

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790529

研究課題名(和文) エピジェネティック治療薬を活用した薬剤耐性の克服

研究課題名(英文) Improvement of drug resistance with epigenetic drugs

研究代表者

佐藤 洋美 (Sato, Hiromi)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30506887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腎細胞癌において多剤耐性(MDR)により継続治療が困難となるsunitinib(SU)の感受性を高める新たな化学療法薬の組み合わせを探ることを目的とした。併用薬物群の一つはエピジェネティック治療薬(sodium butyrate, TSA)、さらに一方でMDR改善薬(elacridar)の有用性が見出された。前者はSUの作用点であるRTKシグナルの相乗的抑制、腎細胞癌のがん抑制因子コネキシンの発現上昇、細胞周期の調整、後者は薬剤排出トランスポーター、P糖タンパク質の機能阻害を介して作用を発揮することが示唆された。またコネキシンを介するSUの感受性増強作用は悪性中皮腫においても示された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to search an appropriate drug which sensitize sunitinib efficacy in renal cell carcinoma (RCC). Finally epigenetic drugs (sodium butyrate, TSA) came out as good combination partners via blockage of RTK signaling which is sunitinib targeted pathway, upregulation of anti-tumor factor of RCC, connexin, or cell cycle regulation. Another candidate was multi drug resistance improving drug (elacridar) via inhibition of drug efflux pump, p-glycoprotein. Furthermore, it has been shown that connexin could also improve sunitinib resistance in malignant mesothelioma cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：薬剤耐性 sunitinib 腎細胞癌 悪性中皮腫 connexin P-gp

エピジェネティック治療薬を活用した薬剤耐性の克服

1. 研究開始当初の背景

がん治療における実施臨床では併用治療が基本となるが、多剤耐性(MDR)が弊害となることが多い。がん細胞に特異的な分子を標的とする分子標的治療薬は従来型の抗がん薬に比べて正常細胞に対する副作用発現を抑えられ、治療奏効率も高いという報告がある一方で、これまで見られなかった新たな有害症状や、繰り返し使用するうちに耐性化が避けられなくなるという一面もある。耐性化の要因には、がん抑制遺伝子の発現低下、新たなサルベージ経路の発達、細胞膜上の薬剤排出トランスポーターの亢進など、複数の因子が考えられる。一方でエピジェネティック治療薬が抗がん薬の殺細胞効果を高めるという報告が増えている。

2. 研究の目的

本研究では受容体型チロシンキナーゼに対するマルチキナーゼインヒビター(TKI)の sunitinib(SU)に着目し、SUの耐性化に関わる経路や感受性を向上させる方策として効果的な併用薬物について検討することを目的とした。薬物抵抗性を示すがん種として、SUの適応がん種である腎細胞癌(RCC)を選択した。SUの感受性を向上させる新たな化学療法薬の候補にエピジェネティック治療薬、またMDR改善薬としてP-gp/ABCG2阻害薬の併用薬としての有用性を検討した。さらに効果的な組み合わせについて作用点を追究し、他のがん種への応用性を図った。

3. 研究の方法

(1) RCCにおけるSUの感受性を向上させる併用薬物の探索および作用機序の検討

エピジェネティック治療薬には代表的なHDAC阻害薬の sodium butyrate (NaBu)およびトリコスタチン A (TSA)を選択した。一方、P-gp/ABCG2阻害薬としては第三世代の elacridar (Elac)を選択した。各薬物とSUの併用効果はMTT assayによる増殖能への寄与度で

確認し、combination index(CI)値により有用性を判断した。

併用効果の作用機序の検討として、各薬物の作用点への影響を多角的に検証した。すなわち、

TKIの作用点となるRTKシグナルを主とする血管新生経路への関与、RCCにおけるがん増殖抑制因子、コネクシン(Cx)の寄与度、そしてMDRの関与を考慮してSUが基質となる薬物排出トランスポーター、P糖タンパク質(P-gp)への影響、を確認した。

(2) 他のがん種への応用性についての検討

Cxのがん増殖抑制作用に着目し、RCCと同様に血管新生が旺盛な悪性中皮腫(MM)に対するSU感受性をCxが向上させるかどうか、Cx遺伝子導入MM株にて検討を行った。RCCにおいては母体組織に発現の多いCx32に、MMにおいては母体組織に発現の多いCx43に着目した。

4. 研究成果

(1) SUと他の薬物の併用効果の検討

NaBuとSUの併用効果

RCC細胞において、SUとNaBuを各種濃度で併用することでいずれも有意に細胞生存率が低下し、CI値は1を下回った。従ってこの組み合わせがSUの細胞増殖抑制効果を高めることが示された(図1)。SUの作用点である細胞膜上の増殖因子受容体やRTKシグナルの構成因子の発現をみると、PDGF受容体βの発現が併用により抑制される傾向がみられたが、RTKシグナル下流のAktやErkの活性化には変化はみられなかった(data not shown)。

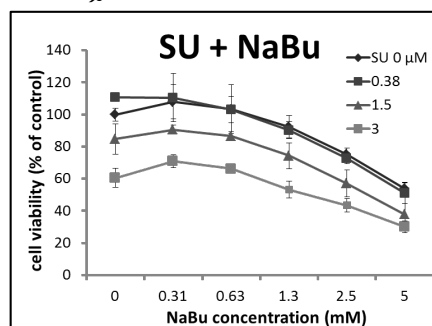


図1 SUとNaBuの併用後の細胞生存率。

一方、RCC における血管新生に対して SU と NaBu は共に抑制作用を示したという報告がある。血管新生の重要な寄与因子となる HIF-2 α の発現を、低酸素条件 4~24 時間の培養で薬物群ごとに比較したところ、併用群で最も発現低下がみられ、薬物感受性に影響した可能性が示唆された (図 2)。

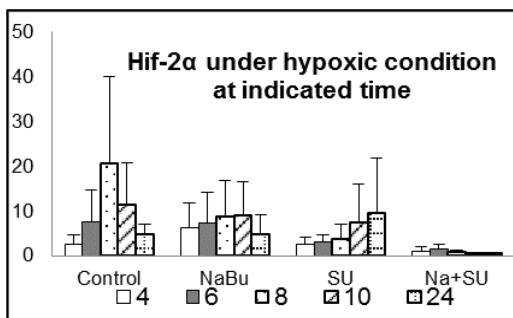


図 2 HIF-2 α 発現への影響。

一方、Cx (Cx32) のタンパク質発現は SU および NaBu 単独添加により上昇し、SU と NaBu の併用で最も強い発現上昇がみられた (図 3)。さらに Cx が 6 量体を作り、隣接細胞の片側膜状でコネクソンとよばれるヘミチャネルを形成し、また細胞間のコネクソンが連結して gap junction (GJ) が形成されチャンネルとなるが、細胞膜上での Cx32 の発現はほとんどみられず、GJ 形成および機能の回復はないと考えられた。ヘミチャネルについては、有意ではないものの併用群で機能が上昇する傾向はみられた (図 4)。以上より、Cx32 の作用は GJ 非依存的な機序で増殖抑制に寄与する可能性が示唆された。

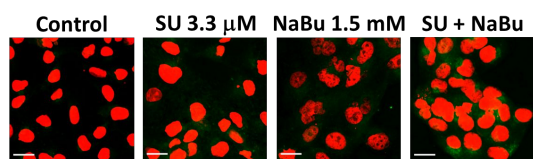


図 3 コネキシン (Cx) 発現への影響 (緑: Cx, 赤: 核)

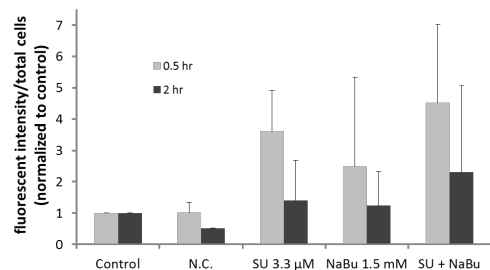


図 4 ヘミチャネル機能への影響 (蛍光取り込み能)

TSA と SU の併用効果

TSA と SU の組み合わせにおいても、NaBu の場合と同様に CI 値は 1 を下回り、増殖抑制の相乗効果が確認された。TSA 添加により濃度依存的にアセチル化ヒストン H3 (AcH3) の割合が増加したが (図 5)、がん抑制因子の Cx32 については TSA では発現回復が認められなかった。一方 TSA により制御される遺伝子群の中で細胞周期の G1 期および G2 期を制御する p21 が存在する。TSA 添加後の細胞周期の解析から、S 期、G2 期に多く停止する傾向と p21 の発現上昇が確認された (図 6)。従って TSA による p21 発現誘導が細胞周期をアレストし、SU 感受性向上に寄与した可能性が示唆された。

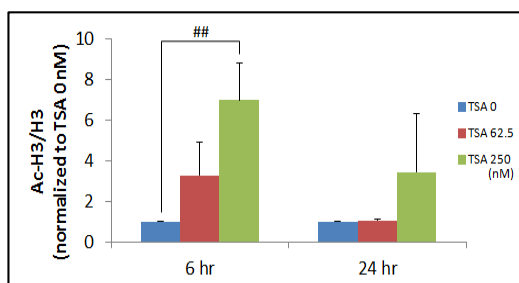


図 5 TSA 添加後のアセチル化ヒストン H3 (Ac-H3) の割合の変化

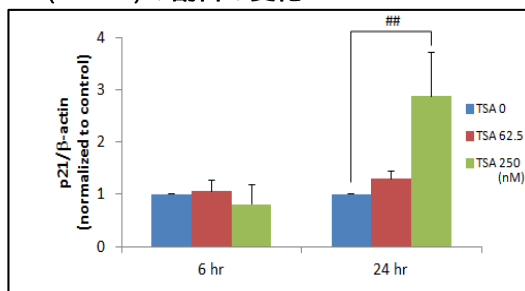


図 6 TSA 添加後の p21 発現の変化

Elac と SU の併用効果

Elac と Su の併用により SU の増殖抑制作用は有意に増強した。Elac のターゲットとなる P-gp および ABCG2 について各々の基質の細胞内取り込みを評価したところ、Elac の併用による取り込み能の増加は P-gp 基質 (テクネシウム標識 MIBI) の場合に顕著であったことから、Elac の作用は主に P-gp 阻害の寄与が大きいことが示唆された (図 7)。

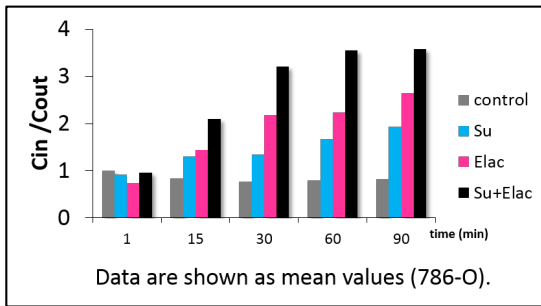


図7 SUとElacの併用後のP-gp基質(γ線標識)の細胞内取り込み.

(2) 悪性中皮腫(MM)のSU感受性にCxが与える影響

CxがSU感受性に影響すると考えられたため、悪性中皮腫(MM)において悪性度への関与が示唆されるCx43発現とSU感受性の相関を検討した結果、Cx43強制発現株ではSUの細胞増殖抑制作用が有意に強く示された(図8)。

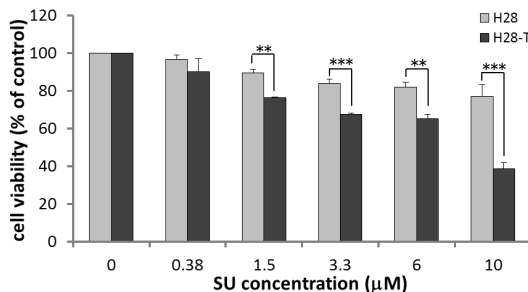


図8 MMにおけるSUの増殖抑制作用。(H28;human MM, H28-T; H28のCx43遺伝子導入株)

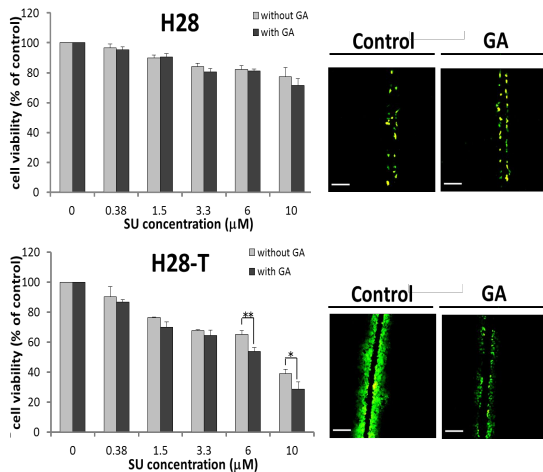


図9 SUとGJ阻害薬(GA)の併用が増殖抑制作用へ与える影響。薄いカラム:GAなし,濃いカラム:GA存在下の検討。

一方、Cx43の作用がGJを介する作用なのか、Cxタンパク質単体としての作用なのか検証するため、GJ機能を阻害するグリチルリチン

酸(GA)を併用してSUの作用を検討したところ、Cx43強制発現株(H28-T)におけるSUの増殖抑制作用はGAが存在しても解除されなかった。従ってSUに対するCxの作用はGJ非依存的な機序によると考えられ、これはRCCにおける結果と同様であった。

以上より、エピジェネティック治療薬やMDR改善薬の中にSUの併用薬物として新たに効果的な組み合わせが見出され、それぞれの作用機序について一序が解明された。

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9件)

Tuerdi G, Ichinomiya S, Sato H, Siddig S, Suwa E, Iwata H, Yano T, Ueno K.

Synergistic effect of combined treatment with gamma-tocotrienol and statin on human malignant mesothelioma cells. *Cancer Letters*, 査読有, Vol. 33, 2013, pp.116-127, DOI: 10.1016/j.canlet.2013.07.015.

Sato H, Siddig S, Suzuki R, Uzu M, Suzuki S, Nomura Y, Uehara T, Sekine Y, Arano Y, Ueno K. A dual inhibitor of MDR-1 and ABCG2, elacridar, enhances cytotoxic effects of sunitinib on RCC cell lines. *Proc Am Assoc Canc Res*, 査読有, Vol.54, 2013, pp.983, ISSN 0569-2261

Uzu M, Sato H, Suzuki R, Okuzawa H, Siddig S, Tuerdi G, Suzuki S, Nomura Y, Sekine Y, Yano T, Ueno K. Connexin might be involved in anti-cancer combination effect of sunitinib and sodium butyrate. *Proc Am Assoc Canc Res*, 査読有, Vol.54, 2013, pp.1043, ISSN 0569-2261

Sato H, Yamada R, Yanagihara M, Okuzawa H, Iwata H, Kurosawa A, Ichinomiya S, Suzuki R, Okabe H, Yano T, Kumamoto T, Suzuki N, Ishikawa T, Ueno K. A new 2-aryl-1,4-naphthoquinone-1-oxime methyl

ether compound induces microtubule depolymerization and subsequent apoptosis. *Journal of Pharmacological Sciences*, 査読有, Vol. 118, 2012, pp.467-478, DOI:

org/10.1254/jphs.11229FP

[学会発表](計14件)

加柴 達朗, 宇津 美秋, 佐藤 洋美, 鈴木 梨菜, 上野 光一. 腎がん細胞における HDAC 阻害薬 trichostatin A と sunitinib の併用効果. 第134回日本薬学会年会 2014年3月29日 熊本

佐藤 洋美, Sana Siddig, 宇津 美秋, 加柴 達朗, グシ宮城 圭佑, 関根 祐子, 上野 光一. 腎細胞癌における P-glycoprotein および ABCG2 阻害がスニチニブ感受性に与える影響. 第87回日本薬理学会年会 2014年3月19日 仙台

宇津 美秋, 佐藤 洋美, 矢野 友啓, 上野 光一. Sunitinib 及び sodium butyrate の併用効果に対する connexin32 の関与. 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月4日 横浜

佐藤 洋美, 宇津 美秋, 矢野 友啓, 上野 光一. Cytotoxic effects of sunitinib was enhanced by a dual inhibitor of P-gp/ABCG2, elacridar in RCC cell lines. 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月5日

Miaki Uzu, Hiromi Sato, Rina Suzuki, Hiroko Okuzawa, Sana Siddig, Guligena Tuerdi, Sayumi Suzuki, Yuki Nomura, Yuko Sekine, Tomohiro Yano, Koichi Ueno. Connexin might be involved in anti-cancer combination effect of sunitinib and sodium butyrate. 104th AACR, April 7, 2013

Washington, DC (USA)

Hiromi Sato, Sana Siddig, Rina Suzuki, Miaki Uzu, Sayumi Suzuki, Yuki Nomura, Tomoya Uehara, Yuko Sekine, Yasushi Arano, and Koichi Ueno. A dual inhibitor of

MDR-1 and ABCG2, elacridar, enhances cytotoxic effects of sunitinib on RCC cell lines. 104th AACR, April 7, 2013

Washington, DC (USA)

宇津 美秋, 佐藤 洋美, 鈴木 梨菜, 奥澤 紘子, 岩田 紘樹, Siddig SANA, Tuerdi GULIGNA, 上野光一. Sunitinib 及び sodium butyrate の併用効果に対する connexin の関与. 第133回薬学会年会 2013年3月28日 横浜

Sana Siddig, Hiromi Sato, Rina Suzuki, Miaki Uzu, Sayumi Suzuki, Yuki Nomura and Koichi Ueno. MDR-1 and ABCG2 inhibitor, elacridar, enhances cytotoxic effects of sunitinib on RCC cell lines. 第86回日本薬理学会年会 2013年3月21日 福岡

Rina Suzuki, Hiromi Sato, Miaki Uzu, Sana Siddig, Guligena Tuerdi, Koichi Ueno. Combination effect of HDAC inhibitor and Sunitinib in renal cancer cells. 第6回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2012年11月24日 京都

[図書](計1件)

Sato H. Ueno K. Chapter 10: Connexin 43 Enhances the Cisplatin-Induced Cytotoxicity in Mesothelioma Cells, *Mesotheliomas - Synonyms and Definition, Epidemiology, Etiology, Pathogenesis, Cyto-Histopathological Features, Clinic, Diagnosis, Treatment, Prognosis*. Alexander Zubritsky (Ed.), ISBN: 978-953-307-845-8, InTech, pp.153-168, 2012

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 洋美(SATO HIROMI)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：30506887

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし