

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591425

研究課題名(和文) 乳癌に対するHDAC阻害剤を用いた治療の開発に向けた基礎・臨床研究

研究課題名(英文) Basic and clinical research toward the development of treatment with HDAC inhibitors for breast cancer

研究代表者

井口 雅史 (Inokuchi, Masafumi)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：90401918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：今回申請者は、抗癲癇薬であるバルプロ酸ナトリウム(VPA)がヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害作用を有することに注目し、VPAを用いた乳癌の新しい治療法の開発を目指した研究を行った。様々な乳癌細胞株に対し、有効血中濃度と同等の濃度(1mM)にて増殖抑制を示すことを明らかにし、その機序は、ヒストンアセチル化による直接の分化、アポトーシス誘導の他、非ヒストン蛋白であるHSP70のアセチル化を介したHER2などのクライアトプロテインの抑制も関与している可能性があることを証明した。この研究により今後、乳癌におけるVPAと標準治療との併用は、癌の増殖抑制の観点から有用となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We focused on valproic acid (VPA), an anticonvulsant drug, which has been reported as histone deacetylase (HDAC) inhibitor, and researched for the new therapeutic development of breast cancer using VPA. We confirmed VPA suppressed the proliferation of breast cancer cell lines in each subtypes in the concentrations equivalent to those used for the clinical treatment in concentration-dependent to varying degrees. We also confirmed VPA induced breast cancer cells to differentiation and apoptosis. We showed the anti-proliferative mechanism of VPA might be associated with not only the direct function of acetylation of histone, through cell cycle arrest or apoptosis, but also indirect function that that acetylation of HSP70 disrupted the function of HSP90 and led to down-regulation of its client proteins such as HER2. This study suggests combination of standard treatment for breast cancer and VPA can be useful in terms of proliferative suppression of cancer in the future.

研究分野：外科学

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：乳腺外科学 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 最近のエピジェネティクス医学の中でヒストン脱アセチル化酵素(HDAC) 阻害剤を用いた癌治療薬の開発が注目されている。HDAC 阻害剤はヒストンや転写因子や機能因子のアセチル化を行うことにより、細胞の分化・アポトーシスの誘導や増殖・血管新生抑制などを介して抗腫瘍効果を発揮する。HDAC 阻害剤により HDAC6(class B HDACs)が阻害されると、Heat Shock Protein 90(HSP90)のアセチル化を介してシャペロン機能が抑制され、その結果 HSP90 のクライアントプロテインであるヒト上皮細胞成長因子受容体 (HER2),Akt,Raf1, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1 alpha), mutant p53, サバイピン, cyclin dependent kinase 4(CDK4), MET, MMP-2, テロメラーゼ, ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT) (これらの蛋白はいずれも癌細胞の増殖や浸潤・転移に深く関与する重要な分子である)蛋白がユビキチン非依存的なプロテアソーム分解を受けて減少することが知られている。特に乳癌治療においては HDAC 阻害剤によるエストロゲン受容体(ER) 蛋白の発現低下はエストロゲン依存性の増殖シグナルを抑制し、さらに癌増殖因子である HER2 発現低下は癌細胞増殖を抑制する可能性がある。また、Akt シグナルを抑制し、サバイピン蛋白の発現を減少させることから、抗癌剤の効果を増強させる作用がある。中でも HDAC 阻害剤を先行投与させることで、トポイソメラーゼ 阻害剤であるドキソルビシン やエピルビシンの抗腫瘍効果を増強させることが注目されている。

(2) HDAC 阻害剤は - チュブリン のアセチル化によって細胞微小管の安定性をはかり、

G2-M 期停止 を惹き起こし、タキサン系抗癌剤の効果を増強させる。そこで乳癌の浸潤・増殖や薬剤耐性の機序について解明し、現状の薬剤にて現在の標準治療の治療効果を最大限に引き出す治療法を確立することが重要であると考えられる。

(3)新しいHDAC 阻害剤が現在も開発中であるが、最近、既に市販されている抗てんかん薬であるバルプロ酸ナトリウム(VPA) にも HDAC 阻害作用があることが明らかになってきた。

そこで、今回申請者は、以下の研究を計画した。

2. 研究の目的

(1) HDAC 阻害作用を有する抗てんかん薬であるバルプロ酸ナトリウム(VPA)を用いて、転移再発乳癌治療における転移・浸潤、薬剤耐性の分子メカニズムを解明し、新しい治療法の開発のに向けた基礎ならびに臨床研究を行う。バルプロ酸ナトリウムの作用機序を解明することにより、乳癌の新しい治療法の開発に貢献する。

3. 研究の方法

(1) 基礎研究の対象と方法

ER, HER2 発現の異なる 4 種類の乳癌細胞株(MCF-7, SKBR-3, MDA-MB-231, BT-474)を用いて VPA による増殖抑制作用を検討し、さらに HER2 陽性株において、HDAC 阻害作用、分化誘導、アポトーシス誘導作用を検討した。VPA の非ヒストン蛋白の脱アセチル化阻害作用として HSP90、HSP70、チュブリンに着目し増殖抑制機序に

についても検討した。

(2) 臨床研究の対象と方法

臨床試験による乳癌治療における VPA 安全性と有効性の検討するために「(臨床試験 1) 転移・再発乳癌に対するパクリタキセル + valproic acid の臨床試験」と「(臨床試験 2) 転移・再発乳癌に対するアルブミン結合パクリタキセル + valproic acid の臨床試験」パルブ口酸ナトリウムによって、パクリタキセルによる末梢神経障害の予防効果や安全性を確認し、抗腫瘍効果も検討した。

4. 研究成果

(1) 基礎研究の成果

VPA は 4 種類の乳癌細胞株すべてに対し、細胞株により強弱はあるが、濃度・時間依存性に増殖抑制作用を示した。HER2 陽性株である SKBR-3、BT-474 においてより増殖抑制効果を示した(図 1)。SKBR-3 において、ヒストン H3 のアセチル化を確認し、VPA の乳癌細胞における、HDAC 阻害作用を確認した。SKBR-3、BT-474 において、p21WAF-1 および cleaved caspase 3 の発現の増加を確認し、VPA によって、乳癌細胞が分化およびアポトーシスへ誘導されることを確認した。

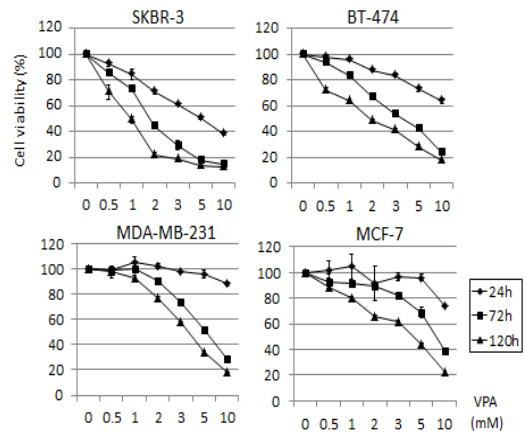


図1: VPAの乳癌細胞の増殖抑制効果

VPA を SKBR3 細胞に投与することによって、HSP90 のアセチル化は確認できなかった。 チュブリンはアセチル化されたが、長時間を要し、VPA では、HSP90 をアセチル化する HDAC6 阻害が弱いことを示していた。 VPA を SKBR3 細胞に投与することによって、HSP70 のアセチル化は確認することができた(図 2)。

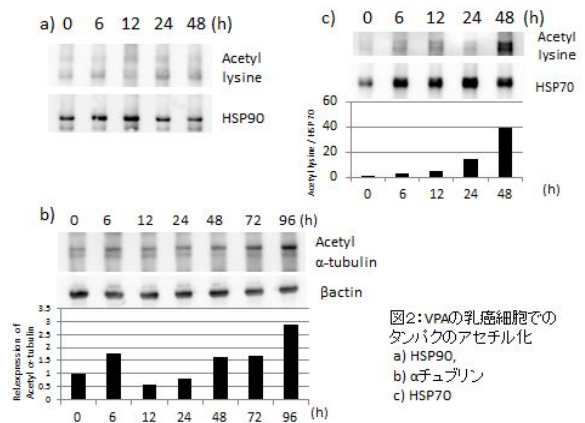


図2: VPAの乳癌細胞でのタンパクのアセチル化
a) HSP90,
b) α チュブリン
c) HSP70

(考察) VPA が乳癌細胞に対して、臨床用量での血中濃度と同程度のオーダーで、HDAC 阻害薬として作用し、分化・アポトーシスへ誘導することが確認された。HER2 陽性株において強い増殖抑制効果を示した。これまでの報告では、エストロゲン受容体の発現の有無に注目したものが多く、多くは HER2 陰性株での実験であった。HER2 陽性株において、HER2 もクライアントプロテインとする

分子シャペロンの HSP90 を、VPA が非ヒストンタンパクの脱アセチル化阻害作用にてアセチル化することで機能阻害しないか検討した。しかし、VPA の HDAC6 阻害活性が低く、HSP90 のアセチル化は確認できなかった。一方、VPA 1mM という低い濃度で、短い作用時間で、HSP70 の著明なアセチル化が確認された。HSP90 は HSP70 など複数の蛋白と複合体を形成しシャペロン機能を発揮するため、VPA は HSP70 のアセチル化を介して、間接的に HSP90 の機能を阻害している可能性が考えられた。その結果、HER2 タンパクなど増殖シグナルの抑制がおり、乳癌細胞の増殖を抑制している可能性がある。

(結語) VPA の乳癌細胞に対する増殖抑制効果は、HDAC 阻害による直接の分化、アポトーシス誘導のほか、HSP70 のアセチル化を介する間接的な HSP90 機能阻害にて、HER2 などのクライアントプロテインを抑制することによる機序が考えられた。この研究から、乳癌患者における、VPA と標準治療との併用は、癌の増殖抑制の観点から、将来有用となる可能性があると考えられた。

(2) 臨床研究の成果

症例集積を行い、臨床試験 1 では 2 症例、臨床試験 2 では 2 症例の登録がなされた。いずれの症例においても、VPA に起因すると思われる有害事象は認められなかった。タキサン系抗癌剤と VPA の併用による治療の奏効率は 50%であったが、研究のプライマリエンドポイント

である末梢神経障害が登録症例の全例に出現(発生率 100%)してしまい、タキサン系抗癌剤と VPA の併用によって末梢神経障害 80%を 60%まで低下させるという研究仮説を導くことは難しいと判断した。日常臨床として既に使用されている薬剤であるため、VPA の安全性は確認されたが、有効性の面から倫理的にこれ以上症例の集積は難しいと判断し、臨床試験での検討は中断とした。中断となった原因としては、臨床試験において規定したバルプロ酸ナトリウムの内服量(400mg/日)が少なかった可能性がある。基礎実験ではバルプロ酸ナトリウムは低用量で十分な効果を認めたが、実臨床では臨床的に効果を示すだけの血中濃度まで上げられなかった可能性が考えられた。

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)

[学会発表] (計 1 件)

馬渡俊樹、井口雅史、二宮 致、高村博之、北川裕久、伏田幸夫、藤村 隆、太田哲生、バルプロ酸ナトリウムの HDAC 阻害剤としての乳癌細胞抑制機序の検討、第 51 回日本癌治療学会学術総会、2013 年 10 月 24 ~ 26 日、国立京都国際会館 (京都)

6 . 研究組織

(1) (1) 研究代表者

井口 雅史 (INOKUCHI Masafumi)
金沢大学・大学病院・助教
研究者番号 : 90401918

(2) 研究分担者

太田 哲生 (OHTA Tetsuo)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号 : 40194170