

論 文 要 旨

The histone deacetylase inhibitor LBH589 inhibits undifferentiated pleomorphic sarcoma growth via downregulation of FOS-like antigen 1

〔 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である LBH589 は FOSL1 の発現低下を介して
未分化多形肉腫細胞に抗腫瘍効果をもたらす 〕

【序論及び目的】

未分化多形肉腫(undifferentiated pleomorphic sarcoma; UPS)は 50 歳代以降に好発する悪性軟部腫瘍であり、治療は外科的切除と補助的な放射線療法が原則とされる。標準的な化学療法は確立されておらず、切除不能例や転移例は治療困難となるため新たな化学療法薬剤の開発が望まれる。近年腫瘍の発生、進行に遺伝子配列の変異を伴わないエピジェネティック変異が関与していることが明らかになってきている。HDACs (histone deacetylases) はヒストンの脱アセチル化を介してエピジェネティックに遺伝子発現を制御している。HDAC 阻害剤は細胞周期の停止、apoptosis の誘導を引き起こすことにより抗腫瘍活性を示すと報告されているが詳細な作用機序は不明な点も多い。今回我々は UPS に対し HDAC 阻害剤である LBH589 の抗腫瘍効果及びその作用メカニズムを検討したので報告する。

【方法及び結果】

未分化多形肉腫由来の 4 種の細胞株 (GBS-1, TNMY-1, Nara-F, Nara-H) を使用した。全ての細胞株において class1 HDACs (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8) の発現上昇を認め、患者臨床検体でも同様の結果であった。WST assay において LBH589 は濃度・時間依存性に細胞増殖を抑制し、IC50 は 6-13nM と高い有効性を示した。FACS による細胞周期解析では LBH589 処理により G2/M 細胞群の増加を認め、LBH589 が G2 細胞周期停止を引き起こすことが示された。細胞周期関連タンパク質のうち、G2 期の進行を制御する CDK1 及びその活性化型であるリン酸化 CDK1 は LBH589 処理により低下し、これが G2 細胞周期停止に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、Annexin 5/ 7-AAD 二重染色後の FACS 解析では、LBH589 処理により early apoptosis 及び late apoptosis 細胞ともに増加することが確認された。LBH589 はアポトーシス関連タンパク質のうち抗アポトーシス Bcl-2 ファミリーである Bcl-2、Bcl-xL の低下させた一方でアポトーシス促進性の Bcl-2 ファミリーである Bak、Bim、Bad を増加させた。Fas, TNFR, TRAIL 等外因性経路に関連するタンパク質の発現変動は認めなかったことから、LBH589 は主に内因系経路の活性化によるアポトーシスの誘導作用を持つことが示された。LBH589 の in vivo での抗腫瘍効果を評価するため、ヌードマウスに GBS-1 細胞を移植し腫瘍形成後より LBH589 (5mg/kg, 10mg/kg) 及びコントロール群 (DMSO) に割り付け週 3 回腹腔内投与を行った。LBH589 投与群ではコントロール群と比較し有意に細胞増殖抑制効果を認めたが、LBH589 5mg/kg 群と 10mg/kg 群では有意差を認めなかった。LBH589 により発現が変動する遺伝子を網羅的に解析する

目的で RNA microarray を行った。結果、LBH589 処理により FOS like-antigen 1 (FOSL1) の発現が減少し、すべての細胞株において RT-PCR 及び western blot でも同様の結果が確認された。siRNA を使用した FOSL1 のノックダウンでは細胞増殖能は優位に低下し、逆にレンチウイルスを使用した過剰発現実験ではわずかにではあるが細胞増殖能は増加した。以上より FOSL1 の発現減少は LBH589 の抗腫瘍メカニズムに関与している可能性が示唆された。一般的に HDAC 阻害剤は p21 の発現を上昇させることが知られており、本実験系においても LBH589 処理によりすべての細胞株で p53 非依存的に p21 が増加することが示された。FOSL1 の細胞周期関連タンパク質に対する影響を評価したところ、FOSL1 をノックダウンすることで p21 の発現上昇が生じることが確認された。

【結論及び考察】

LBH589 は多発性骨髄腫の治療に対し既に FDA の認可を受けた薬剤である。今回の検討では in vitro において LBH589 は UPS 細胞株に対して多発性骨髄腫の細胞株と比較して遜色ない抗腫瘍効果を呈した。これらの結果は薬物治療抵抗性の腫瘍である UPS の治療に際し、LBH589 は有用な治療薬剤となる可能性があることを示す。

HDAC 阻害剤は 5-20%の遺伝子を発現上昇及び発現低下させることが知られており、その作用機序は複雑な遺伝子・パスウェイが関与しているものと考えられる。今回我々が着目した FOSL1 は JUN ファミリーと二量体化し転写因子 AP-1 を形成する oncogene であり、その高値は KRAS 変異を有する肺癌や前立腺癌において予後不良因子となると報告されている。LBH589 処理により FOSL1 の down regulation を生じ、これが HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果に部分的に寄与していることが示唆された。

HDAC 阻害剤は p21 のプロモーター領域の Sp1 結合領域を介して発現上昇させることが知られている。さらに FOSL1 は Sp1 結合部位に結合することでその働きを負に制御するとの報告があり、これが FOSL1 の p21 発現をコントロールするメカニズムではないかと考えており、今後検討を行う。

(Molecular Carcinogenesis, 2018, IN PRESS)