

## 論文内容の要旨

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 depsipeptide によるヒト大腸癌細胞株に対する 5-fluorouracil (5-FU) の効果増強に資する基盤的研究

(岡田浩司)

## I. 研究目的

大腸癌の部位別がん死亡数は世界第4位、国内では第2位となっており、死亡数および罹患数はなお増加傾向にある。5-フルオロウラシル (5-FU) を中心とした殺細胞性抗癌剤と血管新生阻害剤、上皮成長因子受容体阻害剤のような分子標的薬剤の併用レジメンの開発により大腸癌治療の成績は大きく向上したものの、薬剤耐性などにより病勢制御が不良となる場合も多い。そのような中、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤のようなエピジェネティクス機構に作用する薬剤と既存の抗がん剤の併用による相乗的あるいは相加的な抗悪性腫瘍効果の増強は、次世代の治療法として注目されている。本研究では大腸癌細胞株を用いて HDAC 阻害剤である depsipeptide と 5-FU の併用による抗腫瘍効果を検証し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## II. 研究対象ならびに方法

大腸癌細胞株 HCT-116, HT29, および SW48 を用いてコロニー形成アッセイ, クリスタルバイオレットアッセイにより 5-FU と depsipeptide 併用によるコロニー形成阻害能および細胞増殖阻害能について評価した。また, Combination Index (CI) および Dose Reduction Index (DRI) の算出により併用効果を評価した。さらに, HCT-116 における 5-FU (1.75 $\mu$ M) と depsipeptide (1nM) 併用の HDAC 活性および Caspase3/7 活性測定, リアルタイム PCR およびマイクロアレイによる遺伝子発現変動解析, PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) システムを用いた遺伝子オンロジー解析を行った。

## III. 研究結果

・HDAC 阻害剤 depsipeptide の併用は, ヒト大腸癌細胞 HCT-116, HT-29 および SW48 に対する 5-FU の感受性を増強させることがはじめて示された。

・CIは50%阻害レベルで1.19~1.43, 90%阻害レベルで0.97~1.12であり, 概ね相加的効果の評価となった。また, 5-FUのDRIは50%阻害レベルで1.39~2.49, 90%阻害レベルで3.99~8.20であり, depsipeptideは5-FUの用量を低下させるのに好ましい併用であることが示された。

・HCT-116においてdepsipeptide(1nM)の1時間処理でHDAC活性は約3分の2に低下した。5-FU(1.75 $\mu$ M)とdepsipeptide(1nM)併用処理のHDAC活性低下はdepsipeptide(1nM)単剤と同等であった。

・5-FU(1.75 $\mu$ M)とdepsipeptide(1nM)を24および48時間作用させたところ, 両剤併用でcaspase-3/7活性はコントロールに比べ3~4倍, 5-FU単独に比べ2~4倍程度上昇した。

・HCT-116において7日間の5-FU(1.75 $\mu$ M)とdepsipeptide(1nM)併用処理, p21発現上昇, TYMS発現低下が観察された。

・5-FU(1.75 $\mu$ M)とdepsipeptide(1nM)を7日間作用させたところ, マイクロアレイ解析および遺伝子オントロジー解析により両剤併用でantigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via major histocompatibility complex (MHC) class (G0:0002504) および MHC protein complex (G0:0042611)の有意な上昇が示された。

・5-FU(1.75 $\mu$ M)とdepsipeptide(1nM)を7日間作用させたところ, リアルタイムPCRにより両剤併用でMHC class IIの遺伝子発現レベル3~8.5倍上昇が示された。一方, MHC class Iの遺伝子発現レベルに変動は見られなかった。

・マイクロアレイ解析よりMHC class II遺伝子の発現調節を行っていると思われるヒストンアセチル化酵素であるPCAF(P300/CBP-associated factor), およびCIITA(Class II major histocompatibility complex transactivator)の遺伝子発現レベルが5-FUとdepsipeptideの併用により約3倍上昇することが示された。

#### IV. 結 語

本研究により5-FUとdepsipeptideの併用によるHCT-116の増殖阻害には, DNAダメージとHDAC活性低下作用の共調によるTP53経路の活性化, MHCクラスII遺伝子とp21共通の制御因子であるヒストンアセチルトランスフェラーゼであるPCAFの発現上昇が関与している可能性を示した。MHCクラスII遺伝子高発現は, がんの制御に重要な意味をもつことという報告もあることから, 本研究で観察されたMHCクラスII遺伝子の発現レベルは, 大腸がんの抗がん剤治療による細胞増殖抑制のマーカーとしての活用が期待できる。

大腸がんに対する5-FU治療におけるdepsipeptideによるエピジェネティックな遺伝子発現調節は5-FUの作用増強に対して有効である。MHCクラスII遺伝子の発現上昇機序の解明は5-FU効果予測因子を探索する上でも新たな研究課題として意義があると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨（博士課程）

### 審査担当者

主査 教授 那谷耕司（臨床医化学講座）

副査 教授 大橋綾子（生体防御学講座）

副査 准教授 西谷直之（情報薬科学講座）

### 論文審査の結果の要旨

本学位論文は、抗がん剤 5-フルオロウラシル(5-FU)と HDAC 阻害薬デプシペプチド (Dep) 併用による新しいがん薬物治療に向けた基礎的研究として、5-FU と Dep を大腸がん細胞株に併用投与により 5-FU の増殖阻害効果が増強されることを初めて示したものである。本学位論文は、主論文 (Okada *et al.* Oncology Reports, 2016) で報告された内容が中心となっている。具体的には、Dep が臨床血中濃度の 1/700 の濃度で 5-FU の増殖抑制作用の増強を示すことを明らかにし、この増殖抑制は caspase-3/7 活性の上昇を伴うアポトーシスの誘導によると考察している。また、マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングにより、Dep + 5-FU 併用処理細胞では MHC classII 遺伝子などの発現変動を観察しており、これらのアポトーシス誘導や増殖抑制への関与について考察している。

本学位論文の研究内容は、臨床薬剤師としてがん薬物療法の改良を模索する学位申請者が、薬剤の併用による効果的ながん薬物療法を追求する上で基盤となるものであり、審査担当者による協議の結果、6 年制薬学教育に続く大学院博士課程教育として望まれるテーマ設定と研究成果であることが十分に評価できるとの結論になった。しかしながら、審査担当者により論文全体にわたって改訂が必要となる箇所を指摘されたため、指摘箇所を修正後、審査担当者が適切に修正されていることを確認した。

### 試験・試問の結果の要旨

発表後の質疑応答での態度は良好で、質問にはその意図を的確に捉えて事実を誠実に答えていたが、発表内容については学位論文と同様に改訂すべき点が認められた。そのため、指摘箇所を修正後改めて審査担当者の前で発表を行い、適切な発表内容となっていることを確認した。