

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890152

研究課題名(和文)破骨細胞との共存下における癌細胞の生存促進と薬剤耐性の機序の解明およびその克服

研究課題名(英文)Elucidation and overcoming of the drug resistance in cancer cells in the presence of the osteoclast.

研究代表者

渡邊 佳一郎(WATANABE, Keiichiro)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：20634554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：酸性環境下において骨髄腫細胞は酸を感受しPI3K-Aktを介する生存経路を活性化し、この活性化がさらに自らのpHセンサーの発現を増強し骨髄腫細胞の酸感受性と生存シグナルを亢進するという悪循環が形成されていることが示唆された。また、酸環境下では骨髄腫細胞の転写因子Sp1の核移行が促進され、ヒストン脱アセチル化酵素HDACの発現が誘導されアポトーシス誘導因子DR4の遺伝子発現が抑制された。HDAC阻害薬はこのDR4の発現抑制を回復させた。よってDR4アゴニスト抗体とHDAC阻害薬の併用、PI3K-Akt経路阻害薬は酸が賦与する骨髄腫細胞の薬剤耐性を克服する治療薬の候補と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In an acidic environment, myeloma cells sense an acid and activate survival pathways via PI3K-Akt. The activation and survival of the acid-sensitive myeloma cells to enhance the expression of the pH sensor their further the vicious circle enhancing signal is formed has been suggested. Moreover, nuclear translocation of the transcription factor Sp1 in myeloma cells was promoted expression of HDAC and suppressed gene expression of apoptosis-inducing factor DR4 in an acid environment. HDAC inhibitors were allowed to recover for the suppression of the expression of DR4. Therefore, PI3K-Akt inhibitors, and the combination of HDAC inhibitors and DR4 agonist antibody were considered a candidate for therapeutic agent to overcome drug resistance of myeloma cells in an acid environment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：癌 酸性環境 薬剤耐性

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍細胞は解糖系の亢進により多量の乳酸を産生 (Warburg 効果) し細胞外 pH を低下させ、酸性微小環境を形成する。酸性微小環境は、抗癌剤への耐性を惹起し癌細胞の悪性形質を強める。従来の抗腫瘍薬は pH7.4 でスクリーニングされているが、酸環境下での抗腫瘍効果はほとんど検討されていない。実際、多くの抗腫瘍薬は酸性環境下ではその抗腫瘍活性が著明に減弱するため、治療成績の向上のためには腫瘍が形成しうる酸環境下において強力な抗腫瘍活性を発揮する抗腫瘍薬の開発が重要な臨床課題である。本研究では、腫瘍酸性環境における腫瘍生存促進の分子機序を解析し治療標的となる分子を同定するとともに、酸性環境下で腫瘍細胞特異的に細胞傷害活性を発揮する各種薬剤が、腫瘍の薬剤耐性を克服しうる新規治療薬としての有用性を検討する。

### 2. 研究の目的

酸性環境は癌に共通して認められ、抗癌剤への耐性を惹起し癌細胞の悪性形質を強める。従来の抗腫瘍薬の多くは酸環境下では抗腫瘍活性が減弱するため、酸環境下で強力な抗腫瘍活性を発揮する抗腫瘍薬の開発が重要な臨床課題である。そこで、骨髄腫瘍病変部に強力な酸産生細胞である破骨細胞を誘導し、より高度な酸環境を形成し薬剤耐性を獲得する多発性骨髄腫を用い、腫瘍酸環境を標的とし薬剤耐性を克服しうる新規治療薬を創出するために、腫瘍細胞の生存シグナルの活性化機序やその代謝に及ぼす影響および治療標的となる分子の同定を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 骨髄腫細胞を乳酸により pH を調整した酸性培地で培養、もしくは破骨細胞との共存培養下において各骨髄腫細胞株および患者細胞における Akt のリン酸化と、PI3K 阻害剤である LY294002 を用い、Akt のリン酸化に PI3K が関与するかどうかをウエスタンブロット法にて調べる。

(2) 骨髄腫細胞に構成的に発現する pH 感受受容体である、TDAG8、G2A、OGR1、TRPV1 の酸性環境下における発現変化を RT-PCR を用いて RNA レベルで確認する。LY294002 を用い、pH 感受受容体発現レベルの変化に PI3K が関与するかどうかを調べる。

(3) 酸性環境 (pH7.2~6.6) においては骨髄腫細胞の TNF 関連アポトーシス誘導リガンド TRAIL の感受性が低下するが、そのメカニズム解明のため、酸性環境における骨髄腫細胞の TRAIL 受容体 DR4 の発現変化を、RT-PCR、ウエスタンブロット法およびフローサイトメトリーを用いて RNA レベル、タンパクレベルにおいて検討する。

(4) DR4 の発現低下についてエピジェネティックなメカニズムが関与しているかどうかを検討するため、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤であるバルプロ酸が酸性環境での DR4 の発現に及ぼす影響を RT-PCR、ウエスタンブロット法を用いて検討する。また、酸性培地において、骨髄腫細胞の HDAC1、HDAC2 の発現、ヒストン H3、4 のアセチル化についても調べる。

(5) 酸性環境下で HDAC の発現が増強するメカニズムを明らかにするため、発がん遺伝子である SV40 のプロモーター部に結合する因子として発見された転写因子 Sp1 が関与するかどうかを Sp1 の転写活性阻害剤テラメプロコールを用いて調べる。

(6) 酸性環境において低下した骨髄腫の抗 DR4 アゴニスト抗体による細胞死が、HDAC 阻害剤により回復するかどうかを WST-8 assay を用いて調べた。

### 4. 研究成果

(1) 骨髄腫細胞株 RPMI8226、INA-6、MM1S、において、pH6.8 の酸性培地で培養したところ、すべての細胞において Akt のリン酸化が亢進しており、PI3K 阻害剤である LY294002 の添加により、この Akt のリン酸化の亢進が抑制された (図 1)。また、強力な酸産生細胞である破骨細胞との共存培養下においても同様の結果が得られた。このことから、酸性環境では骨髄腫細胞の Akt のリン酸化が亢進し、その亢進に PI3K-Akt 経路が重要な役割を果たしていることが示唆された。

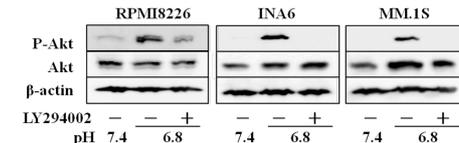


図 1 酸性環境における各種骨髄腫細胞の Akt の活性化

(2) 骨髄腫細胞株 RPMI8226、INA-6、MM1S は pH 感受受容体 TDAG8、G2A、OGR1、TRPV1 を mRNA レベルで発現しており、酸性環境下 (pH6.8) においてその発現が上昇し、LY294002 の添加によりその発現レベルは低下した。このことから、酸性環境下での各種 pH 感受受容体の発現上昇に、PI3K 経路が深く関与していることが示唆された。

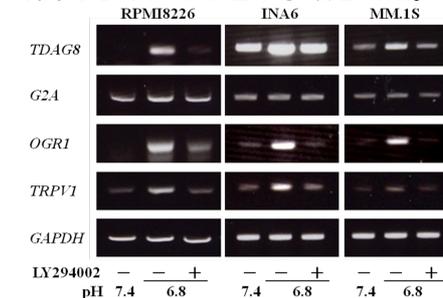


図 3 酸性環境下での pH 感受受容体の発現 (RT-PCR)

(3) 酸性環境 (pH6.8 ~ 6.6) において骨髄腫細胞の DR4 の発現は、RNA レベルで低下した (図 3)。また、タンパクレベルでの発現低下も認められた (図 4)。このことから酸性環境における骨髄腫細胞に対する抗 DR4 アゴニスト抗体のアポトーシス誘導の減弱は、酸性環境での DR4 の発現低下によるものであることが示唆された。

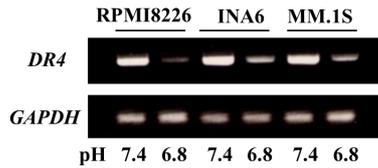


図 3 酸性環境下での DR4 発現 (RT-PCR)

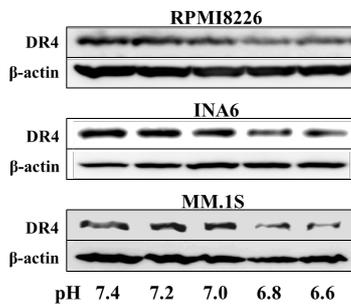


図 4 酸性環境下での DR4 発現 (ウエスタンブロット)

(4) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬であるバルプロ酸を添加すると、酸性環境における DR4 の発現低下が回復した。また、酸性培地において、各種骨髄腫細胞の HDAC1、HDAC2 の発現が上昇しており、ヒストン H3、4 のアセチル化は低下していた (図 5)。このことから酸性環境では HDAC1、2 の発現が上昇し、ヒストンの脱アセチル化が起こっていることが示唆された。

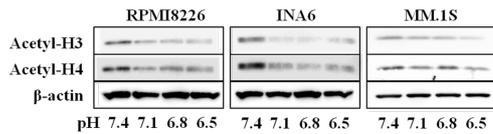


図 4 酸性環境下でのヒストン 3、4 のアセチル化

(5) 酸性環境下および非酸性環境下において、Sp1 転写活性阻害剤テラメプロコールの添加により、骨髄腫細胞の HDAC1 が著明に低下した (図 5)。このことから骨髄腫細胞において転写因子 Sp1 が HDAC の発現を調節している可能性が示唆された。

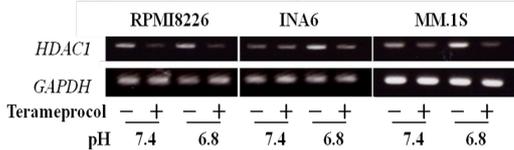
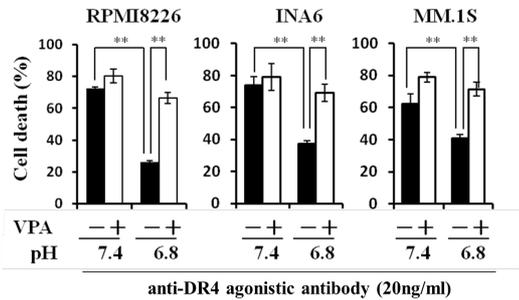


図 5 Sp1 阻害剤による HDAC1 の発現変化

(6) 酸性環境において低下した骨髄腫の抗 DR4 アゴニスト抗体による細胞死は、HDAC 阻害剤の添加により回復した (図 6)。



\*\* : P<0.01

図 5 Sp1 阻害剤による DR4 誘導性アポトーシスの回復

以上のことから、酸性環境下において骨髄腫細胞は pH 感受受容体を構成的に発現し酸を感受しており、PI3K-Akt を介する生存経路を活性化し、この活性化がさらに自らの pH センサーの発現を増強し骨髄腫細胞の酸感受性と生存シグナルを亢進するという悪循環が形成されていることが示唆された。また、酸性環境下では骨髄腫細胞の転写因子 Sp1 の核移行が促進され、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC の発現が誘導されアポトーシス誘導因子 DR4 の遺伝子発現が抑制された。HDAC 阻害薬はこの DR4 の発現抑制を回復させた。よって DR4 アゴニスト抗体と HDAC 阻害薬の併用、PI3K-Akt 経路阻害薬は酸が賦与する骨髄腫細胞の薬剤耐性を克服する治療薬の候補と考えられた。

本研究は酸性環境における癌細胞 (骨髄腫細胞) の薬剤耐性メカニズムの一部を解明し、その克服薬の候補を提示した。様々な癌細胞は、周囲に酸性環境を形成していると考えられているが、同環境下での抗癌剤の効果の検討や薬剤耐性のメカニズムに対する解析の詳細な報告は未だ少ない。今後は薬剤排出トランスポーターや DR4 以外の TNF スーパーファミリーに関して酸性環境下における変化や薬剤耐性に対する関与を検討していきたいと考えている。また、骨髄腫以外の癌細胞 (乳癌や前立腺癌) においても同様の知見が得られれば、医学の発展により貢献するのではないかと考えている。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

天知良太、安倍正博、渡邊佳一郎、賀川久美子、藤井志朗、原田武志、三木浩和、中村信元、小田明日香、日浅雅博、田中栄二、松本俊夫、酸性環境は骨髄腫細胞の DR4 の発現をエピジェネティックに抑

制しTRAILに対する抵抗性を獲得させる、  
癌と骨病変研究会、2013年11月18日、千  
代田放送会館（東京）

天知良太、安倍正博、渡邊佳一郎、賀川  
久美子、藤井志朗、原田武志、三木浩和、  
中村信元、小田明日香、日浅雅博、田中  
栄二、松本俊夫、酸性環境は骨髄腫細胞  
のDR4の発現をエピジェネティックに抑  
制しTRAILに対する抵抗性を獲得させる、  
第72回日本矯正歯科学会学術集会、2013  
年10月7～9日、キッセイ文化ホール・松  
本市総合体育館（長野）

Amachi R, Watanabe K, Fujii S, Harada  
T, Miki H, Nakamura S, Oda A, Hiasa  
M, Tanaka E, Matsumoto T, Abe M,  
Acidic conditions epigenetically repress  
the TRAIL receptor DR4 in myeloma  
cells to confer their resistance to TRAIL,  
American Society of Bone and Mineral  
Research 2013、2013年10月4～7日、ポ  
ルチモアコンベンションセンター（アメ  
リカ）

Amachi R, Watanabe K, Fujii S, Harada  
T, Miki H, Nakamura S, Oda A, Hiasa  
M, Tanaka E, Matsumoto T, Abe M, An  
acidic milieu confers the resistance to  
TRAIL in myeloma cells through the  
PI3K-Akt-mediated epigenetic down-  
regulation of the TRAIL receptor DR4,  
2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the IBMS and  
JSBMR、2013年5月28日～6月1日、神戸  
ポートピアホテル（兵庫）

Amachi R, Watanabe K, Fujii S, Harada  
T, Miki H, Nakamura S, Oda A, Hiasa  
M, Tanaka E, Matsumoto T, Abe M, An  
acidic milieu suppresses histone  
acetylation in myeloma cells to  
down-regulate the TRAIL receptor DR4  
expression, 14<sup>th</sup> International Myeloma  
Workshop、2013年4月3～7日、国立京都  
国際会議場（京都）

Amachi R, AbeM, Watanabe K, Kagawa  
K, Fujii S, Harada T, Miki H,  
Nakamura S, Oda A, Hiasa M, Tanaka  
E, Matsumoto T, An acidic milieu  
suppresses DR4 editing and induces  
p22 c-FLIP to cause myeloma  
resistance to TRAIL, 第74回日本血液学  
会学術集会、2012年10月19～21日、国立  
京都国際会議場（京都）

天知良太、安倍正博、渡邊佳一郎、中村  
信元、日浅雅博、田中栄二、松本俊夫、  
酸性環境は骨髄腫細胞にDR4 の発現抑  
制とcFLIP の活性化を惹起しTRAIL に  
対する抵抗性を獲得させる、第30回骨代  
謝学会学術集会、2012年7月19～21日、  
京王プラザホテル（東京）

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 佳一郎 (WATANABE, Keiichiro)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：20634554

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：