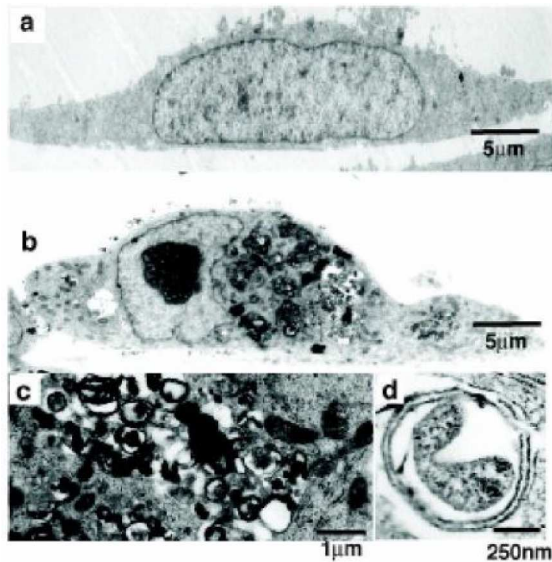
B.



apoptosis誘導に抵抗性を示している細胞株であることが明らかになった。

しかしSAHAはこのapoptosis抵抗性を示すMNNG/ADRに対して親株MNNG/Sと全く同じ濃度で抗腫瘍効果を示すことが確認できたため、MNNG/ADRに対してはapoptosisと異なるpathwayを利用して抗腫瘍効果を発揮しているのではとの仮説をたてた。その一つの中で最近特に注目されているものとしてautophagic cell deathという現象がある。もともとautophagyという現象はユビキチン・プロテアソーム系と並ぶ二大細胞内蛋白分解系の一つで細胞内のオルガネラ等の器官をまるごとautophagosomeといわれるvesicleでつつみこみ分解してしまう現象である。Autophagic cell deathはこのautophagyを利用した細胞死でprogrammed cell death type 2に分類され、特に注目されていた。今まで使用されている抗腫瘍治療は、抗腫瘍薬、X線などを含め主にapoptosisを介して抗腫瘍効果を発揮しているため、これらの治療に抵抗性を示すもの、またこれらの治療を施行した後に再発したものはapoptosisに対して抵抗性を示している可能性が高い。従って既存のapoptosisとは異なるautophagyという現象を介して抗腫瘍効果

を發揮できる薬剤は現存の治療で無効とさ



れている症例に対して画期的なものとなりうる可能性がある。この様に画期的な抗腫瘍薬となりうる SAHA を早急に臨床応用する必要があった。

そこで今回の研究目的は、「多剤耐性 Ewing 肉腫のマウスモデルを作成し vivo での抗腫瘍効果を確認すること」であった。

## 2. 研究の目的

多剤耐性 Ewing 肉腫のマウスモデルを作成し vivo での抗腫瘍効果を確認し、SAHA の抗腫瘍効果のメカニズムを明らかにすること

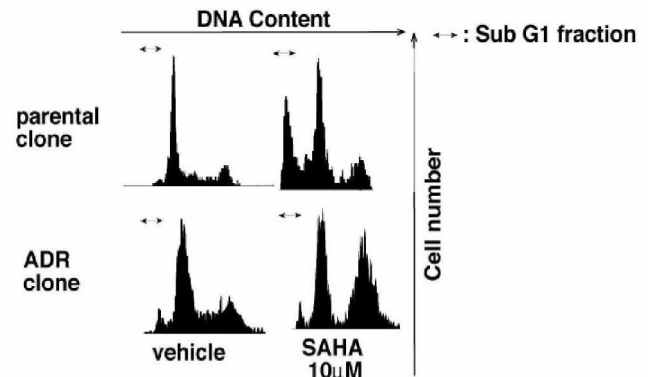
## 3. 研究の方法

SAHA を薬剤感受性株と多剤耐性株の双方に投与し抗腫瘍効果を検討した。Flowcytometry を施行し、SAHA 投与後の細胞分画を測定した。また SAHA 投与後の apoptosis signal と autophagy 関連タンパクの Western blot を施行し apoptosis と autophagic cell death の誘導を確認した。Ewing 肉腫細胞株に doxorubicin を投与しながら培養し新たな多剤耐性 Ewing 肉腫細胞株を樹立した。それらを Nu/Nu マウスに xenograft し生着したところで SAHA を腹腔内に投与し抗腫瘍効果を検討した。

## 4. 研究成果

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 SAHA の多剤耐性 Ewing 肉腫細胞株に対する抗腫瘍効果を検討した。多剤耐性 Ewing 肉腫細胞に対し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 SAHA の抗

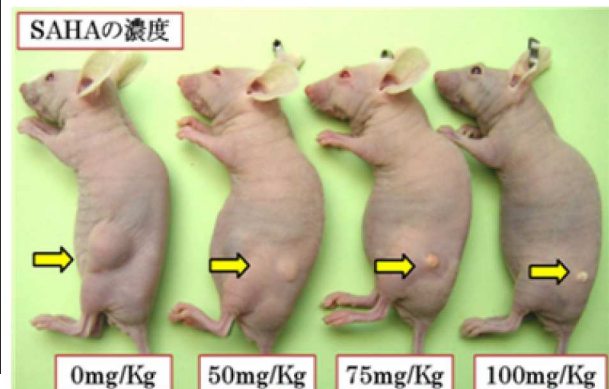
腫瘍効果を検討したところ、SAHA は薬剤感受性株と同様に多剤耐性株においても抗腫瘍効果を發揮した。Flowcytometry を施行したところ、SAHA は薬剤感受性株においては Sub-G1 fraction を増加させたのに対し、多剤耐性株においては G2/M fraction を増加させた。



〔SAHA は薬剤感受性株では Sub-G1 fraction を増加させるが、多剤耐性株では G2/M を増加させる。〕

Western blotting の結果から SAHA は薬剤感受性株においては apoptosis を誘導するのに対し多剤耐性株においては autophagy を誘導する事が判明した。

Ewing 肉腫細胞株 WE-68、VH-64 においては以前に多剤耐性株を樹立していたが、今回新たに SKNMC と RDES の 2 細胞株に対しても多剤耐性株の樹立を試みたところ SKNMC 細胞から多剤耐性株を樹立することができた。これら 3 多剤耐性細胞株を Nu/Nu マウスの背部に xenograft して生着の有無を確認したところ、WE-68/ADR、VH-64/ADR はマウスに生着できたが、SKNMC/ADR は生着させることができなかった。従ってマウス多剤耐性 Ewing 肉腫モデ



ルとして WE-68/ADR, VH-64/ADR の xenograft モデルを使用することとした。WE-68, VH-64 の多剤耐性株を  $1.0 \times 10^6$  の細胞を preparation して Nu/Nu マウスに xenograft する。つづいて 0, 50, 75, 100mg/Kg の濃度の SAHA を腹腔内投与し抗腫瘍効果を検討したところ、SAHA の濃度依存性にマウスの腫瘍サイズは縮小した(論文投稿中データ) 50mg/Kg 投与群で生存腫瘍細胞は認められず、この濃度ではマウスに体重減少などの副作用は生じなかった。

以上のことから SAHA が vivo モデルにおいても多剤耐性 Ewing 肉腫に対して良好な抗腫瘍効果を示すことが確認することができた。

## 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]

なし

[学会発表]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田 貴充 (OKADA TAKAMITSU)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：70525550