

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591636

研究課題名(和文)皮膚リンパ腫に対するエピジェネティクスを基盤とした併用療法の効果と作用機序の解析

研究課題名(英文)Anti-tumor effect and mechanism of combination of retinoid and histone deacetylase inhibitor against cutaneous T cell lymphoma cell

研究代表者

坪井 良治 (TSUBOI, RYOJI)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：70221421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト皮膚Tリンパ腫細胞(SeAx)株を用いて、histone deacetylase inhibitor (HDACi)であるMS-275(entinostat)とレチノイド(Am80)の抗腫瘍効果を、RAR 2の発現回復の観点から検討した。in vitroの増殖実験では併用投与群において相加的な抗腫瘍効果が認められ、さらにSCIDマウスの皮下増殖実験では、併用群で有意に腫瘍塊の増殖抑制効果が認められた。ChIPアッセイにより癌抑制因子でもあるRAR 2の回復がRAR 2のプロモーター領域のヒストンH4のアセチル化によることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Anti-tumor effect of combination of retinoid (Am80) and histone deacetylase inhibitor MS-275(entinostat) in a cutaneous T cell lymphoma cell line (SeAx) was examined from the point of restoration of tumor suppressor gene retinoic acid receptor (RAR) 2 via histone acetylation. RAR 2 gene expression was restored only by the combination rather than by either of the agents singly. The combination treatment significantly inhibited cell growth in vitro, suppressed subcutaneously transplanted tumor growth, and prolonged survival of tumor-bearing mice in vivo. In the combination treatment, the histone H4 acetylation level in the promoter region increased after restoration of RAR 2 expression.

(Kato Y, Egusa C, Maeda T, Tsuboi R: Anti-tumor effect of combination of retinoid and histone deacetylase inhibitor in cutaneous T cell lymphoma cell is due to restoration of tumor suppressor gene retinoic acid receptor 2 via histone acetylation (Submitted).

研究分野：皮膚科学

キーワード：HDAC inhibitor MS-275 Entinostat レチノイド Am80 抗腫瘍効果

## 1. 研究開始当初の背景

代表的な皮膚 T 細胞リンパ腫(以下 CTCL)のひとつである菌状息肉症では、定型的ながん化学療法だけでなく、病初期には紫外線療法や外用薬治療などが行われている。しかし、第 II, III 病期に使用できる有効な治療法は十分ではない。このような状況の中で、2011 年、わが国でもヒストン脱アセチル化酵素阻害剤のひとつであるポリノスタット(SAHA) (ゾリンザ) が発売となった。

遺伝子の発現は DNA 塩基配列 (ジェネテック) と可逆的な染色体の修飾 (エピジェネテック) の両方でコントロールされている。がんの原因としても転座や点突然変異などのジェネテックな異常と、核内のヒストン蛋白のメチル化・アセチル化などのエピジェネテックな染色体の修飾異常があり、治療の面からみれば、可逆的な変化である後者が治療の対象になる。

ヒストンの脱アセチル化を触媒するのがヒストン脱アセチル化酵素であり、この酵素がヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(histone deacetylase inhibitor, HDACi) で阻害されると、結果的にヒストンのアセチル化によって癌抑制遺伝子などの転写が促進されてがんが抑制される。米国 FDA で 2006 年に認可された HDACi のひとつであるポリノスタットは、臨床治験を経てわが国でも数か月前に認可となった。一方、ビタミン A 誘導体であるレチノイドは、生体内で活性型のレチノイン酸に変換されて核内でレチノイン酸受容体(retinoic acid receptor, RAR) あるいはレチノイド X 受容体 RXR に結合する。それぞれにサブタイプとして $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ が存在する。レチノイドとその受容体は細胞の増殖・分化・アポトーシスなどに関与した遺伝子を制御しているため、抗がん剤として海外では CTCL にも単独、または併用療法で用いられてきた。しかし、その効果は限定的であった。このように新規性が高く将来性もある HDACi とレチノイドではあるが、単独使用ではその効果は限定的なことが多い。その理由として、エピジェネテックス機構による遺伝子発現抑制が考えられる。HDACi とレチノイドの併用療法を行った場合には、HDACi がレチノイン酸受容体 RAR の発現を回復させて、レチノイドの抗腫瘍効果を持続的に高める作用が期待される。

本研究の研究協力者である東京医大講師 (現多摩総合医療センター皮膚科医長 加藤雪彦博士) は、米国留学中に HDACi である LAQ824 や LBH589 が抗腫瘍効果以外に血管新生抑制作用を持ち、それが VEGF 受容体シグナル伝達系を介することを報告している (Cancer Res 64:6626, 2004, Clin Cancer Res 12:634, 2006)。また、マウス腎細胞癌マウスモデルにおいて、IL-2 と MS-275(HDACi)の併用療法が単独療法に比較して著効を示すことを報告している (Clin Cancer Res 13:4538-46, 2007)。

## 2. 研究の目的

皮膚 T 細胞リンパ腫細胞株を用いて、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) とレチノイドの、単独もしくは併用療法による抗腫瘍効果を、in vitro 実験、in vivo 腫瘍皮膚移植モデルにより明らかにする。その機序として、ヒストン脱アセチル化などのエピジェネテックス異常により抑制されていたレチノイン酸受容体 RAR $\beta$ 2 の発現が HDACi の併用により回復し、抗腫瘍効果の増強が得られることを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) 皮膚 T リンパ腫細胞 CTCL 株のレチノイン酸受容体 RAR $\beta$ 2 の発現の確認

ヒト T 細胞株として、菌状息肉症由来の MJ、Myla、セザリー症候群由来の SeAx、HH、HUT78 を使用する。それぞれの CTCL 株の RAR $\beta$ 2 の発現を mRNA レベル、タンパクレベルで確認する。

### 2) HDACi およびレチノイドの単独ないし併用療法による in vitro 抗腫瘍効果の検討

HDACi として MS-275(Entinostat)、ポリノスタットを使用し、レチノイド関連として Am80(Tamibarotene)、ベキサロテンを使用する。

コロニー形成アッセイ: 6 ウェルプレートに 200-400 個の T リンパ腫細胞を撒き、各薬剤を 3 日間投与した後、培養液から薬剤を除き 1 ~ 2 週間後に形成されたコロニー数を数える。

XTT アッセイキットを用い、増殖抑制効果を検討する。

AnnexinV 抗体を用いて FACS でアポトーシス誘導効果について検討する。

細胞周期解析キットを用いて FACS で細胞周期停止効果について検討する。

### 3) CTCL 株を用いた ChIP アッセイ

In vitro アッセイにて相乗効果が認められた薬剤の組み合わせで処理した CTCL 細胞株をホモジネートし、磁気ビーズと結合させた抗アセチル化ヒストン 3 と 4 抗体でそれぞれ反応させ、Chromatin immunoprecipitation (ChIP) を行う。磁気ビーズ回収後に RAR $\beta$ 2 の real time PCR を行い、処理前の値と比較することによりヒストンのアセチル化を証明する。

### 4) HDACi およびレチノイドの単独ないし併用療法による in vivo 抗腫瘍効果の検討

(1) SCID マウスの皮下に CTCL 細胞を  $10^6$  個単独、ないしマトリジェルに懸濁させて皮下注射し、腫瘍の形成を確認後に HDACi とレチノイドを経口投与する。腫瘍の皮下注射後 3 日目に治療を開始する初期治療モデルと 9 日後に治療を開始する晩期治療モデルを設定し、抗腫瘍効果の特性を検討する。

3 回/週に皮下腫瘍の大きさを計測し、腫瘍体積や安楽死後に摘出した腫瘍の重量によって抗腫瘍効果を判定する。

皮下腫瘍を摘出して、抗腫瘍効果を病理組織学的に検討する。また、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 染色により、抗腫瘍効果がアポトーシスに起因しているかどうかを判定する。血管新生抑制効果についても画像解析により明らかにする。

(2) 腫瘍皮膚移植モデル実験から腫瘍細胞を回収して以下の検討を行う

HDACi とレチノイドの単独あるいは併用療法の動物から腫瘍細胞を回収し、それぞれの動物について RAR $\beta$ 2、VEGF の発現を mRNA レベルとタンパクレベルで調べる。また transfectant のプロモーター活性も測定する。

ChIP アッセイにより RAR $\beta$ 2 発現の回復がヒストンのアセチル化によるものであることを証明する。

## 4 . 研究成果

ヒト皮膚 T リンパ腫細胞株のうち、最も反応の良かった SeAx 株を用いて、histone deacetylase inhibitor (HDACi) のひとつである MS-275(entinostat) とレチノイド (Am80) の抗腫瘍効果を、RAR  $\beta$ 2 の発現回復の観点から検討した。in vitro の増殖実験では併用投与群において相加的な抗腫瘍効果が認められた。また、この場合には RAR  $\beta$ 2 の発現が回復していた。さらに、SCID マウスの皮下に CTCL 細胞を皮下注射し、腫瘍塊形成を確認後に HDACi とレチノイドを経口投与したところ、併用群で有意に腫瘍塊の増殖抑制効果が認められた。また、Kaplan-Meier 生存曲線においても併用群で生存マウス数が多い傾向が認められた。

併用群の腫瘍細胞では p21 と apoptosis がより発現していた。ChIP アッセイにより、RAR $\beta$  2 の回復が RAR  $\beta$ 2 のプロモーター領域のヒストン H4 のアセチル化によることを確認した。

以上の結果を英語論文にまとめ以下のようなタイトルで投稿中である (アクセプトはされていない)。

Kato Y, Egusa C, Maeda T, Tsuboi R : Anti-tumor effect of combination of retinoid and histone deacetylase inhibitor in cutaneous T cell lymphoma cell is due to restoration of tumor suppressor gene retinoic acid receptor  $\beta$  2 via histone acetylation.

## 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) Kato Y, Yoshino I, Egusa C, Maeda T, Pili R, Tsuboi R.: Combination of HDAC inhibitor MS-275 and IL-2 increased anti-tumor effect in a melanoma model via activated cytotoxic T cells. J Dermatol Sci 査読あり 75(2):140-7, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.04.014>

2) 加藤雪彦: エピジェネティクスの衝撃. 皮膚診療 査読なし 35: 118-128, 2013.

〔学会発表〕(計 3 件)

1) Kato Y, Egusa C, Maeda T, Tsuboi R:Histone deacetylase inhibitor MS-275 restored retinoid sensitivity and had an antitumor effect in combination with retinoic acid Am80 in human cutaneous T cell lymphoma" Epigenetics 2013 , 3rd - 6th December 2013  
Port Stephens, New South Wales, Australia.

2) 加藤雪彦, 江草智津, 前田龍郎, 坪井良治: ヒト皮膚 T 細胞リンパ腫株に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤とレチノイン酸の抗腫瘍効果の検討. 第 89 回東京医科大学・東京薬科大学免疫アレルギー研究会 東京 (2013.6.4)

3) 加藤雪彦: エピジェネティクス機構を標的とした新しい薬物療法 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の抗腫瘍効果 第 28 回日本皮膚悪性腫瘍学会 東京 (2012.6.29)

〔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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

坪井 良治 (TSUBOI RYOJI)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70221421

(2)研究分担者 なし

( )

研究者番号:

(3)連携研究者 なし

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

加藤 雪彦 (KATO YUKIHIKO)