

Histone Deacetylase (HDAC) 阻害剤を利用した 効果的がん化学療法の開発

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 坂元 利彰

【目的】

「がん」は日本人の死因第一位の疾患であり、その患者数は増加の一途をたどっている。がんの治療薬としては、DNA 複製や細胞分裂をターゲットとした抗がん剤（**Cytotoxic 薬剤**）や、がん細胞で特徴的に機能亢進の認められるシグナル分子を標的とした分子標的薬（**Cytostatic 薬剤**）などがある。これらの薬剤のなかには極めて有効な治療効果を上げているものも多いが、一方、限界がある事も事実である。その要因としては、(1) **Cytotoxic** 抗がん剤が正常細胞にまで作用することで、時として重篤な副作用が現れる事、(2) 薬剤排泄機構の亢進（**Cytotoxic 薬剤**）やターゲット分子の遺伝子変異（分子標的薬）等によって生じる耐性化、がある。本研究では、このような問題を解決する手がかりを得るべく、従来の抗がん剤とは全く異なる作用点を持つ Histone deacetylase (HDAC) 阻害剤に注目した。HDAC 阻害剤は **Epigenetic** に作用する薬剤である。すなわち、HDAC 阻害剤はヒストンのアセチル化亢進を介して、クロマチン構造を弛緩させ、その結果として発現抑制された遺伝子の発現を促進させる薬剤であり、これが幾つかのがん細胞に対して抗腫瘍効果を示す事が報告されている。本研究では、HDAC 阻害剤を利用することで、がん細胞特異的に細胞死を誘導する、あるいは多剤耐性を克服できる可能性を検討した。

【実験方法】

HDAC 阻害剤を用いた効果的ながん化学療法の開発を目指し、具体的には、下記 3 項目に焦点をあてて解析した。

1. クロマチン構造に対して弛緩作用を持つ HDAC 阻害剤は、DNA の露出度を増大させることから、DNA をターゲットとする抗がん剤の作用増強剤として利用できる可能性がある。この点に注目し、まず DNA 傷害性薬剤に交差耐性を示すがん細胞株に対して、HDAC 阻害剤の併用でその耐性を克服できる可能性を検討した。
2. 分子標的薬 Gefitinib、Imatinib のターゲット分子、EGF 受容体 (EGFR)、あるいは Bcr-Abl に遺伝子増幅、変異などが生じると、がん細胞は上記薬剤に対して耐性を獲得する。また、EGFR、Bcr-Abl の下流で活性化される ERK-MAP キナーゼ経路は、Epigenetic な変異を誘導することで様々ながん抑制遺伝子のサイレンシングに関与する可能性が報告されている。そこで本研究では、ERK-MAP キナーゼ経路遮断剤 (MEK 阻害剤) と HDAC 阻害剤を併用する事で、上記薬剤耐性がん細胞株に対して、効果的な細胞死が誘導できる可能性を検討した。
3. 申請者が所属する研究室では、ERK-MAP キナーゼ経路の機能亢進が認められる多くのがん細胞株に対して、MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用が、極めて顕著な細胞死を誘導する事を見出している。本研究ではそれを発展させ、まず両薬剤併用による細胞死誘導増強の分子機構の解明を進めた。さらに、本薬剤併用が実際に有効ながん化学療法に繋がる可能性を、ERK-MAP キナーゼ経路の機能亢進が認められるがん細胞株を移植したヌードマウス (担がんモデルマウス系) を用いて、多角的に検討した。

【結果】

1. ヒト卵巣がん細胞株 OVCAR-8 は、他の卵巣がん細胞株と比べて、Cisplatin、さらに他の様々な DNA 傷害性薬剤 (Bleomycin、Mytomyacin-C、Etoposide など) に対して、著しい低感受性を示した。ここに、低濃度の HDAC 阻害剤 (HC-toxin) を併用すると、単剤では効果を示さない低濃度の Cisplatin、あるいは各 DNA 傷害性薬剤が、顕著な細胞死を誘導する事を見出した。このとき、DNA 損傷のマーカである Histone H2AX のリン酸化の亢進が、両薬剤併用時にのみ、顕著に認められた。これより、HDAC 阻害剤によってクロマチン構造が弛緩したことで、各薬剤が DNA を攻撃しやすくなる。その結果として、OVCAR-8 細胞に対する各 DNA 傷害性薬剤の感受性が増強される可能性を見出した (Fig. 1)。

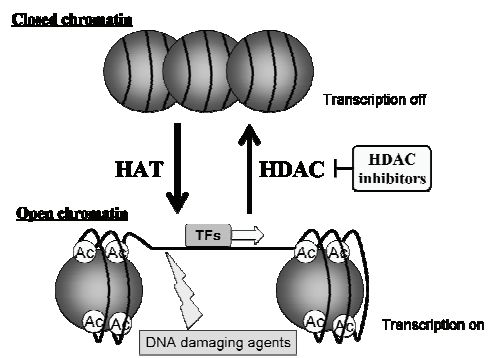


Fig.1.HDAC inhibitors-induced hyperacetylation of histones would be expected to increase chromatin accessibility to DNA damaging agents.

2. 活性型変異を生じた EGFR や Bcr-Abl を発現したがん細胞では、ERK-MAP キナーゼ経路が恒常的に活性化されている。なお、Gefitinib 耐性非小細胞肺癌細胞株 (H1650、II-18)、あるいは Imatinib 耐性白血病モデル細胞 (変異 Bcr-Abl 遺伝子を導入した BaF3) では、Gefitinib あるいは Imatinib 処理によって、ERK1/2 の活性化が抑制されない。また、これらのがん細胞株において、ERK-MAP キナーゼ経路を選択的に遮断 (MEK 阻害剤) すると、増殖は抑制されたが、それだけでは有意な細胞死の誘導には至らなかった。ここに低濃度の HDAC 阻害剤を併用すると、極めて顕著な細胞死が誘導された。すなわち、Gefitinib あるいは Imatinib 耐性がん細胞株に対して、ERK-MAP キナーゼ経路の選択的遮断剤と HDAC 阻害剤の併用は、極めて有効ながん化学療法を提供する可能性を見出した。

3-1. ERK-MAP キナーゼ経路の恒常的活性化が認められる多くのがん細胞において、MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用は、極めて顕著な細胞死誘導効果を示す。このとき、抗酸化剤、N-Acetyl-L-cystein (NAC) を添加すると、上記細胞死が大幅に抑制された。これより、MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用による細胞死誘導においては、活性酸素種 (ROS) の蓄積が本質的な役割を果たす可能性が示唆された。次いで、この ROS 蓄積には、ミトコンドリアの膜透過性を亢進させる Bim と、アポトーシス誘導やレドックス制御に関わる転写因子 Forkhead box-O (FOXO) の誘導が関わっていることを見出した。すなわち、HDAC 阻害剤は Bim の転写を増大させ、さらに MEK 阻害剤が Bim の分解を抑制する (Bim は ERK によるリン酸化を契機として分解される)。また、MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用は FOXO の発現を誘導する。FOXO は Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) の発現誘導を介して、抗酸化酵素 Thioredoxin (Trx) の機能を抑制する。このように、ROS の産生と除去に関わる遺伝子の発現量を変化させることで、MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用が顕著な抗腫瘍効果を示す事を明らかにした (Fig. 2)。

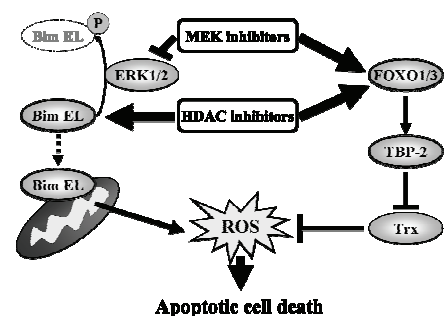


Fig.2. A proposal mechanism for the enhanced apoptotic cell death induced by the combination of MEK inhibitors

3-2. ERK-MAP キナーゼ経路の恒常的活性化の認められるがん細胞株 HT-29 及び H1650 (Gefitinib 耐性) をヌードマウスに移植した担癌モデルマウスを作成し、MEK 阻害剤 (PD184352、AZD6244)、及び HDAC 阻害剤 (MS-275) を各単独、あるいは併用投与した際、腫瘍の増殖がどのように影響されるかを経時的に解析した。その結果、MEK 阻害剤単独では腫瘍増殖が有意に抑制されなかったが、低濃度の HDAC 阻害剤を併用することで、それは極めて顕著に抑制される事を見出した (Fig. 3)。このとき、体重減少、食欲減退などの副作用は認められなかった。なお、免疫組織化学的な解析より、両薬剤を併用処理した腫瘍組織において特徴的に、細胞増殖抑制効果の延長、顕著な酸化ストレスおよびアポトーシスの誘導を確認した。

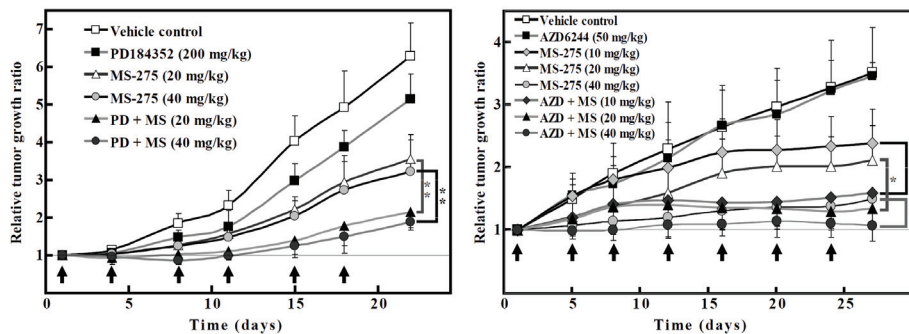


Fig.3. Potentiation of the therapeutic efficacy of MS-275 by MEK inhibitors in an HT-29 (left) and an H1650 (right) xenograft model.

【考察】

本研究において、(1) HDAC 阻害剤 (単独での細胞死誘導効果が軽微である低濃度領域) と併用する事で、単独では有意な細胞死を誘導しない低濃度の DNA 傷害性抗癌剤 (Cytotoxic 薬剤) が、極めて顕著な抗腫瘍効果を示す事を見出した。また、(2) 単独では有意な細胞死誘導効果を示さない MEK 阻害剤 (Cytostatic 薬剤) と、比較的 low 濃度の HDAC 阻害剤を併用する事で、極めて顕著な腫瘍増殖抑制効果が得られる事を、動物個体系において確認した。特記すべき点は、それぞれ単独での効果が低レベルであるにも関わらず、それらを組み合わせる事で、極めて顕著な抗腫瘍効果を認めた事で、これは副作用を軽減した効果的ながん化学療法の開発における最重要事項である。近年、世界初の経口 HDAC 阻害剤 Zolinza[®] がアメリカ FDA より承認され、がん治療の現場での活用が期待されている。本研究で明らかにした諸知見を基に、HDAC 阻害剤を基盤とし、様々な作用を持つ薬剤を組み合わせる事で、これまで治療困難とされていたがん症例に対しても有効な新規がん化学療法が開発されることを期待したい。

【基礎となった学術論文】

1. Ozaki K, Kishikawa F, Tanaka M, Sakamoto T, Tanimura S & Kohno M. Histone deacetylase inhibitors enhance the chemosensitivity of tumor cells with cross-resistance to a wide range of DNA-damaging drugs. *Cancer Sci.* **99**, 376-384 (2008)
2. Ozaki K, Kosugi M, Baba N, Fujio K, Sakamoto T, Kimura S, Tanimura S & Kohno M. Blockade of the ERK or PI3K-Akt signaling pathway enhances the cytotoxicity of histone deacetylase inhibitors in tumor cells resistant to gefitinib or imatinib. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1610-1615 (2010)
3. Sakamoto T, Ozaki K, Fujio K, Kajikawa S, Uesato S, Watanabe K, Tanimura S, Koji T & Kohno M. Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway enhances the therapeutic efficacy of histone deacetylase inhibitors in human tumor xenograft models. *Manuscript in preparation.*