

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461602

研究課題名(和文)ラブドイド腫瘍における薬剤耐性機序のエピゲノム解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文)The Epigenome Analysis of the Mechanisms of Chemoresistance and Development new treatment in Rhabdoid Tumor

研究代表者

桑原 康通 (KUWAHARA, YASUMICHI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30590327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Malignant rhabdoid tumor (MRT) では、ほぼ全例で SNF5の機能喪失が認められ、MRT腫瘍原性の解明にSNF5の機能解析は重要である。近年、Bcl-2 ファミリーに結合・阻害し、アポトーシスを誘導するNOXAが、SNF5により直接転写活性を受けると報告された。MRTで、SNF5の機能喪失によるNOXAの発現低下とアポトーシス誘導機構と薬剤感受性を検討した結果、MRTではSNF5欠損によるエピジェネティックなNOXAの発現抑制により、NOXAとMCL-1との結合を介したアポトーシスが阻害され、薬剤抵抗性を獲得していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Malignant rhabdoid tumor (MRT) is a highly aggressive pediatric cancer characterized by inactivation of SNF5, a core subunit of SWI/SNF complexes. Previously, we showed SNF5 contributes to transcriptional activation of NOXA, a pro-apoptotic protein that binds and inhibits the anti-apoptotic protein MCL-1. In this study, we found that NOXA expression was downregulated in both MRT cell lines and in clinical samples and that ectopically expressed NOXA bound MCL-1 and increased the sensitivity of MRT cell lines to doxorubicin (DOX) by promoting apoptosis. We also showed that knockdown of MCL-1 in MRT cell lines induced apoptosis and increased DOX sensitivity in MRT cells. Furthermore, we generate mice xenografts for both MCL-1 knockdown (KD) and control cell lines. We observed that mean tumor volume in the DOX-treated MCL-1 KD group was significantly smaller than that in the control group. Our results suggest that modulation of the NOXA/MCL-1 pathway underlies a chemoresistance in MRT.

研究分野：小児がん

キーワード：ラブドイド腫瘍 SNF5 クロマチンリモデリング NOXA 薬剤感受性 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Malignant rhabdoid tumor (MRT) は主に小児期の腎・中枢神経・軟部組織に発生する悪性軟部肉腫である。集学的治療の進歩にもかかわらず生命予後の改善は乏しく、5年生存率は約30%にとどまっている。MRTはほぼ全例で両アリルに *SNF5* 遺伝子の変異を認めることが知られており、*SNF5* 遺伝子の機能解析及び標的遺伝子の検索が MRT の腫瘍原性の解明に必要と考えられている。

(2) 我々は以前、*NOXA* 遺伝子が *SNF5* の標的遺伝子であることを明らかにした。*NOXA* は *MCL-1* に結合し、その機能を阻害することでアポトーシスを誘導することが知られている。

## 2. 研究の目的

(1) MRT における *NOXA* 遺伝子の機能解析。

(2) *NOXA* 類似薬の抗腫瘍効果を検討。

## 3. 研究の方法

(1) MRT 細胞株及び臨床検体の *SNF5* と *NOXA* 発現の評価

MRT 細胞株における *SNF5* と *NOXA* の発現を、ウェスタンブロット法を用いて他の小児がん細胞株と比較した。また、mRNA を抽出して cDNA 合成を行い、リアルタイム PCR 法により *SNF5* 遺伝子および *NOXA* 遺伝子の発現比較も行った。発現の比較は *GAPDH* を用いた Ct 法により行った。MRT の臨床検体に対しては、*SNF5* と *NOXA* の免疫組織染色を行った。

(2) *NOXA* 強制発現による薬剤感受性の変化の評価

pcDNA3.1(+) プラスミドに *NOXA* のコンストラクトを導入し、MRT 細胞株 (TTC549) に *NOXA* 遺伝子を強制発現させた。強制発現した *NOXA* と内因性の *MCL-1* 蛋白の結合を免疫沈降法により強化した。次に、DNA 傷害性抗がん剤である doxorubicin (DOX) を段階的に希釈投与し *NOXA* 強制発現株に投与して  $IC_{50}$  を検討し

た。さらに、*NOXA* 強制発現株を DOX 投与下に培養し、フローサイトメトリーを用いた TUNEL 法及び Cleaved caspase-9 と Cleaved caspase-3 をウェスタンブロット法により評価し、アポトーシス誘導の変化を検討した。

(3) *MCL-1* 発現抑制による薬剤感受性の変化の評価

siRNA 法を用いて、MRT 細胞株 (TTC549, KP-MRT-RY) の *MCL-1* 遺伝子の発現を抑制した。発現抑制株に DOX を段階的に希釈投与し、 $IC_{50}$  を検討した。また、*MCL-1* 発現抑制株を DOX 投与下に培養し、フローサイトメトリーを用いた TUNEL 法によりアポトーシス誘導の変化を検討した。次に shRNA 法を用いて MRT 細胞株 (TT549) の *MCL-1* 遺伝子の発現を安定的に抑制した。発現抑制株をヌードマウスに皮下移植し、腫瘍形成後に DOX を静脈内注射し腫瘍体積の変化を検討した。

(4) TW-37 の抗腫瘍効果の検討

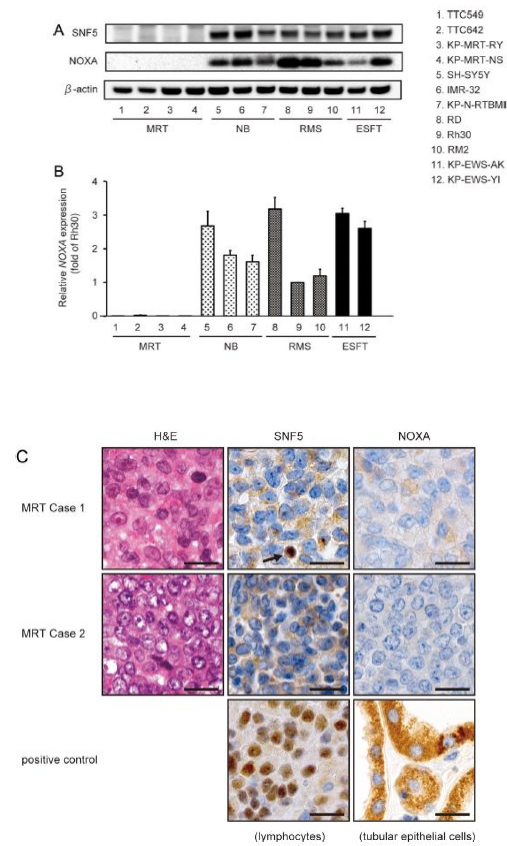
*NOXA* 類似薬である TW-37 を段階的に希釈してそれぞれ MRT 細胞株 (TTC549, KP-MRT-RY) し、 $IC_{50}$  を検討した。また、低濃度の TW-37 存在下に段階希釈した DOX をそれぞれ MRT 細胞株に加え、combination index を検討した。さらに MRT 細胞株をヌードマウスに皮下移植し、DOX と TW-37 をそれぞれ静脈内投与、静脈内投与し腫瘍体積の変化を検討した。

## 4. 研究成果

(1) MRT 細胞株及び臨床検体では *SNF5* および *NOXA* の発現が低下している。

MRT 細胞株は、他の小児がんの細胞株に比べて *SNF5* および *NOXA* の蛋白発現が低下しており (図 1A)、mRNA の発現レベルと相関していた (図 1B)。また、MRT の臨床検体においても、*SNF5* および *NOXA* の発現は低下していた (図 1C)。

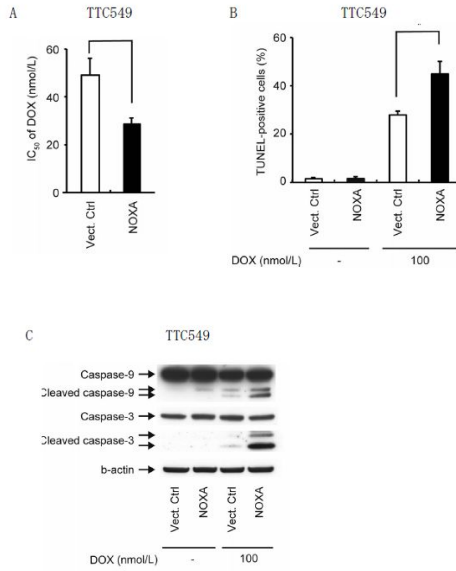
図1. MRT細胞株と臨床検体ではSNF5とNOXAの発現が低下している。



(2) MRTはNOXAの発現低下によりアポトーシス誘導が障害されており、化学療法抵抗性を獲得している。

欠損しているNOXAの機能を解析するために、MRT細胞株においてNOXAを強制発現させた。NOXA強制発現群に対するDOXの $IC_{50}$ は29nMであり、コントロール群の49nMに対して優位に低下していた(図2A)。100nMのDOX投与下でMRT細胞株を培養すると、TUNEL陽性率は強制発現群で45%であり、コントロール群の28%に比べて優位に低下していた(図2B)。また、強制発現群ではCleaved caspase-9とCleaved caspase-3の発現が増強していた(図2C)。これらの結果から、MRT細胞株ではNOXAが発現低下しておりアポトーシスが誘導されないために、化学療法抵抗性を獲得していることが示唆された。

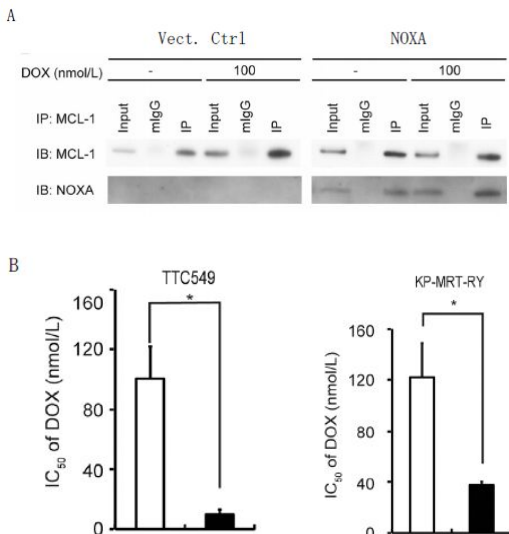
図2. NOXAを強制発現すると、アポトーシスが誘導されDOXに対する感受性が改善する。



(3) NOXA発現低下によるアポトーシス誘導の障害と化学療法抵抗性の獲得は、MCL-1の機能を阻害できないことが原因である。

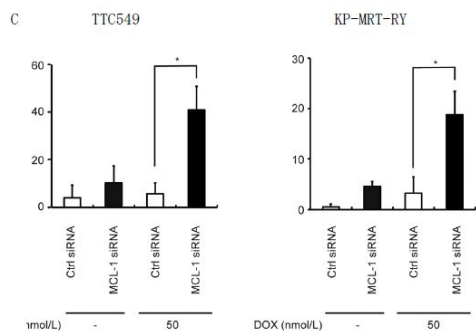
NOXAはMCL-1に結合し、その機能を阻害することでアポトーシスを誘導することが知られている。MRT細胞株において強制発現させたNOXAも内因性のMCL-1と結合していることを確認した(図3A)。次にMRT細胞株におけるMCL-1の発現を抑制すると、DOXの $IC_{50}$ はコントロール群に比べて優位に低下した(図3B)。

図3. MCL-1を発現抑制すると、アポトーシスが誘導されDOXに対する感受性が改善する。



また、50nM の DOX 投与下で MRT 細胞株を培養すると、TUNEL 陽性率は MCL-1 発現抑制群で優位に低下していた(図 3C)。MRT のアポトーシス誘導の障害と化学療法抵抗性の獲得は、NOXA の発現低下により MCL-1 の機能を阻害できないことが原因であることが示唆された。

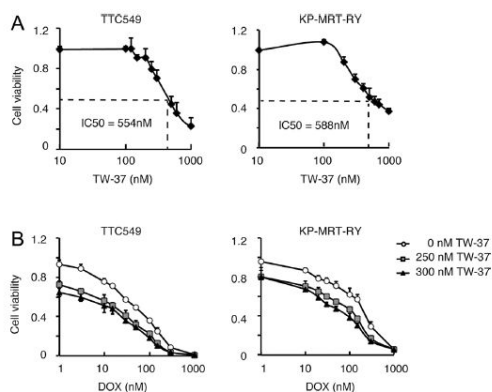
図 3C



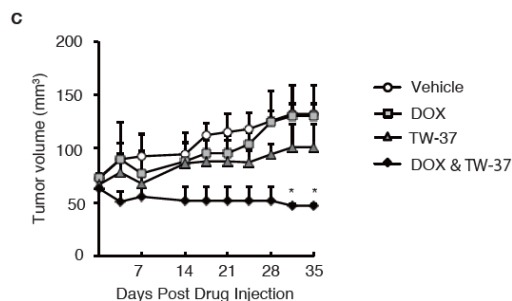
(4) TW-37 は MRT 細胞株の増殖を抑制し、DOX と相乗効果を示す。

MCL-1 遺伝子の発現抑制により、MRT 細胞株の doxorubicin (DOX) に対する感受性が改善し、アポトーシスが誘導されていることを示した。また MCL-1 阻害剤の 1 つである TW-37 が DOX との併用により MRT 細胞株の増殖抑制に関して相乗効果を有することを示した(図 4 A、B)。

図4. TW-37は増殖抑制効果を示し、DOXと相乗効果を有する。



また、マウス皮下への MRT 細胞株移植腫瘍に対して、DOX と TW-37 の単独または併用効果を検討したところ、併用群で腫瘍の増殖を抑制した(図 4C)。



以上の結果から、MRT では SNF5 の欠損により NOXA の発現が低下し、MCL-1 の機能を抑制することが出来ないことが化学療法抵抗性に関与することが証明された。また、MRT の新規治療として MCL-1 が有効な分子標的になり得ることが示された。

## 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 2 件)

Ouchi K, Kuwahara Y, Iehara T, Miyachi M, Katsumi Y, Tsuchiya K, Konishi E, Yanagisawa A, Hosoi H. A NOXA/MCL-1 Imbalance Underlies Chemoresistance of Malignant Rhabdoid Tumor Cells. *J Cell Physiol.* *J Cell Physiol.* 2016

Sep;231(9):1932-40. (Epub 2016 Jan 14.) 査読あり

Wei D, Goldfarb D, Song S, Cannon C, Yan F, Sakellariou-Thompson D, Emanuele M, Major MB, Weissman BE, Kuwahara Y. SNF5/INI1 deficiency redefines chromatin remodeling complex composition during tumor development. *Mol Cancer Res.* 12:1574-85, 2014. 査読あり

[学会発表](計 6 件)

栗原康通. SMARCB1/INI1 の機能解析よりわかったラブドイド腫瘍の病態生理。

第6回小児がん学術セミナー .2015年9月19日 ; 京王プラザホテル、東京 .

Ouchi K, Kuwahara Y, Iehara T, Konishi E, Hosoi H. Loss of NOXA expression by INI1/SNF5 loss impaired sensitivity to chemotherapeutic agents in malignant rhabdoid tumor in vitro and in vivo. 2015 Apr 18-22 ; Philadelphia, PA , U.S.A .

Kuwahara Y, Iehara T, Hosoi H. Regulating SWI/SNF Subunit Levels by SNF5/INI1 In Malignant Rhabdoid Tumor . 第73回日本癌学会学術集会 . 2014年9月27日 ; パシフィコ横浜、横浜 .

Ouchi K, Kuwahara Y, Iehara T, Hosoi H. Loss of NOXA expression by INI1/SNF5 loss impaired sensitivity to chemotherapeutic agents in malignant rhabdoid tumor. 1st International rhabdoid tumor group meeting. 2013 Dec 12-14 ; Paris, France .

Kuwahara Y, Wei D, Song S, Cannon C, Sakellariou-Thompson D, Emanuele M, Hosoi H, Weissman BE. hSNH5/INI1 deficiency destabilizes the SWI/SNF complex during malignant rhabdoid tumor development. 1st International rhabdoid tumor group meeting. 2013 Dec 12-14 ; Paris, France .

Ouchi K, Kuwahara Y, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H. Function analysis of NOXA expression in malignant rhabdoid tumor . 第55回日本小児血液・がん学会学術集会 .2013年11月29日 ; ヒルトン福岡シーホーク、福岡 .

〔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 : 概要なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

栞原 康通 (KUWAHARA, Yasumichi )  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号 : 30590327

### (2)研究分担者

細井 創 (HOSOI, Hajime)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 20238744

家原 知子 (IEHARA, Tomoko)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 20285266

土屋 邦彦 (TSUCHIYA, Kunihiko)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・講  
師  
研究者番号：90381938