

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 5月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791076

研究課題名（和文） ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の獲得耐性のメカニズムの解明
—その克服に向けて

研究課題名（英文） Acquired resistance to HDAC inhibitors

研究代表者

藤井 一恭 (FUJII KAZUYASU)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：70452571

研究成果の概要（和文）：

ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤は皮膚T細胞リンパ腫の新規治療薬であるが、獲得耐性の出現が問題になっている。我々はバルプロ酸に対して獲得耐性を獲得した細胞亜株を5株樹立した。これらの細胞株はIC50値が親株と比べて2倍以上高く、他のHDAC阻害剤であるボリノスタットに対しても同じく耐性を獲得していた。いずれの細胞株もHDAC阻害剤によるアポトーシス誘導が阻害されていた。

研究成果の概要（英文）：

Histone deacetylase (HDAC) inhibitors are new class drug for cutaneous T cell lymphoma. However, the majority of patients will eventually develop resistance. To clarify the mechanisms of acquired resistance to HDAC inhibitor, we established the acquired resistant cell lines against valproic acid, from 5 individual cell lines. IC50 values of these sublines were more than 2-fold resistant to not only valproic acid but vorinostat, compared to their parent cell lines. HDAC inhibitor-induced apoptosis were diminished in all 5 sub-lined compared to their own counterpart.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：皮膚腫瘍学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：HDAC阻害剤、獲得耐性

1. 研究開始当初の背景

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は新たな悪性腫瘍治療のターゲットとして注目され、様々な観点から研究がおこなわれている。現在欧米では他の悪性腫瘍に先駆けて皮膚T細胞リンパ腫の治療薬としてHDAC阻害剤が使用され、本邦でも2011年にボリノスタットが皮膚T細胞リンパ腫に対する治療薬として認可されている。

これまでの海外からの使用経験の報告では前治療や病期を問わず、80%強の症例で治療効果が認められ、30%強の症例では部分寛解している。しかしその一方で効果が永続することはまれで、多くの症例ではHDAC阻害剤に対する耐性を獲得し、最終的には病勢が進行することが多い。しかしそのメカニズムに関しては明らかになっていない。

2. 研究の目的

HDAC阻害剤に対する獲得耐性のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HDAC阻害剤に対する獲得耐性亜株の樹立

バルプロ酸を低用量から負荷することにより、HDAC阻害剤に獲得耐性を有する細胞株を樹立した。獲得耐性が樹立できたかの確認にはXTT法によりバルプロ酸に対するIC50がどのように変化したかで検証を行った。さらに他のHDAC阻害剤であるボリノスタットに対する獲得耐性についても同様の手法で確認を行った。

(2) HDAC阻害剤に対する獲得耐性の機序の解析

フロサイトメトリー方を用いて細胞周期やアポトーシスの解析を行った。さらにその分

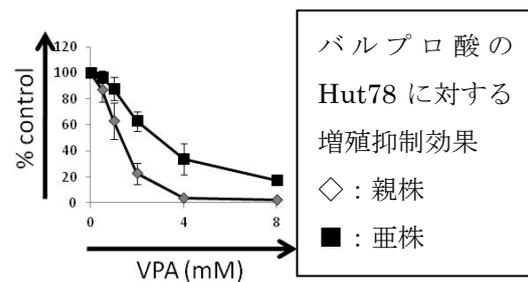
子的背景に関してマイクロアレイを用いて網羅的解析を行った。

4. 研究成果

(1) HDAC阻害剤に対する獲得耐性亜株の樹立

5株の細胞株に対し、IC50よりも低い濃度のバルプロ酸の暴露を行い、徐々に濃度を上げて行った。最終的に1mMのバルプロ酸の刺激下でも増殖する亜株を樹立できた。この濃度は親株の72時間におけるIC50の濃度よりも高い濃度である。

樹立した亜株についてIC50を測定したところ、各々の親株と比べて2倍以上の濃度であった。



バルプロ酸に対するIC50 (mM) : 48h

細胞株	親株	亜株
Hut78	1.2	2.6
HH	1.0	2.1
Jurkat	1.1	3.7
Molt3	0.8	1.7
Molt4	1.3	4.0

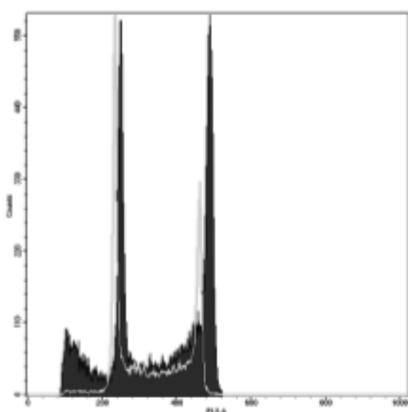
また他のHDAC阻害剤であるボリノスタットに対しても同様の耐性を獲得していた。

ボリノスタットに対するIC50 (nM) : 48h

細胞株	親株	亜株
Hut78	1.2	2.6

HH	1.0	2.1
Jurkat	1.1	3.7
Molt3	0.8	1.7
Molt4	1.3	4.0

(2) HDAC阻害剤に対する獲得耐性の機序の解析



バルプロ酸のJurkatに対するアポトーシス誘導効果(1mM)。□：親株、■：亜株
親株ではアポトーシスが誘導されているが、亜株ではほとんどアポトーシスが誘導されていない (sub G1:親株9%、亜株3%)。

他の細胞においても同様の傾向を認めた。

その分子的な背景について、どのような分子メカニズムが存在するか検討するために、マイクロアレイを用いて網羅的な解析を行ったが、全てに共通して変化を認める分子は認めなかった。

HDAC阻害剤は他の分子標的薬と異なり、極めて多数の作用点を有すること、さらにHDAC阻害剤は遺伝子の発現だけでなく、多数のタンパク質の翻訳後修飾に関わっていることを反映していると考えた。今後はプロテオームの手法を用いて、タンパク質レベルで共通して変化のある分子がないか検討を行う予定である。

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)

[雑誌論文] (計10件)

① Hirai Y, Yamamoto T, Kimura H, Ito Y, Tsuji K, Miyake T, Morizane S, Suzuki D, Fujii K, Iwatsuki K. Hydroa vacciniforme is associated with increased numbers of Epstein-Barr virus-infected $\gamma \delta$ T-cells. J Invest Dermatol, in press. 査読あり

② Fujii K, Suzuki N, Ikeda K, Hamada T, Yamamoto T, Kondo T, Iwatsuki K. Proteomic study identified HSP 70 kDa protein 1A as a possible therapeutic target, in combination with histone deacetylase inhibitors, for lymphoid neoplasms. J Proteomics. 2012 Feb 2;75(4):1401-10. 査読あり

③ Karpova MB, Fujii K, Jenni D, Dummer R, Urosevic-Maiwald M. Evaluation of lymphangiogenic markers in Sézary Syndrome. Leuk Lymphoma. 2011 Mar;52(3):491-501. 査読あり

④ Suzuki D, Tsuji K, Yamamoto T, Fujii K, Iwatsuki K. Production of proinflammatory cytokines without invocation of cytotoxic effects by an Epstein-Barr virus-infected natural killer cell line established from a patient with hypersensitivity to mosquito bites. Exp Hematol. 2010 Oct;38(10):933-44. 査読あり

[学会発表] (計43件)

① Fujii K, Comparative proteomic analysis identified HSPA1A as a candidate target for enhancing apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor, The 36th Annual

Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011.12.9-12.11, Kyoto

②Tada K, Distinct distribution of dendritic cell subsets in the lymph nodes in patients with mycosis fungoides, The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011.12.9-12.11, Kyoto

③藤井一恭、蛍光標識二次元電気泳動を用いたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の感受性に関わる分子の探索、第6回中国研究皮膚科セミナー、2011.11.13, 広島市

④藤井一恭、蛍光標識二次元電気泳動を用いたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の併用療法の新規標的の同定、第62回日本電気泳動学会総会、2011.11.12-11.13, 横浜市

⑤藤井一恭、プロテオミクスによるHDAC阻害剤の感受性にかかわる分子の探索、第70回日本癌学会総会、2011.10.3-10.5, 名古屋

⑥Fujii K, HSPA1A inhibits the cytotoxic effect of HDAC inhibitor, 41st Annual ESDR Meeting, 2011.9.7-9.10, Barcelona, Spain

⑦Fujii K, Proteomic analysis of histone deacetylase inhibitor sensitivity in lymphoid malignancies, HUP02011 10th World congress, 2011.9.4-9.7, Geneva, Swiss

⑧藤井一恭、HSPA1AはHDAC阻害剤感受性を阻害する、日本プロテオーム学会2011年大会、2011.7.28-29, 新潟市

⑨Ikeda K, Minimal hematological alterations of circulating T-cells in mycosis fungoides. 22nd World Congress of Dermatology, 2011.5.24-29, Seoul, Korea

⑩藤井一恭、蛍光標識二次元電気泳動を用いたリンパ腫細胞株のHDAC阻害剤感受性分子の探索、第110回日本皮膚科学会総会、2011.4.15-17, 横浜市

⑪Fujii K, Molecular mechanisms of HDAC inhibitor-resistance in lymphoid malignancies determined by proteomic analysis, 5TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphomas, 2011.1.15-17, Berlin, Germany

⑫Fujii K, Establishment of acquired resistance to HDAC inhibitors, The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2010.12.3-12.4, Wakayama

⑬藤井一恭、バルプロ酸はG1期において細胞周期を止めることによりEBウイルス感染NK細胞の増殖を抑制する、第69回日本癌学会学術総会、2010.9.22-24, 大阪市

⑭Fujii K, Proteomics identified biomarker candidates to predict the effects of histone decetylase inhibitors on lymphoid neoplasm cell lines, 40th Annual ESDR meeting, 2010.9.8-11, Helsinki, Finland

⑮藤井一恭、2D-DIGEを用いたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の感受性に関わる分子の探索、日本ヒトプロテオーム機構第8回大会（日本プロテオーム学会2010年会）、2010.7.26-27, 浦安市

⑯藤井一恭、癌研究におけるプロテオミクス解析の応用、第4回病態制御シンポジウム、2010.6.5, 岡山市

〔図書〕（計3件）

①藤井一恭、他、中山書店、ウイルス性皮膚疾患ハンドブック、2011、pp.127-133

②藤井一恭、他、金原出版、皮膚悪性腫瘍取扱い規約第2版、2010、pp.145-150

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 一恭 (FUJII KAZUYASU)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：70452571

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者