

学位論文

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

岩手医科大学薬学研究科

岡田浩司

2017

目 次

略語表	1
第 1 章 序論	3
第 2 章 HDAC 阻害剤 depsipeptide と 5-FU の併用効果とマイクロアレイによる網羅的 遺伝子解析および遺伝子オンロジー解析を用いた分子遺伝学的検討	
1. 緒 言	8
2. 材料および方法	8
3. 結 果	13
4. 考 察	26
5. 小 括	31
第 3 章 HDAC 阻害剤 depsipeptide 併用による 5-FU の効果増強に関連する周辺事象の 検討	
1. 緒 言	32
2. 材料および方法	33
3. 結 果	34
4. 考 察	36
5. 小 括	37
第 4 章 総合考察および結論	38
謝辞	40
引用文献	41

略語表

略語	英語表記	日本語表記
5-FU	5-fluorouracil	5-フルオロウラシル
ACTB	beta-actin	ベータアクチン
ADP	adenosine diphosphate ribose	アデノシン二リン酸
ANOVA	analysis of variance	分散分析
Api	apicidin	アピシジン
ATCC	American type culture collection	アメリカンタイプカルチャー コレクション
BC	bacitracin	バシトラシン
BCL2	B-cell lymphoma 2	B細胞リンパ腫 2
CBP	CREB-binding protein	CREB 結合タンパク
CDKN1A	cyclin dependent kinase inhibitor 1A	サイクリン依存性キナーゼ阻 害因子 1A
cDNA	complementary DNA	相補的 DNA
CI	combination index	併用係数
CIITA	class II major histocompatibility complex transactivator	主要組織適合遺伝子複合体ク ラス II トランス活性化因子
CREB	cAMP response element binding protein	cAMP 応答配列結合タンパク
CTCL	cutaneous T-cell lymphoma	皮膚 T 細胞リンパ腫
CyA	cyclosporine A	シクロスポリン A
Dep	depsipeptide	デプシペプチド
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	ダルベッコ改変イーグル培地
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
DNMT	DNA methyltransferase	DNA メチル基転移酵素
DRI	dose reduction index	減量係数
dTMP	deoxythymidine monophosphate	デオキシチミジン一リン酸
dUMP	deoxyuridine monophosphate	デオキシウリジン一リン酸
Fa	fraction affected	作用分画
FDA	food and drug administration	アメリカ食品医薬品局
FdUMP	5-fluoro deoxyuridine monophosphate	フルオロデオキシウリジン一 リン酸

略語	英語表記	日本語表記
HAT	histone acetyltransferase	ヒストンアセチル基転移酵素
HDAC	histone deacetylase	ヒストン脱アセチル化酵素
HLA	human leukocyte antigen	ヒト白血球抗原
IC ₅₀	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IARC	International Agency for Research on Cancer	国際がん研究機関
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes	京都遺伝子ゲノム百科事典
MHC	major histocompatibility complex	主要組織適合遺伝子複合体
mRNA	messenger RNA	伝令 RNA
OXM	oxamflatin	オキサムフラチン
PANTHER	Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships	
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PCAF	P300/CBP-associated factor	P300 / CBP 関連因子
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	増殖細胞核抗原
PTCL	peripheral T-cell lymphoma	末梢性 T 細胞リンパ腫
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction	定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
RLU	relative light unit	相対光単位
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
SEM	standard error of the mean	標準誤差
TS	thymidylate synthase	チミジル酸合成酵素
TSA	trichostatin A	トリコスタチン A
TYMS	thymidylate synthase (coding gene)	チミジル酸合成酵素 (コード遺伝子)
UMP	uridine monophosphate	ウリジナーリン酸

第1章 序論

国際がん研究機関（IARC）は、大腸がんは世界で3番目に多く診断されたがんであり、がん関連死亡原因の第4位であることを報告している。国内でも患者は増加傾向にあり2016年に報告されたがんの統計‘15によると2014年のがん種別死亡数の第2位、2012年のがん種別罹患数第1位となっており¹⁾、臨床においても重要ながん種のひとつである。近年、薬剤の組み合わせ、投与プロトコルおよび分子標的薬の開発により大腸がん化学療法の結果は大きく向上したが、現在でもピリミジン系代謝拮抗剤である5-fluorouracil（5-FU）は、大腸がん治療において最も重要な化学療法剤である（図1）。

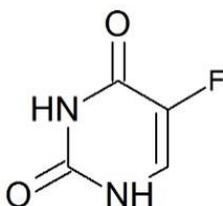


図1. 5-fluorouracil (5-FU) の構造

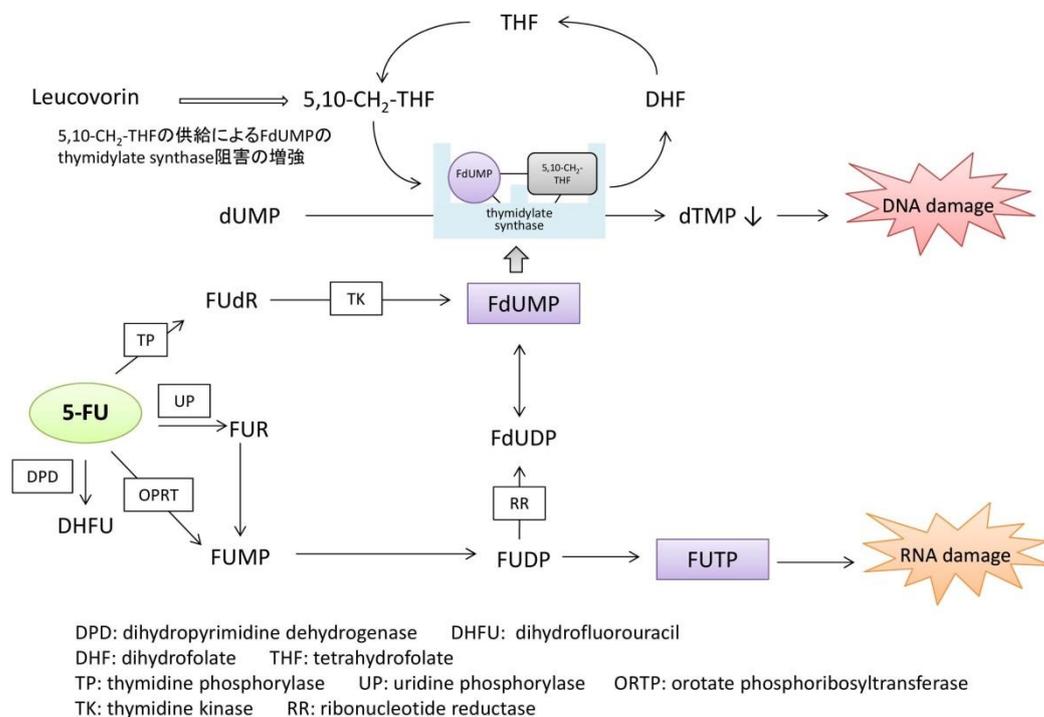
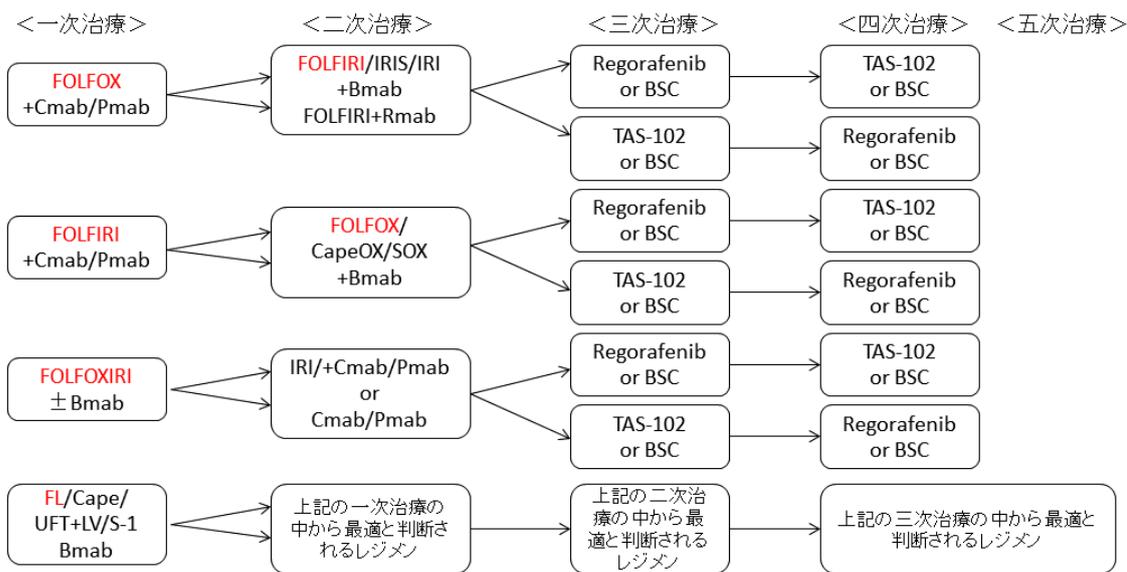


図2. 5-FU の作用機序（5-FU®注インタビューフォームより引用）

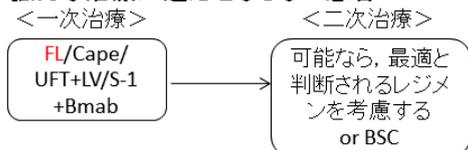
5-FU の抗腫瘍効果は主としてチミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase : TS) の不活化を引き起こすことによる DNA 合成阻害に基づくと考えられています。腫瘍細胞内に取り込まれた 5-FU はウラシルと同じ経路で 5-fluoro-deoxy UMP (FdUMP) に転換される。FdUMP は deoxy UMP (dUMP) と拮抗してチミジル酸の合成を抑制することにより、DNA 合成が阻害されると考えられている。FdUMP は TS、活性型葉酸

(5,10-methylene-tetra- hydrofolate : 5,10-CH₂-THF) と共有結合三重複合体 (covalent ternary complex) を形成する。即ち、FdUMP の 5 位の炭素に co-factor である活性型葉酸のメチレン基が結合し、FdUMP の 6 位の炭素に TS の求核基が結合する。dUMP も同様に共有結合三重複合体を中間体として形成するが、5 位の炭素がメチル化されて deoxy thymidine monophosphate (dTMP) を生じ反応は完結する。しかし、FdUMP の三重複合体ではこの反応が完了せず TS は不活性化され、その結果 dTMP が不足して DNA 合成が阻害されると考えられている。他方、5-FU はウラシルと同じ経路を経て RNA に組み込まれて fluoro-RNA を生成することや、リボゾーム RNA の形成を阻害することも知られており、これらのことも本剤の抗腫瘍効果発現に関与すると考えられている。(図 2)

強力な治療が適応となる患者



強力な治療が適応とならない患者



FOLFOX: folic acid+ 5-FU+ oxaliplatin
 FOLFIRI: folic acid+ 5-FU+ irinotecan
 FOLFOXIRI: folic acid+ 5-FU+ oxaliplatin+ irinotecan
 FL: 5-FU+ /Leucovorin
 Cape: capecitabine
 UFT: tegafur/uracil
 S-1: tegafur/gimeracil/oteracil
 IRI: irinotecan
 IRIS: irinotecan+S-1
 SOX: S-1+ oxaliplatin

B-mab: bevacizumab
 C-mab: cetuximab
 P-mab: panitumumab
 R-mab: ramucicab
 LV: leucovorin
 TAS-102: trifluridine/
 tipiracil
 BSC: best supportive
 care

図 3. 切除不能進行再発大腸がんに対する化学療法のアプローチ (日本大腸癌研究会 大腸がん治療ガイドライン医師用 2016 より引用 赤字は 5-FU 含有レジメン)

がん化学療法ではいくつかの例外を除き、単剤による化学療法の効果は限られているため、最大の治療効果をあげる目的で多剤併用化学療法が実施される。併用化学療法の目的としては、①複数の薬剤を用いることによる効果の増強 ②がん細胞の多様性に対して抗がん作用のスペクトラムを広げる ③耐性細胞の出現を予防または遅延させる点があげられる。そして、その実施には①標的腫瘍に対して単剤でも効果が確立している ②作用機序の異なる薬剤を使用する ③毒性が重複しない薬剤を使用することが基本原則とされている³⁾。5-FUは現在臨床で繁用されているオキサリプラチンを添加した FOLFOX レジメン、イリノテカンを添加した FOLFIRI レジメンにおける中心的な薬剤であり、これらの併用化学療法は、奏効率、無増悪生存および全生存の有意な改善をもたらした^{4,5)}、国内でも標準治療となっている。(図 3)

ヒストンアセチル化および脱アセチル化は、クロマチン構造の修飾を調節する生物学的プロセスであり、遺伝子発現調節に重要である。近年、DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) 阻害剤およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤など、エピジェネティクスをターゲットとしたいくつかの抗がん剤が開発されている。DNMT 阻害剤、HDAC 阻害剤は、DNA 脱メチル化および抑制性複合体の分解を引き起こすとされている。これは、エピジェネティック変化の逆転による、がん抑制遺伝子の再活性化、免疫調節機構、細胞シグナル伝達経路、アポトーシスなどを含む複数の細胞プロセスのリセット (正常化) を

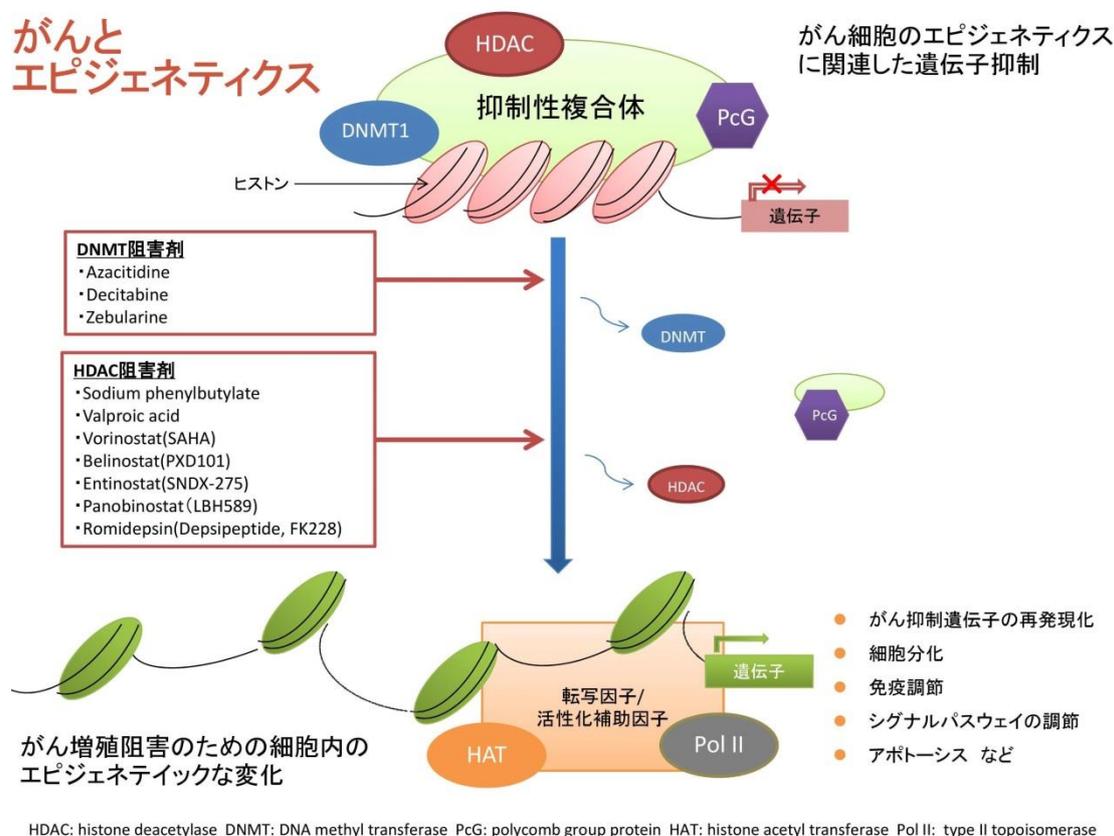


図 4. エピジェネティクス薬剤の抗がんメカニズム (Cell Research 21: 502–517, 2011)より引用)

とおしたがん細胞増殖抑制につながると報告されている^{6,7)}。例えば、p53 および Bcl-2 のようなアポトーシス促進分子および抗アポトーシス分子の過剰発現または発現抑制を様々な HDAC 阻害剤によって調節することができると報告されている⁸⁾。azacitidine や zebularine のような DNMT 阻害剤は、様々ながん種および前がん病態について臨床試験が実施され⁹⁾、骨髄異形成症候群に対し臨床応用されている。また、HDAC 阻害剤は、アポトーシス、細胞周期進行の遅延、がん細胞分化、抗がん剤抵抗性解除を含む効果を発揮することが知られており¹⁰⁻¹³⁾、多数の HDAC 阻害剤の臨床応用が研究されている。現在アメリカ食品医薬品局 (FDA) では vorinostat, entinostat, panobinostat, belinostat および depsipeptide が皮膚 T 細胞リンパ腫 (CTCL) などの悪性リンパ腫で承認され臨床で使用されている¹⁴⁾。(図 4)

depsipeptide (Dep, FR901228, FK228, Romidepsin, Istodax[®]) は、*Chromobacterium violaceum* 株 WB968 から単離された非システインジスルフィド架橋を有する独特の環状ペプチドである。(図 5)

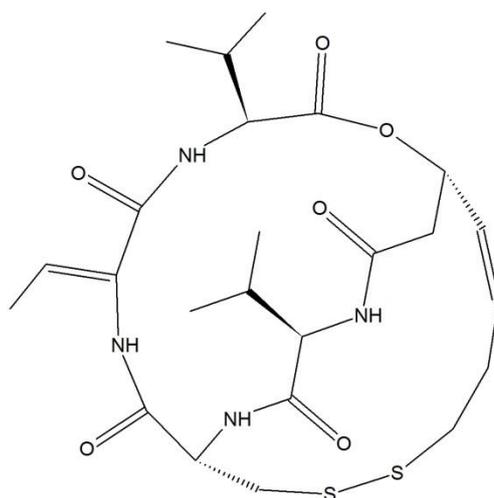


図 5. depsipeptide の構造

本薬は、プロドラッグとして作用し、構造中のジスルフィド結合は細胞内で還元され、亜鉛に結合するチオール基が生じる。このチオール基は亜鉛依存性ヒストン脱アセチル化酵素の結合ポケット中の亜鉛原子と可逆的に相互作用し、その活性を妨げる^{15,16)}。多くの HDAC 阻害剤と同様に、がん抑制遺伝子の正常な発現を回復させ、細胞周期の停止、分化、アポトーシスをもたらすことによって、抗がん作用を示すとされている¹⁷⁾。

一方、HDAC 阻害剤と既存の抗がん剤、または DNMT 阻害剤の相乗的、相加的併用効果については多くの基礎研究が報告されている¹⁸⁻²¹⁾。大腸癌細胞に対しては HDAC 阻害剤と 5-FU の組み合わせによる、相乗的または相加的な効果についても多くの基礎的研究の報告がある。Lee らは、トリコスタチン A (TSA) が大腸癌細胞において TYMS の mRNA および TS タンパクの両方の発現を下方制御することにより 5-FU の細胞傷害性を増強するこ

とを報告している²²⁾。Tumberらは、*in vitro* および *in vivo* で belinostat と 5-FU の併用により DNA 断片化，ポリ ADP-リボースポリメラーゼ切断，および TYMS のダウンレギュレーションをもって相乗的に作用することを報告している²³⁾。Di Gennaroらは、vorinostat による TYMS および p53 発現の調節が、5-FU または raltitrexed との組み合わせで相乗的抗腫瘍効果をもたらすことを見出している²⁴⁾。Fazzoneらは、panobinostat が大腸癌細胞において TYMS 遺伝子発現を抑制し、フルオロピリミジンと相乗作用することを報告している²⁵⁾。

大腸がん治療においては前述の化学療法の進歩にもかかわらず、薬剤耐性などにより病勢進行となるケースも多い。さらに、進行大腸がん患者においては、これらの化学療法では十分に病勢コントロールできないことも少なくない。既存の抗がん剤とエピジェネティクス治療剤の併用療法の確立はこのような状況を改善する有望な治療法として注目されている。大腸癌細胞に対する 5-FU と Dep の併用効果については報告がなく、メカニズムについても不明である。本研究では、ヒト大腸癌細胞株を用いて 5-FU と Dep の併用効果、マイクロアレイ分析を用いた細胞ベースモデルにおける薬物 - 薬物相互作用の遺伝子発現変動の検討、および関連メカニズムの解明を目的とした。

第2章 HDAC阻害剤 depsiptide と 5-FU の併用効果およびメカニズムに関する検討

1. 緒言

序論で述べたとおり，既存の抗がん剤とエピジェネティクス治療剤の併用療法の確立は薬剤耐性や標準治療の無効例といった状況を改善する有望な治療法として注目されている。大腸癌細胞に対する depsiptide (Dep) の抗腫瘍効果についての報告はこれまでも散見されるが，他の抗がん剤との併用による効果およびメカニズムについては報告がない。Dep 単剤による抗腫瘍活性については様々ながん種の細胞株において報告されており，抗がん剤併用による効果も期待できると考えられる。

本章では，ヒト大腸癌細胞株を用いて 5-FU と Dep の併用効果，マイクロアレイ分析を用いた細胞ベースモデルにおける薬物 - 薬物相互作用の遺伝子発現変動の検討を行った。

2. 材料および方法

2-1 細胞培養および試薬

ヒト大腸癌細胞株 HCT-116 (no. CCL-247), HT-29 (no. HTB-38) および SW48 (no. CCL-231) [すべてアメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC), Manassas, VA, USA] を，10% ウシ胎児血清 (HyClone, South Logan, VT, USA) および 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) を添加したダルベッコ修飾イーグル培地 (DMEM; 4.5g/L D-グルコース; Gibco, Grand Island, NY, USA) にて，37°C，5% CO₂ インキュベーター内で培養，継代した。depsiptide は Selleck Chemicals LLC (Houston, TX, USA) から，5-FU は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した。使用された他のすべての試薬は，入手可能な高純度のものを使用した。

2-2 薬剤曝露

HCT-116 ではコロニー形成阻害アッセイおよび遺伝子発現解析において溶媒 (DMSO) 単独，5-FU 単独，Dep 単独および 5-FU と Dep の併用を 7 日間作用させた。コロニー形成阻害アッセイで用いた 5-FU の濃度は 0.875, 1.25, 1.75 および 2.5 μ M，Dep の濃度は 0.5, 1, 1.5 および 2nM であった。5-FU と Dep の併用では 5-FU (0.875 μ M) + Dep (1nM)，5-FU (1.25 μ M) + Dep (1nM)，5-FU (1.75 μ M) + Dep (1nM) とした。HDAC 活性アッセイでは 5-FU 単剤 0.11, 0.44, 1.75, 7, 28 μ M，Dep 単剤 0.06, 0.25, 1, 4, 16nM，

TSA 単剤 (ポジティブコントロールとして) 0.31, 1.25, 5, 20, 80 μ M を, および 5-FU (1.75 μ M) + Dep (1nM) 併用を作用させた. Caspase-3/7 活性アッセイおよび遺伝子発現解析では 5-FU (1.75 μ M), Dep (1nM), および 5-FU (1.75 μ M) +Dep (1nM) を用いた. コロニー形成阻害アッセイを用いた薬剤併用評価では Combination_A として Concentration ratio 5-FU:Dep = 1.25 μ M:1nM (5-FU:1.25 μ M + Dep:1nM, 5-FU:1.75 μ M + Dep:1.4nM, 5-FU:2.5 μ M + Dep:2nM), Combination_B として Concentration ratio 5-FU : Dep = 1.75 μ M : 1nM (5-FU:1.25 μ M + Dep:0.7nM, 5-FU:1.75 μ M + Dep:1nM, 5-FU:2.5 μ M + Dep:1.4nM), Combination_C として Concentration ratio 5-FU : Dep = 2.5 μ M : 1nM (5-FU:1.25 μ M + Dep:0.5nM, 5-FU:1.75 μ M + Dep:0.7nM, 5-FU:2.5 μ M + Dep:1nM)を作用させた. 5-FU 単独高濃度処理による遺伝子発現解析では 2.5, 3.5, および 5 μ M を用いた.

HT-29 ではコロニー形成阻害アッセイにおいて溶媒 (DMSO) 単独, 5-FU 単独, Dep 単独および 5-FU と Dep の併用を 10 日間作用させた. 5-FU の濃度は 0.313, 0.438, 0.625 および 0.875 μ M, Dep の濃度は 0.125, 0.25, 0.375 および 0.5nM とした. 5-FU と Dep の併用では 5-FU (0.313 μ M) +Dep (0.375nM), 5-FU (0.438 μ M) +Dep (0.375nM), 5-FU (0.625 μ M) +Dep (0.375nM) とした. 遺伝子発現解析では 5-FU (0.625 μ M), Dep (0.375nM), および 5-FU (0.625 μ M) +Dep (0.375nM) を用いた.

SW48 ではクリスタルバイオレットアッセイにおいて溶媒 (DMSO) 単独, 5-FU 単独, Dep 単独および 5-FU と Dep の併用を 7 日間作用させた. 5-FU の濃度は 0.438, 0.625, 0.875 および 1.75 μ M, Dep の濃度は 0.125, 0.25, 0.375 および 0.5nM とした. 5-FU と Dep の併用では 5-FU (0.438 μ M) +Dep (0.2nM), 5-FU (0.625 μ M) +Dep (0.2nM), 5-FU (0.875 μ M) +Dep (0.2nM) とした. 遺伝子発現解析では 5-FU (0.875 μ M), Dep (0.2nM), および 5-FU (0.875 μ M) +Dep (0.2nM) を用いた.

2-3 コロニー形成アッセイ

HCT-116 はトリプシン処理後計数し, 20,000 細胞/60-mm ディッシュでコロニー形成アッセイのために播種した. HT-29 はトリプシン処理後, 計数し 10,000 細胞/60-mm ディッシュでコロニー形成アッセイのために播種した. 7~10 日間のインキュベーション後, コロニーをクリスタルバイオレットで染色し, 陽性コロニーの数を数えた. 50 個を超える細胞を含むコロニーを陽性とみなして計数し, 各アッセイをトリPLICATEで別日に 3 回実施した.

2-4 クリスタルバイオレットアッセイ

SW48 はコロニー形成能力が低いため, クリスタルバイオレットアッセイ²⁶⁾を用いて細

胞を直接染色することにより細胞生存率を測定した。SW48 細胞をトリプシン処理した後計数し、6 ウェルプレートに 50,000 細胞/ウェルで播種した。7 日間のインキュベーション後、培地を除去し、接着細胞を 10%ホルムアルデヒド (in PBS) でプレートに固定した。次いで、細胞を 0.5%クリスタルバイオレット水溶液で染色し、33%酢酸水溶液で色素を溶出させた。マイクロプレートリーダー Infinite F500 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) を用いて 550nm での吸光度を測定した。各アッセイはトリプレケートで別日に 3 回実施した。

2-5 Combination Index(CI)および Dose Reduction Index (DRI)の算出

CI は Ting-Chao Chou らが報告²⁷⁾した Median Effect 法にもとづいて複数薬物の用量と効果 (dose-effect) を計算することにより、薬剤の併用効果を客観的に評価する指標である。CI <0.9 は相乗的、CI=0.9-1.1 は相加的、CI >1.1 は拮抗的併用効果とされている。また、DRI は、CI 理論を応用した指標で、各薬剤単独の用量と比較してそれぞれの効果レベルで、各薬剤の用量をどれくらい減少させることができるかの尺度である。DRI >1 は Favorable Dose Reduction、DRI <1 は Unfavorable Dose Reduction とされている。5-FU の IC₅₀ 付近濃度を基準として、Dep を一定の濃度比で添加し、HCT-116 を用いてコロニー形成アッセイを行い Ting-Chao Chou らが開発した Compu Syn ソフトを用いて CI、DRI の算出を行った。

2-6 HDAC 活性測定

HDAC 活性測定を、製造者の指示書 (HDAC-Glo™ I/II Assay ; Promega, Madison, WI, USA) に従って実施した。HCT-116 を白壁の 96 ウェルプレート (4,000 細胞/ウェル) の各ウェルに播種し、処理薬剤を添加し 1 時間インキュベートした。HDAC-Glo™ 試薬を添加し 30 分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー Infinite F500 (Tecan Group Ltd.) を用いて HDAC の酵素活性を測定した。細胞培養およびアッセイ試薬に関連するバックグラウンド (ブランク反応) を実験値から差し引いた。4 レプリケートの平均値を用いて HDAC 活性を表した。データは測定値のまま輝度 (luminescence) として示した。

2-7 カスパーゼ 3/7 活性測定

発光カスパーゼ-3/7 活性化アッセイを、製造者の指示書 (Caspase-Glo™ 3/7 assay ; Promega, Madison, WI, USA) に従って実施した。HCT-116 を白壁の 96 ウェルプレート (4,000 細胞/ウェル) の各ウェルに播種し、処理試薬を添加し、0、24 および 48 時間インキュベートした。Caspase-Glo™ 試薬で 1 時間インキュベートした後、マイクロプレー

トリーダー-Infinite F500 (Tecan Group Ltd.) を用いてカスパーゼ-3/7 の酵素活性を測定した。細胞培養およびアッセイ試薬に関連するバックグラウンド (ブランク反応) を実験値から差し引いた。4レプリケートの平均値を用いてカスパーゼ-3/7 活性を表した。データを細胞タンパク質含有量でノーマライズするために、ローリーアッセイ²⁸⁾を製造者の指示書 (Protein Assay Lowry kit ; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) に従って実施した。データはタンパク質の相対発光量 (RLU) / μg として示した。

2-8 RNA 抽出および定量的リアルタイム PCR

3つの独立した HCT-116 培養物から RNeasy Mini キット (Qiagen, Dusseldorf, Germany) を使用し、トータル RNA を抽出し、 $1 \mu\text{g}$ を cDNA synthesis kit (Roche, Basel, Switzerland) に使用した。1本鎖 cDNA を用いて、7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を用いてリアルタイム PCR を実施した。増幅プライマーの配列を表 1. に示す。

表 1. 定量的リアルタイム PCR において mRNA レベル測定に使用したオリゴヌクレオチドプライマーの配列

Accession number	Gene symbol	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
NM_001101	ACTB	GGCACACACCTTCTACAATGAG	GGATAGCACAGCCTGGATAGCA
NM_001188	BAK1	TGAAAAATGGCTTCGGGGCAAGGC	TCATGATTTGAAGAATCTTCGTACCA
NM_138763	BAX	GGCCCACCAGCTCTGAGCAGA	GCCACGTGGGCGTCCCAAAGT
NM_000633	BCL2	CGACTTCGCCGAGATGTCCAG	ACTTGTGGCCAGATAGGCACCCAG
NM_000389	CDKN1A (p21)	CAAGCTCTACCTTCCCACGG	GGTAGAAATCTGTCATGCTGGTC
NM_000077	CDKN2A (p16)	ATGGAGCCTTCGGCTGACT	ATCATCATGACCTGGATCGGC
NM_004964	HDAC1	GCTCCATCCGTCCAGATAAC	TGCCACAGAACCACCAGTAG
NM_002116	HLA-A	CAGCTTGTAAGTGTGAGACAGC	GGAAAGATGATTGGGGAGGGAG
NM_005514	HLA-B	GTAGGAGGAAGAGTTCAGGTGG	ACATTATGCTAACAGGGACGCA
NM_002117	HLA-C	CTGGTTGTCCTAGCTGTCCCTTG	AGCTGTCTCAGGCTTTACAAGTG
NM_002121	HLA-DPB1	TCCACCAACCTGATCCGTAATG	AGAATCAGACTGTGCCTTCCAC
NM_002123	HLA-DQB1	CAAAGGAGTCAGAAAGGGCTTC	GGGGATGAAAGGAGATGACCTG
NM_019111	HLA-DRA	CCGATCACCAATGTACCTCCAG	CAGGAAGGGGAGATAGTGGAAC
NM_002124	HLA-DRB1	CTCACAGTGAATGGAGAGCAC	GAATAACTGCCAAGCAGGAAAGC
NM_000546	TP53	GCTCAGATAGCGATGGTCTGG	GATGGTGGTACAGTCAGAGCC
NM_001071	TYMS	GTTGCTGTGGTTTATCAAGGGAT	TTGGTCAACTCCCTGTCCTG

2-9 マイクロアレイ解析

DNA マイクロアレイ分析のために、Low Input Quick Amp Labeling kit (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) を用いて、トータル RNA (50ng) をシアニン-3 で標識した。標識された標的を SurePrint G3 Human 8x60K oligo DNA microarray にハイブリダイズさせ、ハイブリダイゼーションされたマイクロアレイを Agilent Microarray Scanner (いずれも Agilent Technologies, Inc.から) を用いてスキャンした。画像解析および生アレイデータ生成は、Feature Extraction ソフトウェア (Agilent Technologies, Inc.) により処理した。GeneSpring ソフトウェアを使用し、生アレイデータのノーマライゼーションを行った。これらのマイクロアレイ解析に関わる工程は北海道システム・サイエンス株式会社 (札幌, 日本) に委託して行った。

2-10 遺伝子オントロジー解析

生データのノーマライゼーション後、データセットは Non Uniformity Outlier (ピクセルの不均一性)、Population Outlier (アレイ内のムラ)、および gIsWellAboveBG (バックグラウンドとの有意差) を含む信号のノイズをフィルタリング (Agilent Technologies, Inc. のプロトコルによる) することによって減少させた。最後に、少なくとも 1.5 倍のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションを示した遺伝子リストを同定した。PANTHER classification system (www.pantherdb.org/tools/genexAnalysis.jsp) を遺伝子の機能的分類に使用した。Mi らは、タンパク質ファミリーツリーおよび機能を分析するためのウェブツールである PANTHER を用いてタンパク質を分類するための手順について次のように示している²⁹⁾。PANTHER Protein Library のデータ生成の全体的なプロセスは、3つの主なステップ: ファミリークラスタリング、系統樹の構築、ツリーノードのアノテーションにより成り立っている。ファミリークラスタの要件としては、1)ファミリーは、少なくとも1つの遺伝子が遺伝子オントロジー (GO) 参照ゲノムとして列挙されなければならない、2)系統学的な推論を支持し、適切なファミリークラスタの作成のために、十分なアラインメントの長さ (少なくとも 30 のアミノ酸配列がファミリーの 75%以上にわたって整列している) を持つこととされている。各分子機能、生物学的プロセスまたは細胞成分について、統計学的エンリッチメントテストを行った。特定のオントロジー用語に関連する遺伝子は、全体的な値の分布からランダムに描かれた遺伝子の数値の可能性に従って評価した。マン・ホイットニーU 検定を用いて P 値を決定した。マイクロアレイ分析によって大部分誘導された多数の遺伝子を、PANTHER 分類システムによって実施された多数の統計学的テストに従って分類した。使用方法の詳細は、PANTHER 9.0 の PANTHER ユーザーマニュアルに記載されている。

2-11 統計解析

データは、平均±標準誤差 (SEM) として表し、一元配置分散分析 (ANOVA)、事後検定として Tukey-Kramer 検定を行い統計学的有意性について分析した。P 値 0.05 未満を統計学的に有意な結果を示すものとした。

3. 結果

3-1 HCT-116 の 5-FU に対する細胞感受性

HCT-116 に対する 5-FU の IC_{50} 値は約 $1.90\mu\text{M}$ であった。一方、Dep は HCT-116 のコロニー形成能を阻害する濃度において、5-FU と比較してほぼ 2,000 倍の活性であった。図 6A および B は、それぞれ 5-FU および Dep の用量反応を示す。図 6C は、5-FU と Dep の併用、5-FU 単独、および Dep 単独について濃度依存的なコロニー形成率の低下を示している。1.75 μM の 5-FU と 1nM の Dep の組み合わせは、5-FU 単独と比較してコロニー形成率を約 30%抑制した。これは統計学的に有意であった ($P < 0.01$)。

3-2 HT-29 の 5-FU に対する細胞感受性

HT-29 に対する 5-FU の IC_{50} 値は約 $0.68\mu\text{M}$ であった。一方、Dep は HT-29 のコロニー形成能を阻害する濃度において、5-FU と比較してほぼ 2,000 倍の活性であった。図 6D および E は、それぞれ 5-FU および Dep の用量反応を示す。図 6F は、5-FU と Dep の併用、5-FU 単独、および Dep 単独について濃度依存的なコロニー形成率の低下を示している。0.625 μM の 5-FU と 0.375nM の Dep の組み合わせは、5-FU 単独と比較してコロニー形成率を約 35%抑制した。これは統計学的に有意であった ($P < 0.01$)。

3-3 SW48 の 5-FU に対する細胞感受性

SW48 に対する 5-FU の IC_{50} 値は約 $1.15\mu\text{M}$ であった。一方、Dep は SW48 のコロニー形成能を阻害する濃度において、5-FU と比較してほぼ 5,000 倍の活性であった。図 6G および H は、それぞれ 5-FU および Dep の用量反応を示す。図 6I は、5-FU と Dep の併用、5-FU 単独、および Dep 単独について濃度依存的なコロニー形成率の低下を示している。0.875 μM の 5-FU と 0.2nM の Dep の組み合わせは、5-FU 単独と比較してコロニー形成率を約 25%抑制した。これは統計学的に有意であった ($P < 0.01$)。

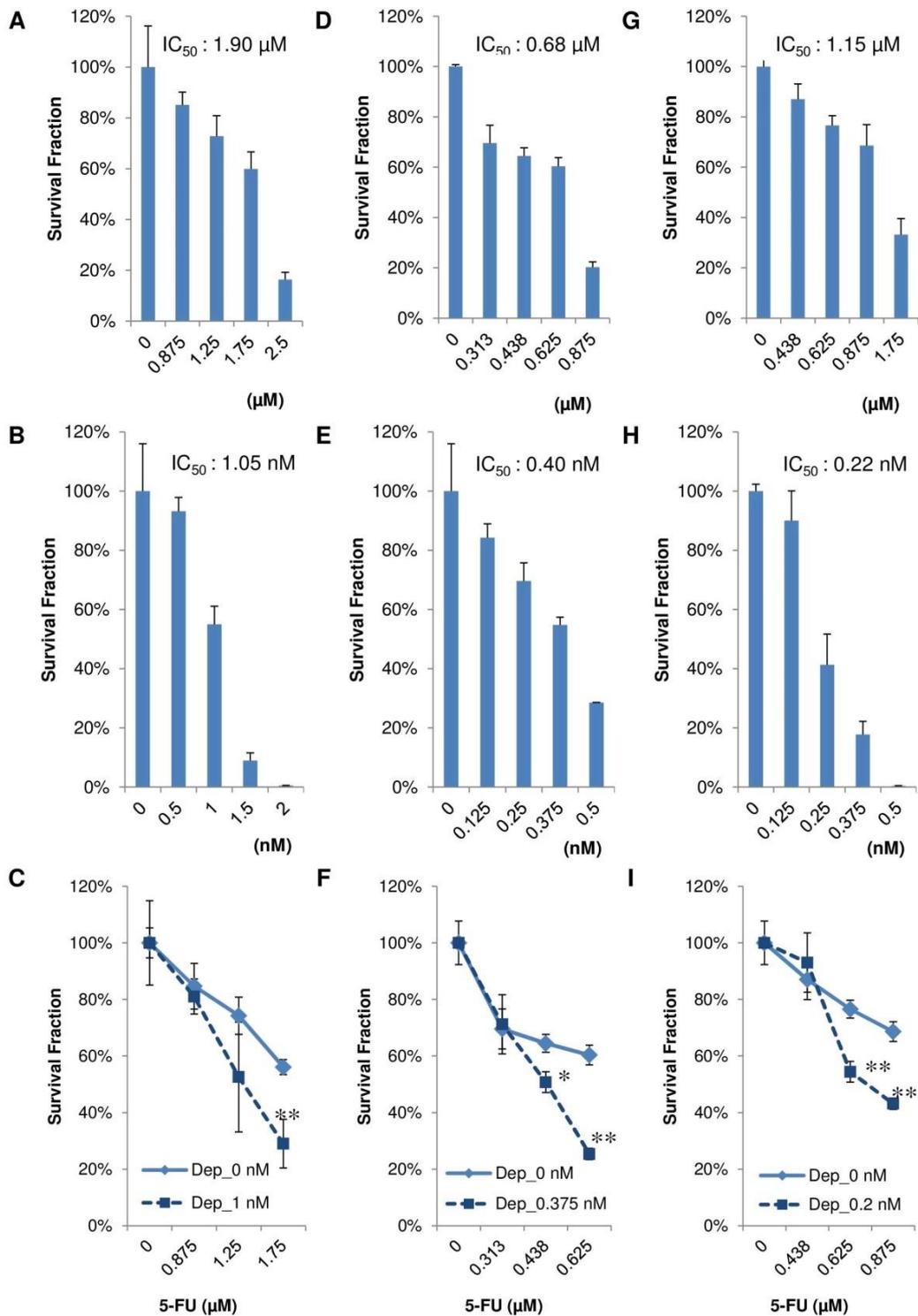


図6. HCT-116に対する (A) 5-FU, (B) Dep および (C) 5-FU と Dep 併用によるコロニー形成能阻害効果. HT-29 に対する (D) 5-FU, (E) Dep および (F) 5-FU と Dep 併用によるコロニー形成能阻害効果. SW48 に対する (G) 5-FU, (H) Dep および (I) 5-FU と Dep 併用による細胞増殖阻害効果. x 軸は薬剤濃度を表し, y 軸は生存率 (すなわち, 5-FU 0 μ M に対するコロニー形成能, または細胞増殖能) を表す. * P < 0.05, ** P < 0.01 (対 Dep 0nM)

3-4 HCT-116 における 5-FU+Dep の薬剤併用解析

Fa (fraction affected) -CI Plot を図 7A に, Fa-DRI Plot を図 7B, 7C, 7D に示す. Combination_A (併用比 5-FU : Dep = 1.25 μ M : 1nM) においては, Fa=0.5 の CI は 1.19, Fa=0.9 の CI は 0.97 であった. Combination_B (併用比 5-FU : Dep = 1.75 μ M : 1nM) においては, Fa=0.5 の CI は 1.36, Fa=0.9 の CI は 1.06 であった. Combination_C (併用比 5-FU : Dep = 2.5 μ M : 1nM) においては, Fa=0.5 の CI は 1.43, Fa=0.9 の CI は 1.12 であった. また, Fa=0.5 の DRI は Combination_A, B, C それぞれ 2.49, 1.86, 1.43 であった. Fa=0.9 の DRI は Combination_A, B, C それぞれ 8.20, 5.61, 3.99 であった.

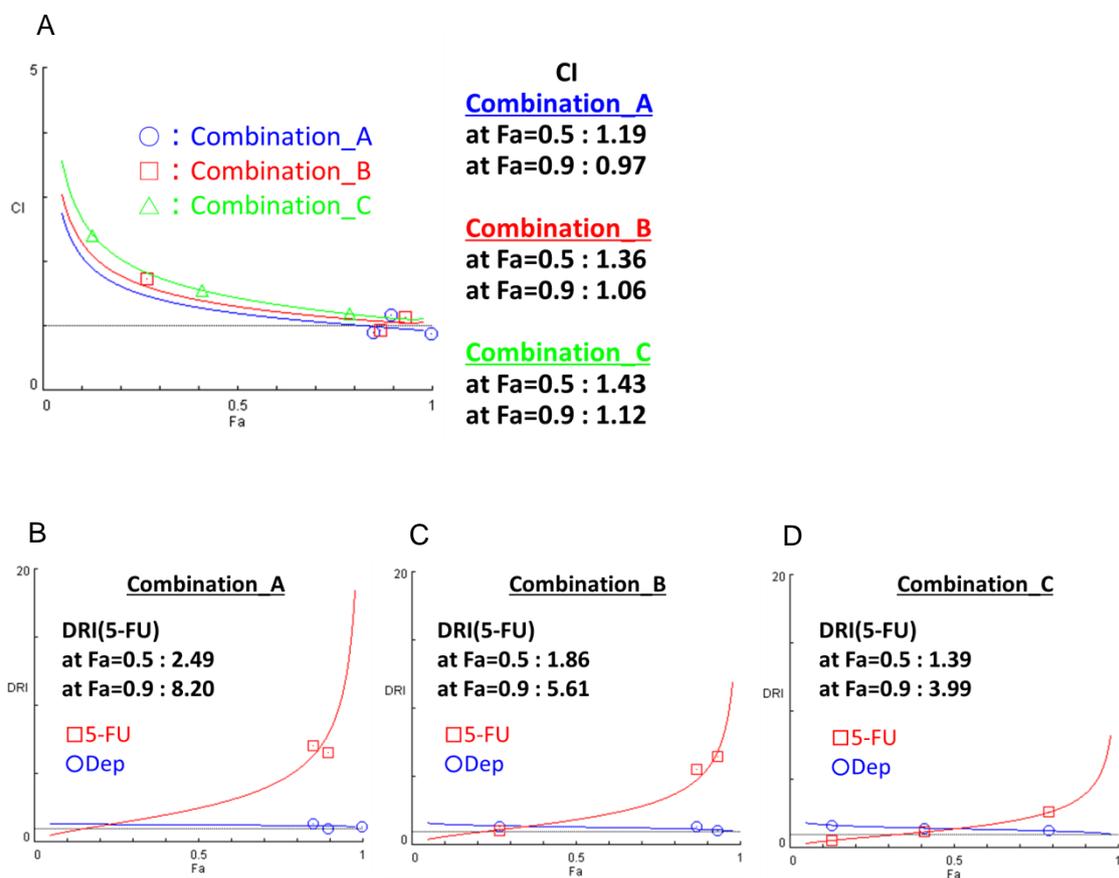


図 7. HCT-116 における薬剤併用解析 Fa-CI Plot(A), Fa-DRI Plot(B-D)

Combination_A : Concentration ratio 5-FU : Dep = 1.25 μ M : 1nM (5-FU:1.25 μ M + Dep:1nM, 5-FU:1.75 μ M + Dep:1.4nM, 5-FU:2.5 μ M + Dep:2nM)

Combination_B : Concentration ratio 5-FU : Dep = 1.75 μ M : 1nM (5-FU:1.25 μ M + Dep:0.7nM, 5-FU:1.75 μ M + Dep:1nM, 5-FU:2.5 μ M + Dep:1.4nM)

Combination_C : Concentration ratio 5-FU : Dep = 2.5 μ M : 1nM (5-FU:1.25 μ M + Dep:0.5nM, 5-FU:1.75 μ M + Dep:0.7nM, 5-FU:2.5 μ M + Dep:1nM)

3-5 HCT-116 における 5-FU (1.75 μ M) 単独, Dep (1nM) 単独および 5-FU (1.75 μ M) +Dep (1nM) 併用作用による HDAC 活性

図 8 に示すように, 5-FU 単剤, Dep 単剤, TSA 単剤および 5-FU (1.75 μ M) と Dep (1nM) 併用の HCT-116 における HDAC 活性を測定した. 5-FU 単剤 (図 8A) では HDAC 活性は 0.11 μ M でコントロールの 64%, 1.75 μ M でコントロールの 75%に低下したが, 5-FU 濃度の上昇と共に増加を示し, 28 μ M ではコントロールの 129%となった. Dep 単剤 (図 8B) では HDAC 活性は Dep 1nM でコントロールの 64%に低下したが, それ以上の濃度でもさらなる低下は示さなかった. ポジティブコントロールとして用いた TSA 単剤 (図 8C) では濃度依存的に明瞭な HDAC 活性低下作用を示し, コントロールに比較し 5nM で 28%, 80nM で 2.2%に低下した. 図 8D は溶媒コントロール (F-D-) に対する 5-FU 1.75 μ M 単剤 (F+D-), Dep 1nM 単剤 (F-D+), 5-FU 1.75 μ M と Dep 1nM 併用 (F+D+) の HDAC 活性比である. 5-FU 1.75 μ M と Dep 1nM 併用の HDAC 活性はコントロールに対して 66%であり Dep 1nM 単剤 (F-D+) と同等であった.

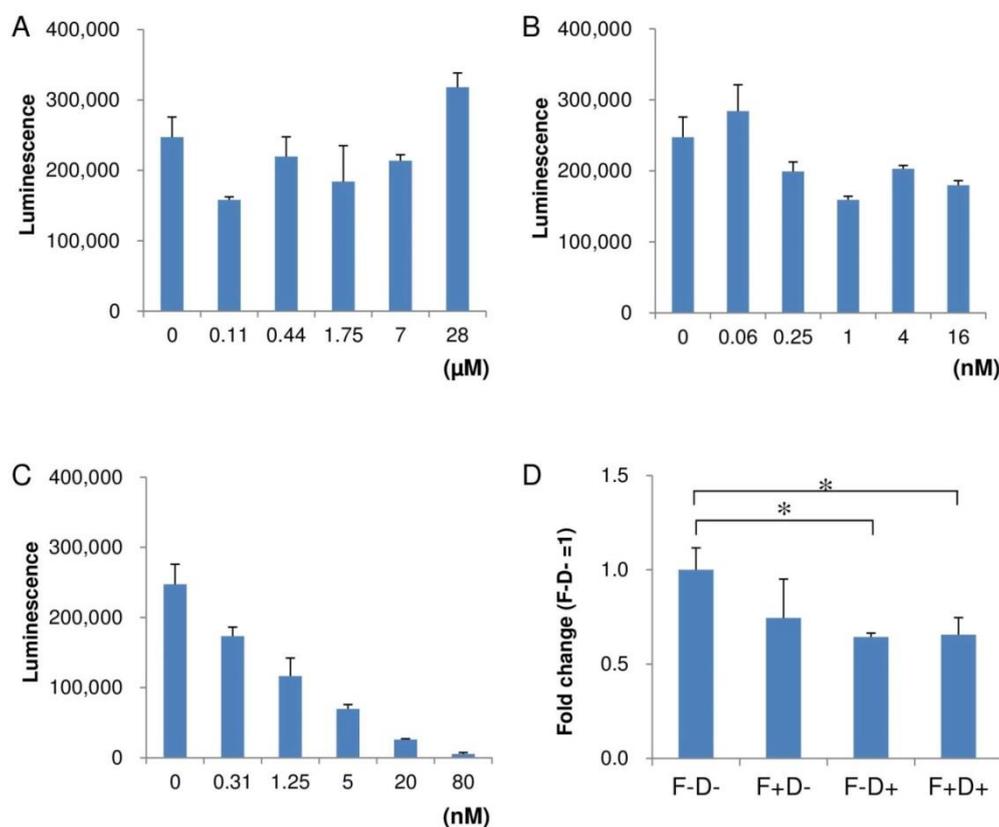


図 8. (A) 5-FU, (B) Dep および (C) トリコスタチン A (TSA) で処理した HCT-116 における HDAC 活性を示す. データは生の発光値として表される. x 軸は薬物濃度を表し, y 軸は発光値を表す. (D) は 以下で処理した後の HCT-116 における HDAC 活性の変化率を示す. 溶媒コントロール (F-D-), 5-FU (1.75 μ M) 単独 (F+D-), Dep (1nM) 単独 (F-D+), 5-FU (1.75 μ M) + Dep (1nM) 併用 (F+D+) 処理を表す. *は統計学的に有意であることを示す (P<0.05).

3-6 HCT-116 における 5-FU (1.75 μ M) 単独, Dep (1nM) 単独および 5-FU (1.75 μ M) +Dep (1nM) 併用作用によるカスパーゼ 3/7 活性

図 9 に示すように, 5-FU (1.75 μ M) 単独, Dep (1nM) 単独, および 5-FU と Dep 併用後の HCT-116 におけるカスパーゼ-3/7 活性の経時的変化を調査した. 24 時間後, 5-FU と Dep の併用では, 溶媒コントロールと比較してカスパーゼ-3/7 活性化が著しく増強した (3.8 倍に変動, $P < 0.01$). Dep 単独でも溶媒コントロールと比較して 2.0 倍の増加を示した ($P < 0.01$). 48 時間後, 5-FU と Dep の併用では, 溶媒コントロールと比較してカスパーゼ-3/7 活性化が増加した (2.8 倍変化, $P < 0.01$). 5-FU 単独および Dep 単独は, 溶媒コントロールと比較してカスパーゼ-3/7 活性化はわずかに増加した (それぞれ 1.4 倍, $P < 0.05$; および 1.5 倍, $P < 0.01$).

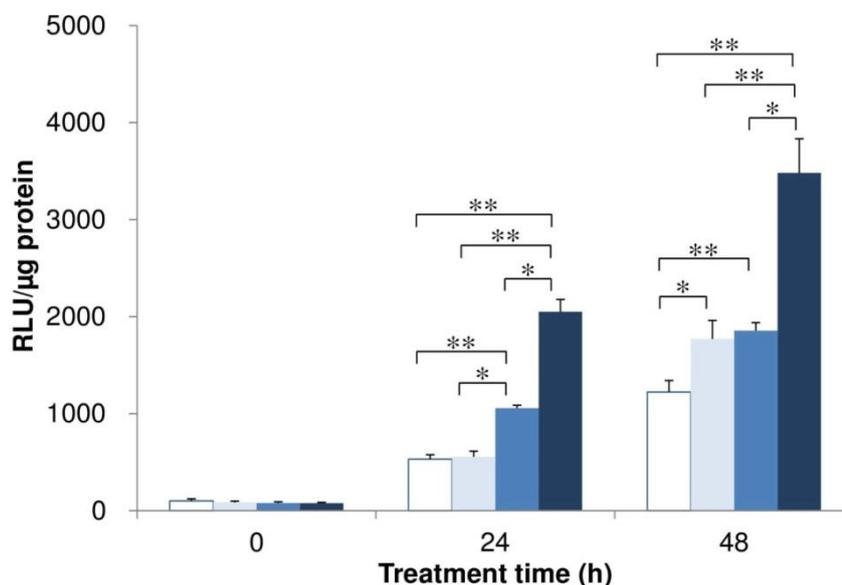


図 9. 溶媒コントロール (白色), 5-FU (1.75 μ M) 単独 (薄青), Dep (1nM) 単独 (青), および 5-FU (1.75 μ M) + Dep (1nM) 併用 (濃青) で処理後の HCT-116 におけるカスパーゼ-3/7 活性化の時間経過を示す. データはタンパク質量に対する相対光単位 (RLU) / μ g として表される. x 軸は処理期間 (h) を表し, y 軸は RLU / μ g を表す. * $P < 0.05$ または ** $P < 0.01$ は有意差を示す.

3-7 HCT-116 における 5-FU (1.75 μ M) 単独, Dep (1nM) 単独および 5-FU (1.75 μ M) +Dep (1nM) 併用 7 日間作用による作用機序, 細胞周期, アポトーシス関連遺伝子の発現解析

qRT-PCR 法を用いて, 5-FU 単独, Dep 単独または 5-FU と Dep の併用で処理した HCT-116 における様々な遺伝子によってコードされる mRNA の発現レベルを調べた (図 10). TYMS 遺伝子によってコードされる TS mRNA の発現レベルは, 5-FU と Dep の併用処理で統計的有意性 ($P < 0.01$) をもって 42%減少した. わずかではあるが, 5-FU と Dep

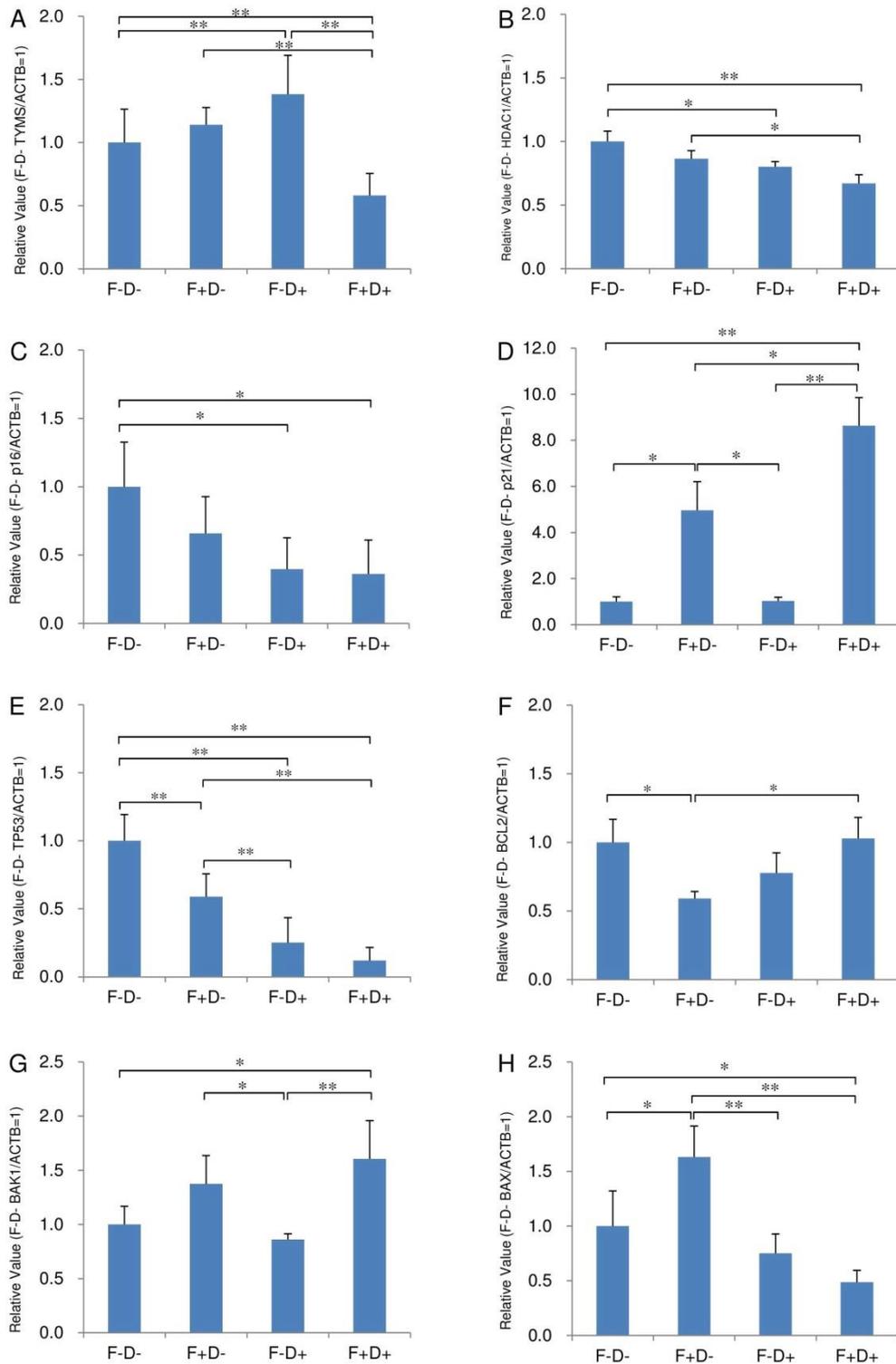


図 10. HCT-116 における作用機序, 細胞周期およびアポトーシス関連遺伝子発現変動 (A)TYMS, (B)HDAC1, (C)p16, (D)p21, (E)TP53, (F)BCL2, (G)BAK1, (H)BAX を示す. 溶媒コントロール (F-D-), 5-FU (1.75 μ M) 単独 (F+D-), Dep (1nM) 単独 (F-D+), 5-FU (1.75 μ M) + Dep (1nM) 併用 (F+D+) による処理を表す. mRNA レベルを qRT-PCR によって評価し, 各点での ACTB mRNA レベルによって補正した. y 軸は, ACTB mRNA に対する目的の遺伝子の mRNA レベルを表す. * P < 0.05 または ** P < 0.01 は有意差を示す.

の併用処理した細胞で HDAC1 mRNA について統計学的に有意なダウンレギュレーションが観察された。Dep 単独および 5-FU と Dep の併用では、p16 mRNA の発現レベルをそれぞれ 60 および 64%低下させた。Dep の存在にかかわらず、5-FU は p21 の発現を誘導した。5-FU 単独で 396%、5-FU と Dep の併用で 764%と、p21 発現レベルの顕著な変化がいずれも統計学的有意性 ($P < 0.01$) をもって観察された。TP53 の発現レベルは Dep 単独で 75%、5-FU 単独で 42%減少した。5-FU 単独では、BCL2 の mRNA 発現レベルを 59%に低下させたが、Dep の存在下では明らかに回復した (5-FU と Dep の併用では 103%)。5-FU 単独または Dep 単独のいずれかを用いた処理後の細胞における BAK1 の mRNA 発現レベルには顕著な変化は観察されなかった (それぞれ 138 および 86%)。5-FU と Dep の併用では、BAK1 の mRNA 発現レベルを 160%まで増加させた。これは、溶媒コントロールと比較 ($P < 0.05$)、および Dep 単独と比較 ($P < 0.01$) して統計学的に有意であった。BAX に関しては、5-FU 単独で mRNA 発現レベルを 163%まで増加させた。Dep と 5-FU の併用では、溶媒コントロールと比較して、BAX mRNA 発現レベルを 49%に減少させた ($P < 0.05$)。

3-8 HCT-116 における 5-FU (1.75 μ M) 単独, Dep (1nM) 単独および 5-FU (1.75 μ M) +Dep (1nM) 併用 7 日間作用による TP53 経路関連遺伝子のマイクロアレイによる発現解析

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway データベース (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) に公開されている p53 signaling pathway - Homo sapiens (human) に掲載の遺伝子発現レベルをマイクロアレイによる発現解析よりまとめた (表 2)。5-FU (1.75 μ M) +Dep (1nM) 併用処理で 1.5 倍以上の発現上昇を示した遺伝子は、IGFBP3, p21, SERPINA1, SESN3, THBS1, GADD45G, SERPINB5, CD82, PPM1D, TP73, CYCS, ZMAT3, DDB2, FAS, EI24, MDM2, CCNB3, SNF, PTEN, APAF1 であった。5-FU (1.75 μ M) +Dep (1nM) 併用処理で 1.5 倍以上の発現低下を示した遺伝子は、CDK4, ATM, MDM4, GORAB, PIDD1, GTSE1, BID, BBC3, SLAH1, CASP8, CHEK1, CDKN2A, TP53 であった。p21 の大きな上昇と TP53 の著しい低下は qRT-PCR の結果と一致した。

3-9 HCT-116 における 5-FU (1.75 μ M) 単独, Dep (1nM) 単独および 5-FU (1.75 μ M) +Dep (1nM) 併用 7 日間作用による遺伝子発現プロファイルおよび 遺伝子オンロジー解析

薬剤曝露後の遺伝子発現プロファイルを調べるために、材料と方法に記載されているように溶媒コントロール、5-FU 単独、Dep 単独、および 5-FU と Dep の併用で 7 日間処理

表 2. HCT-116 におけるマイクロアレイ解析による TP53 経路関連遺伝子の発現変化 (赤字は 1.5 倍以上の発現上昇, 青字は 1.5 倍以上の発現低下を示す. 太字はそれぞれ 3 倍以上の変動を示す. データは F1.75D1 の降順)

Gene name (synonyms)	Accession number	Discription	Fold change		
			F1.75D1	F1.75D0	F0D1
IGFBP3	NM_001013398	insulin-like growth factor binding protein 3	14.10	0.90	3.73
CDKN1A (p21)	NM_078467	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	5.25	4.68	1.29
SERPINA1 (PAI)	NM_001002236	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 1	4.13	1.54	1.53
SESN3	NM_144665	sestrin 3	3.62	1.72	1.60
THBS1 (TSP1)	NM_003246	thrombospondin 1	3.59	2.15	1.51
GADD45G	NM_006705	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	3.52	0.94	1.24
SERPINB5 (Maspin)	NM_002639	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	3.30	2.67	1.36
CD82 (KAI)	NM_002231	CD82 molecule	3.23	1.58	1.45
PPM1D (Wip1)	NM_003620	protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1D	2.94	2.30	1.14
TP73	NM_005427	tumor protein p73	2.88	1.89	2.04
CYCS (CytC)	NM_018947	cytochrome c, somatic	2.82	1.39	1.41
ZMAT3 (PAG608)	NM_022470	zinc finger, matrin-type 3	2.82	2.38	1.15
DDB2 (P48)	NM_000107	damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa	2.80	2.90	1.50
FAS	NM_000043	Fas cell surface death receptor	2.47	3.30	1.36
EI24 (PIGs)	NM_004879	etoposide-induced 2.4	2.17	1.99	1.43
MDM2	NM_002392	MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase	2.09	3.26	1.10
CCNB3 (Cyclin B)	NM_033031	cyclin B3	1.84	0.75	1.61
SNF	NM_006142	stratifin	1.57	2.26	0.95
PTEN	NM_000314	phosphatase and tensin homolog	1.56	1.17	1.20
APAF1	NM_181861	apoptotic peptidase activating factor 1	1.50	1.87	1.88
CCNE1	NM_001238	cyclin E1	1.39	1.53	1.48
BAX	NM_138764	BCL2-associated X protein	1.35	1.91	1.16
PERP	NM_022121	PERP, TP53 apoptosis effector	1.32	1.18	1.16
PMAIP1 (Noxa)	NM_021127	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	1.26	1.58	0.84
ATR	NM_001184	ataxia telangiectasia and Rad3 related	1.25	1.03	1.14
CCND1 (Cyclin D)	NM_053056	cyclin D1	1.17	1.14	1.14
CASP9	NM_001229	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	1.14	0.80	0.74
TP53AIP1	NM_001195195	tumor protein p53 regulated apoptosis inducing protein 1	1.10	0.84	0.98
TNFRSF10B (DR5)	NM_003842	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	1.10	1.46	0.78
RRN2B (p53R2)	NM_015713	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)	1.03	2.03	0.92
TSC2	NM_000548	tuberous sclerosis 2	0.88	1.14	0.71
RPRM (Reprimo)	NM_019845	reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate	0.83	0.79	0.91
CASP3	NM_004346	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	0.81	1.14	0.96
CDK2	NM_001798	cyclin-dependent kinase 2	0.79	1.19	1.40
IGF1	NM_000618	insulin like growth factor 1	0.78	0.76	0.84
CDK1 (CDC2)	NM_001786	cyclin-dependent kinase 1	0.74	1.72	1.97
SHISA5 (Scotin)	NM_016479	shisa family member 5	0.73	0.95	0.77
CHEK2	NM_001005735	checkpoint kinase 2	0.68	1.30	1.35
CDK4	NM_000075	cyclin-dependent kinase 4	0.63	0.90	0.95
ATM	NM_000051	ataxia telangiectasia mutated	0.62	0.96	0.79
MDM4 (MDM-X)	NM_002393	MDM4, p53 regulator	0.58	0.77	0.90
GORAB (SCYL1BP1)	NM_152281	golgin, RAB6-interacting	0.58	0.61	0.70
PIDD1	NM_145886	p53-induced death domain protein 1	0.56	1.61	0.84
GTSE1	NM_016426	G-2 and S-phase expressed 1	0.52	1.58	1.73
BID	NM_197966	BH3 interacting domain death agonist	0.51	1.79	0.98
BBC3 (PUMA)	NM_014417	BCL2 binding component 3	0.50	0.79	0.35
SIAH1	NM_003031	siah E3 ubiquitin protein ligase 1	0.49	0.96	0.82
CASP8	NM_033355	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	0.46	1.28	0.72
CHEK1	NM_001114121	checkpoint kinase 1	0.36	0.93	1.36
CDKN2A (p14ARF)	NM_000077	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	0.28	0.88	0.84
TP53	NM_000546	tumor protein p53	0.28	0.89	0.52

F1.75D1, 5-FU (1.75 μM) + Dep (1 nM) combination; F1.75D0, 5-FU (1.75 μM) alone, F0D1, Dep (1 nM) alone

表 3. 溶媒コントロールに対して 1.5 倍以上の発現上昇を示した上位 1,000 遺伝子による遺伝子オンロジー解析

Ontology Terms (Class ID)	F1.75D1		F1.75D0		F0D1	
	Fold Enrichment	P-value	Fold Enrichment	P-value	Fold Enrichment	P-value
<i>PANTHER GO-Slim Biological Process</i>						
antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class (GO:0002504)	4.98	2.42E-02	0.56	1.00E+00	> 5.00	3.78E-03
phospholipid metabolic process (GO:0006644)	2.78	2.58E-03	1.77	1.00E+00	2.11	6.54E-01
cellular component morphogenesis (GO:0032989)	1.98	4.08E-03	1.66	5.20E-01	1.21	1.00E+00
anatomical structure morphogenesis (GO:0009653)	1.91	1.78E-03	1.66	1.75E-01	1.29	1.00E+00
death (GO:0016265)	1.86	7.23E-03	1.21	1.00E+00	1.32	1.00E+00
cell death (GO:0008219)	1.83	1.19E-02	1.18	1.00E+00	1.33	1.00E+00
apoptotic process (GO:0006915)	1.77	4.59E-02	1.21	1.00E+00	1.32	1.00E+00
cellular component organization (GO:0016043)	1.61	1.71E-03	1.44	1.71E-01	1.49	5.37E-02
phosphate-containing compound metabolic process (GO:0006796)	1.57	4.78E-02	1.32	1.00E+00	1.88	2.19E-05
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	1.52	9.82E-03	1.52	1.25E-02	1.43	1.37E-01
developmental process (GO:0032502)	1.41	1.22E-03	1.25	7.35E-01	1.25	6.68E-01
cell communication (GO:0007154)	1.39	1.64E-04	1.13	1.00E+00	1.13	1.00E+00
cellular process (GO:0009987)	1.22	2.39E-04	1.19	5.49E-03	1.23	1.72E-04
<i>PANTHER GO-Slim Cellular Component</i>						
MHC protein complex (GO:0042611)	> 5.00	2.23E-05	1.13	1.00E+00	> 5.00	1.98E-05
intermediate filament cytoskeleton (GO:0045111)	3.70	3.58E-03	4.06	7.06E-04	1.15	1.00E+00
cytoskeleton (GO:0005856)	2.18	4.74E-08	1.68	8.97E-03	1.79	9.17E-04
actin cytoskeleton (GO:0015629)	2.14	1.70E-03	1.62	6.18E-01	1.36	1.00E+00
organelle (GO:0043226)	1.40	4.23E-03	1.44	1.18E-03	1.41	3.42E-03
intracellular (GO:0005622)	1.28	3.67E-02	1.32	7.91E-03	1.22	2.77E-01
cell part (GO:0044464)	1.25	4.49E-02	1.35	2.80E-04	1.17	8.30E-01
<i>PANTHER GO-Slim Molecular Function</i>						
hydrogen ion transmembrane transporter activity (GO:0015078)	4.62	3.24E-02	2.09	1.00E+00	1.56	1.00E+00
actin binding (GO:0003779)	2.63	9.73E-03	2.07	7.69E-01	1.70	1.00E+00
cytoskeletal protein binding (GO:0008092)	2.60	4.21E-04	1.88	7.31E-01	1.79	1.00E+00
structural constituent of cytoskeleton (GO:0005200)	2.06	1.11E-05	1.59	2.26E-01	1.42	1.00E+00
protein binding (GO:0005515)	1.37	1.30E-03	1.22	8.41E-01	1.14	1.00E+00
hydrolase activity (GO:0016787)	1.37	1.10E-02	1.29	2.30E-01	1.27	5.10E-01
F1.75D1, 5-FU (1.75 μM) + Dep (1 nM) combination; F1.75D0, 5-FU (1.75 μM) alone, F0D1, Dep (1 nM) alone						

表 4. 溶媒コントロールに対して 1.5 倍以上の発現低下を示した上位 1,000 遺伝子による遺伝子オントロジー解析

Ontology Terms (Class ID)	F1.75D1		F1.75D0		F0D1	
	Fold Enrichment	P-value	Fold Enrichment	P-value	Fold Enrichment	P-value
<i>PANTHER GO-Slim Biological Process</i>						
chromatin organization (GO:0006325)	3.17	4.23E-07	1.02	1.00E+00	1.52	1.00E+00
organelle organization (GO:0006996)	1.99	6.67E-04	1.11	1.00E+00	1.19	1.00E+00
cell cycle (GO:0007049)	1.65	1.56E-03	1.03	1.00E+00	1.11	1.00E+00
cellular component organization (GO:0016043)	1.55	1.13E-02	1.16	1.00E+00	1.23	1.00E+00
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	1.48	3.27E-02	1.16	1.00E+00	1.14	1.00E+00
transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0006366)	1.43	1.80E-02	1.20	1.00E+00	1.61	1.41E-05
nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0006139)	1.41	6.86E-06	1.07	1.00E+00	1.27	3.06E-02
RNA metabolic process (GO:0016070)	1.38	6.85E-03	1.09	1.00E+00	1.44	3.19E-04
transcription, DNA-dependent (GO:0006351)	1.38	3.81E-02	1.20	1.00E+00	1.64	4.53E-07
biological regulation (GO:0065007)	1.27	1.13E-02	1.24	4.79E-02	1.34	9.88E-05
primary metabolic process (GO:0044238)	1.25	1.70E-05	1.11	1.00E+00	1.10	1.00E+00
metabolic process (GO:0008152)	1.22	3.98E-06	1.13	1.80E-01	1.11	8.58E-01
cellular process (GO:0009987)	1.19	1.06E-02	1.19	9.44E-03	1.06	1.00E+00
<i>PANTHER GO-Slim Molecular Function</i>						
chromatin binding (GO:0003682)	2.87	4.26E-03	1.48	1.00E+00	1.75	1.00E+00
nucleic acid binding (GO:0003676)	1.41	8.32E-05	0.97	1.00E+00	1.33	6.16E-03
DNA binding (GO:0003677)	1.40	1.67E-02	1.09	1.00E+00	1.54	5.30E-05
binding (GO:0005488)	1.34	2.77E-08	1.10	1.00E+00	1.26	6.70E-05
catalytic activity (GO:0003824)	1.22	1.17E-02	1.19	8.98E-02	1.03	1.00E+00
<i>PANTHER GO-Slim Molecular Function</i>						
Not extracted						

した HCT-116 のマイクロアレイ分析を行った。遺伝子発現プロファイルの結果を遺伝子オントロジーで分析し、各薬剤単独または 5-FU と Dep の組み合わせでどの遺伝子群がアップレギュレートされたか (表 3), ダウンレギュレートされたか (表 4) を明らかにした。併用処理によって影響を受ける細胞プロセスの生物学的意義を示すために、表 3 および 4 に Fold enrichment (特定の遺伝子群に属する遺伝子数に対する発現変動遺伝子数の割合と全ゲノム数に対する発現変動遺伝子数の割合の比) の降順で列挙した。PANTHER GO-Slim Biological Process および Cellular Component の分析では、5-FU と Dep の併用において

MHC (major histocompatibility complex) クラス関連遺伝子オントロジー (それぞれ GO : 000254 および GO : 0042611) の Fold enrichment スコアの顕著な上昇が明らかになった。

3-10 HCT-116 における 5-FU (1.75 μ M) 単独, Dep (1nM) 単独および 5-FU (1.75 μ M) +Dep (1nM) 併用作用による MHC クラス II および I 遺伝子の発現解析

5-FU 単独, Dep 単独, および 5-FU と Dep の併用で処理した HCT-116 細胞において, qRT-PCR により MHC クラス II および I mRNA の発現レベルを調べた (図 11). HLA-DPB1, HLA-DQB1, HLA-DRA, および HLA-DRB1 を含む MHC クラス II 遺伝子は, 5-FU と Dep の併用では溶媒コントロールに比べ, それぞれ 432, 298, 667 および 847%と著実にアップレギュレートした ($P < 0.01$). Dep 単独処理では, HLA-DPB1, HLA-DQB1, HLA-DRA および HLA-DRB1 を含む MHC クラス II 遺伝子の発現レベルは, それぞれわずかに 52, 38, 157 および 168%増加した. Dep 単独と比較して, 5-FU と Dep の併用は, これらの MHC クラス II 遺伝子, すなわち HLA-DPB1, HLA-DQB1, HLA-DRA および HLA-DRB1 の mRNA レベルを統計学的に有意に ($P < 0.01$) 著しく上昇させた. HLA-A, HLA-B, HLA-C を含む MHC クラス I 遺伝子のレベルの変化は, 5-FU, Dep, または 5-FU + Dep 併用処理のいずれにおいても観察されなかった.

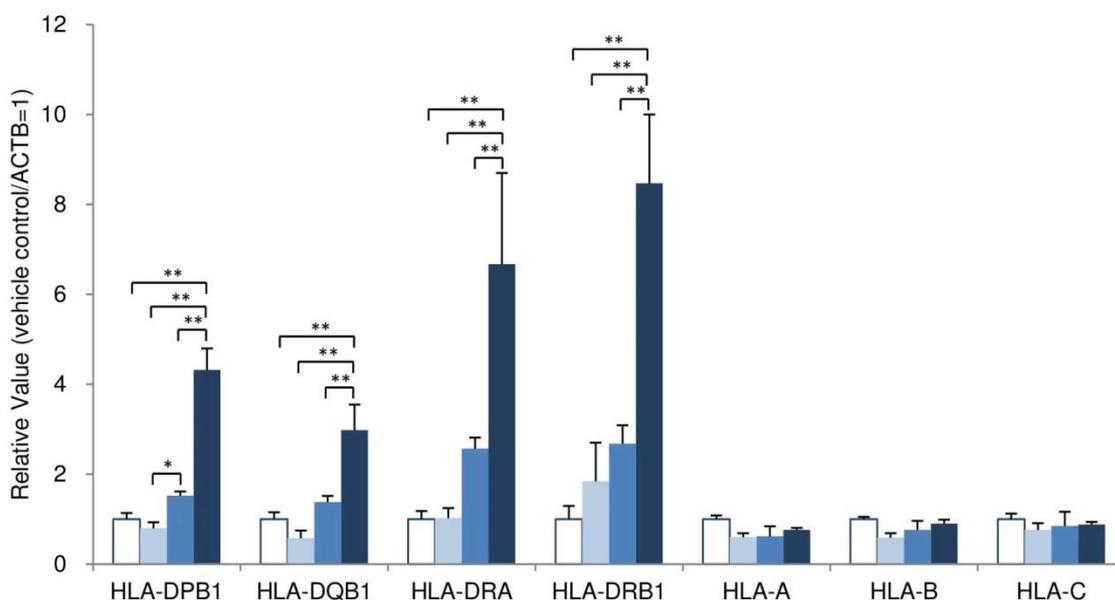


図 11. 溶媒コントロール (白色), 5-FU (1.75 μ M) 単独 (薄青), Dep (1nM) 単独 (青), および 5-FU (1.75 μ M) + Dep (1nM) 併用 (濃青) で処理後の HCT-116 における MHC クラス II および MHC クラス I 遺伝子発現変動を示す. mRNA レベルは, 各点での ACTB mRNA レベルによって補正した. x 軸は MHC クラス II および MHC クラス I 遺伝子を示す. y 軸は ACTB mRNA に対する目的の遺伝子の mRNA レベルを表す. * $P < 0.05$ または ** $P < 0.01$ は有意差を示す.

3-11 HT-29 および SW48 における 5-FU 単独, Dep 単独および 5-FU+Dep 併用作用による HLA-DRA の発現解析

5-FU 単独, Dep 単独, および 5-FU と Dep の併用で処理した HT-29 および SW48 細胞において, qRT-PCR により MHC クラス II 遺伝子である HLA-DRA の発現レベルを調べた (図 12). HT-29 では溶媒コントロールに比べ 5-FU と Dep の併用で 550%と有意に ($P < 0.01$) 増加した. SW48 では溶媒コントロールに比べ 5-FU と Dep の併用で 786 倍と有意に ($P < 0.01$) 著しく増加した.

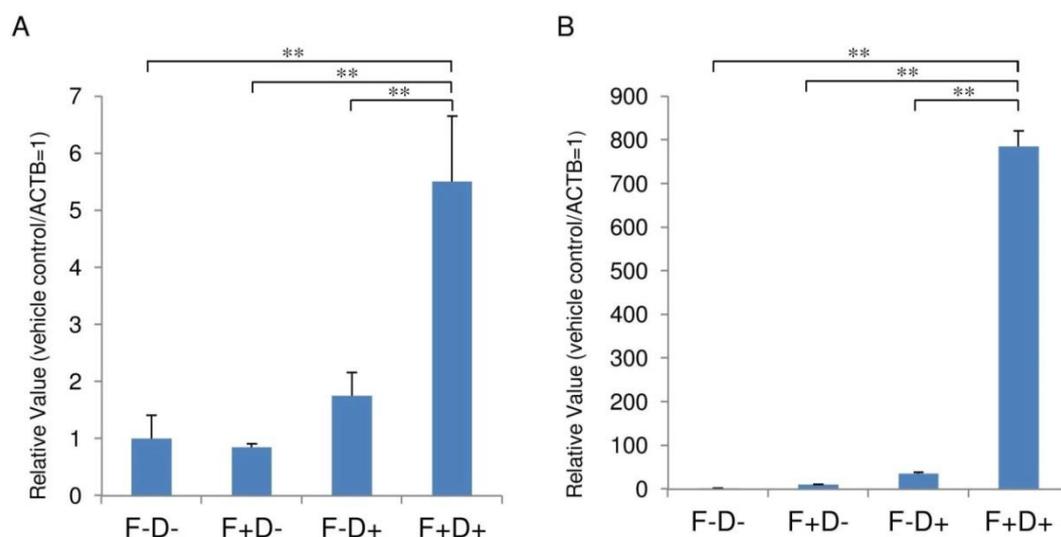


図 12. (A) HT-29, (B) SW48 における HLA-DRA 遺伝子発現変動を示す. 溶媒コントロール (F-D-), 5-FU (HT-29:0.625 μ M, SW48:0.875 μ M) 単独 (F+D-), Dep (HT-29:0.375nM, SW48:0.2 μ M) 単独 (F-D+), 5-FU (HT-29:0.625 μ M, SW48:0.875 μ M) + Dep (1nM) 併用 (HT-29:0.375nM, SW48:0.2 μ M) による処理を表す. mRNA レベルを qRT-PCR によって評価し, 各点での ACTB mRNA レベルによって補正した. y 軸は, ACTB mRNA に対する目的の遺伝子の mRNA レベルを表す. **は有意差を示す ($P < 0.01$).

3-12 HCT-116 における高濃度 5-FU 単独作用による TYMS, p21, HLA-DRA 遺伝子の発現解析

5-FU 単独で処理した HCT-116 細胞において qRT-PCR により TYMS, p21, HLA-DRA の発現レベルを調べた (図 13). TYMS の発現レベルはコントロールに比較して 5-FU 3.5 μ M で 68%, 5 μ M で 59%に低下し統計学的有意であった ($P < 0.01$). p21 の発現レベルはコントロールに比較して 5-FU 2.5 μ M で 482%, 3.5 μ M で 585%, 5 μ M で 674%と濃度依存的に上昇しいずれも統計学的に有意であった ($P < 0.01$). HLA-DRA の発現レベルはコントロールに比較して 5-FU 2.5 μ M および 3.5 μ M ではわずかな上昇であったが, 5 μ M では 194%と有意に上昇した ($P < 0.01$).

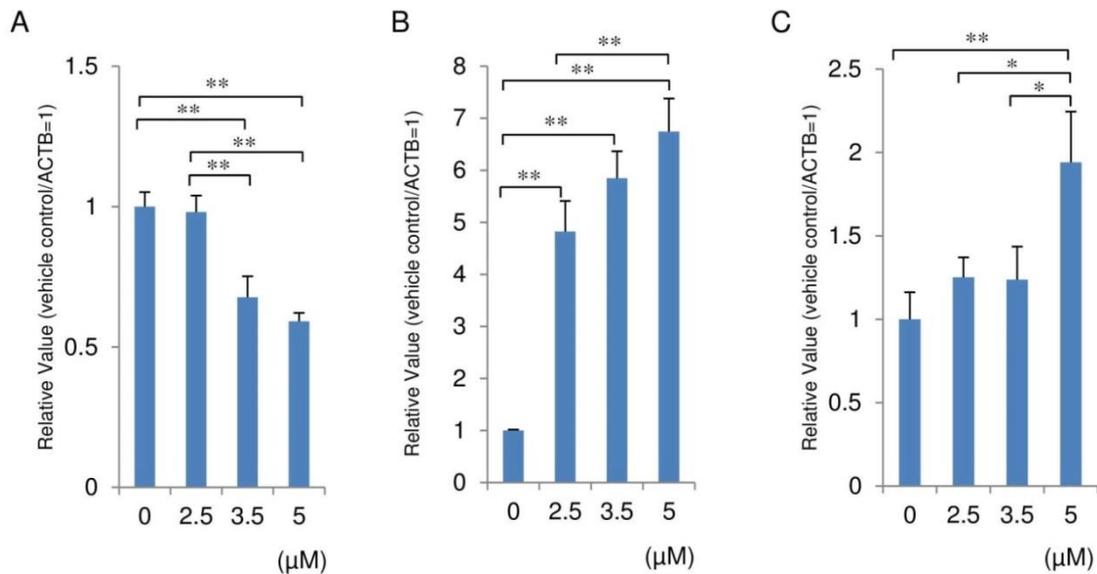


図 13. HCT-116 における (A) TYMS, (B) p21, (C) HLA-DRA 遺伝子発現変動を示す. mRNA レベルを qRT-PCR によって評価し, 各点での ACTB mRNA レベルによって補正した. x 軸は 5-FU 濃度を表し, y 軸は, ACTB mRNA に対する目的の遺伝子の mRNA レベルを表す. * P < 0.05 または ** P < 0.01 は有意差を示す.

3-13 HCT-116 における 5-FU (1.75μM) 単独, Dep (1nM) 単独および 5-FU (1.75μM) +Dep (1nM) 併用下の MHC クラス II 遺伝子の転写制御に関する遺伝子のマイクロアレイによる発現解析

我々はさらに, MHC クラス II 遺伝子の分子調節に関与する遺伝子に焦点を当て, 網羅的遺伝子発現解析の結果を分析した. 表 5 に記載されているように, 5-FU と Dep の併用処理後の PCAF (P300/CBP-associated factor, K(lysine) acetyltransferase 2B (KAT2B), としても知られている), CREB3 (cAMP responsive element binding protein 3), CREB5 (cAMP responsive element binding protein 5), および CIITA (class II, major histocompatibility complex, transactivator) の発現レベルの増加が大きいことを見出した. ヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) である PCAF はアポトーシス細胞プロセスに関連しており, CREB3, CREB5 および CIITA は MHC クラス II 遺伝子発現に関連している. 一方, CREB ファミリーのメンバーである ATF4 は, 5-FU または Dep 単独による処理後にならずに発現抑制され, 5-FU と Dep の併用によって著しい発現低下を認めた.

表 5. HCT-116 におけるマイクロアレイ解析による MHC クラス II 遺伝子の発現調節に関与する遺伝子発現変化 (赤字は 1.5 倍以上の発現上昇, 青字は 1.5 倍以上の発現低下を示す. 太字はそれぞれ 3 倍以上の変動を示す. データは F1.75D1 の降順)

Gene name (synonyms)	Accession number	Discription	Fold change		
			F1.75D1	F1.75D0	F0D1
CREB5	NM_182898	cAMP responsive element binding protein 5	6.51	0.75	0.64
KAT2B (pCAF)	NM_003884	K(lysine) acetyltransferase 2B	3.15	1.37	1.47
CIITA	NM_000246	class II, major histocompatibility complex, transactivator	2.80	0.80	0.91
CREB3	NM_006368	cAMP responsive element binding protein 3	2.13	1.05	1.09
PCBP4 (CBP)	NM_033010	poly(rC) binding protein 4	1.43	1.05	1.10
RFXAP	NM_000538	regulatory factor X-associated protein	1.29	0.82	0.79
NFYA	NM_002505	nuclear transcription factor Y, alpha	1.27	1.02	1.15
RFX5	NM_000449	regulatory factor X, 5 (influences HLA class II expression)	0.95	1.51	0.97
CREB1	NM_13444	cAMP responsive element binding protein 1	0.91	0.91	1.17
NFYB	NM_006166	nuclear transcription factor Y, beta	0.88	1.14	0.97
EP300 (p300, KAT3B)	NM_001429	E1A binding protein p300	0.59	0.69	0.80
NFYC	NM_014223	nuclear transcription factor Y, gamma	0.56	1.08	0.87
RFXANK	NM_003721	regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein	0.37	0.63	0.68
CREB2 (ATF4)	NM_001675	activating transcription factor 4	0.22	0.66	0.55

F1.75D1, 5-FU (1.75 μM) + Dep (1 nM) combination; F1.75D0, 5-FU (1.75 μM) alone, F0D1, Dep (1 nM) alone

4. 考察

ヒト大腸癌細胞における Dep による 5-FU 感受性増強

本研究では, ヒト大腸癌細胞におけるコロニー形成能の阻害を通して HDAC 阻害剤 Dep が 5-FU の細胞傷害性を増強することを見出したことが一つの重要な成果である (図 6). CI による薬剤併用効果の解析では $F_a=0.9$ レベルで相加的という結果であった. 5-FU の DRI はいずれの条件においても 1 を上回ったことから, Dep の併用は 5-FU 単独と比較し同じ効果レベルにおいて, 5-FU の用量を減少できる可能性がある. 同じ治療強度において, 抗がん剤である 5-FU の投与量を減量し副作用の削減に寄与できる可能性は臨床的に意義深い. 一方, 大腸がんに対する HDAC 阻害剤の有用性については, 癌細胞株および動物実験における基礎研究では効果が示されながら, ヒトに対する臨床試験では十分な成果が得られていない. 既治療歴のある進行大腸がん患者に対する Dep の第 II 相試験³⁰⁾では, 25 名の患者に 28 日間のサイクルの 1 日目, 8 日目および 15 日目に $13\text{mg} / \text{m}^2$ の用量で 4 時間かけて静脈内注入を行ったが, 4 名が不変で残りの 21 名が病勢進行であった. 研究の結論としてはこの投与方法では有効でなく, 他の抗がん剤等との併用の検討が必要であると述べられている. また, 5-FU 治療歴のある転移性大腸がん患者に対する 5-FU + vorinostat の第 I / II 相試験³¹⁾では, 10 名の患者に 14 日間のサイクルで 1 日目から 6 日目まで

vorinostat を 400mg 経口投与, 6 日目と 7 日目に 5FU+ロイコボリンを静注投与されたが, 1 名が不変で 9 名が病勢進行だった. 期待された一貫した腫瘍内の TYMS 発現レベルの減少が見られたのは 1 名のみであり, 投与スケジュールの見直しが必要であると締めくくられている. 現在, 我が国で臨床使用されている HDAC 阻害剤は vorinostat (ゾリンザ®), panobinostat (ファリーダック®) の 2 剤である. 既存薬剤のなかにも分子種特異性は低いものの HDAC 阻害作用をもつものがあり, 抗てんかん薬である valproic acid (デパケン®) は抗がん剤に比較すると安全性が高いことから他の抗がん剤との併用で開発が進行している. 本研究で取り扱った Dep (depsipeptide ; Istodax®) も FDA ではすでに承認され, 国内でも国際共同開発治験が終了し再発又は難治性の末梢 T 細胞リンパ腫 (PTCL) に対して承認申請中であり, まもなく上市予定である. Dep も臨床用薬として使用が予定されていることから人に対する安全性がある程度確認された薬剤であるといえる. このことは, 将来的に既存の抗がん薬との併用化学療法が開発される場合において有利であると考えられるが, 本研究で観察された Dep による 5-FU の感受性増強が動物実験等で同様に観察されるか, HDAC 阻害剤による進行大腸がん患者に対する臨床試験の結果を踏まえてどのような投与量および投与スケジュールが最適であるか十分な検討が必要である.

HCT-116 における Dep による 5-FU 感受性増強メカニズムとしての HDAC 活性低下, p21 発現上昇, TYMS 発現低下, およびカスパーゼ活性増強

HCT-116 において Dep が 5-FU の効果を増大させるメカニズムとして, HDAC 活性低下, p21 発現上昇, TYMS 発現低下, およびカスパーゼ活性増強が観察されたことが重要な知見である.

HDAC 活性の検討では Dep 単独および 5-FU と Dep の併用処理でコントロールの約 3 分の 2 に低下した. Dep に比較し 5-FU と Dep の併用でさらに HDAC 活性が低下することはなかったものの, 多くの遺伝子発現変動に関与する HDAC の活性低下が, 薬剤処理 1 時間という短時間で観察されたことから, 細胞が薬剤に曝露してから早い段階で遺伝子発現制御の変動が起きる可能性が示唆された. 他の HDAC 阻害剤においても, 比較的短時間で TP53 遺伝子が誘導されることが証明されている^{24,32,33}. 興味深いことに Dep の HDAC 阻害作用は TSA とは異なり用量依存性を示さなかった. Dep はプロドラッグであり細胞内に取り込まれ環状構造から直線構造になって HDAC 阻害活性を示す³⁴ことが影響している可能性がある.

HCT-116 細胞の 5-FU への曝露は p21 の発現を上昇させ, 5-FU と Dep の併用は p21 の発現をさらに増強した (図 10). テトラサイクリン誘導性ベクター系を用いた p21 の誘導実験により, p21 が腫瘍細胞における増殖停止の誘導において重要な役割を果たすことが示されている³⁵. また, p21 の重要な役割は, 5-FU の細胞傷害性の重要なメディエーターであると報告されている³⁶. これらの知見からも, 本研究で観察された p21 の発現上昇は細

胞増殖抑制に寄与していると推察される。本研究で行った HCT-116 に対する 5-FU の高濃度 (2.5 μ M, 3.5 μ M, 5 μ M) 処理では濃度依存的な p21 の発現上昇を認め、5 μ M では 6.7 倍の上昇が観察された (図 13)。5-FU (5 μ M) と同等かそれ以上の p21 発現上昇が、5-FU (1.75 μ M) と Dep (1nM) の併用 (p21 の発現が 7.6 倍に上昇) によりもたらされることが確認され、Dep の併用により 5-FU の用量を減少できる可能性が示唆された。一方、5-FU による p21 の発現上昇は p53 依存性であるとされ³⁷⁾、5-FU 処理によるタンパク発現レベルのタイムコースを示した報告³⁵⁾では p21, p53 とともに 48 時間がピークとされている。本研究の遺伝子発現レベルの解析 (マイクロアレイ, 定量的リアルタイム PCR) はすべて薬剤処理 7 日間の時点で行っているため、最終的に細胞増殖抑制が観察された時点での遺伝子発現状態を示している。図 16 に HCT-116 における 5-FU (1.75 μ M) +Dep (1nM) 7 日間作用による TP53 経路の遺伝子変動 (表 2 に示したマイクロアレイ解析結果による) をマッピングしたものを示す。TP53 の下流にあり、TP53 が発現調節を行っていると思われるターゲット遺伝子の多くが発現上昇し、TP53 経路の活性化が示唆された。TP53 自体が大きく発現低下するメカニズムは明らかではないが、5-FU による DNA ダメージや HDAC

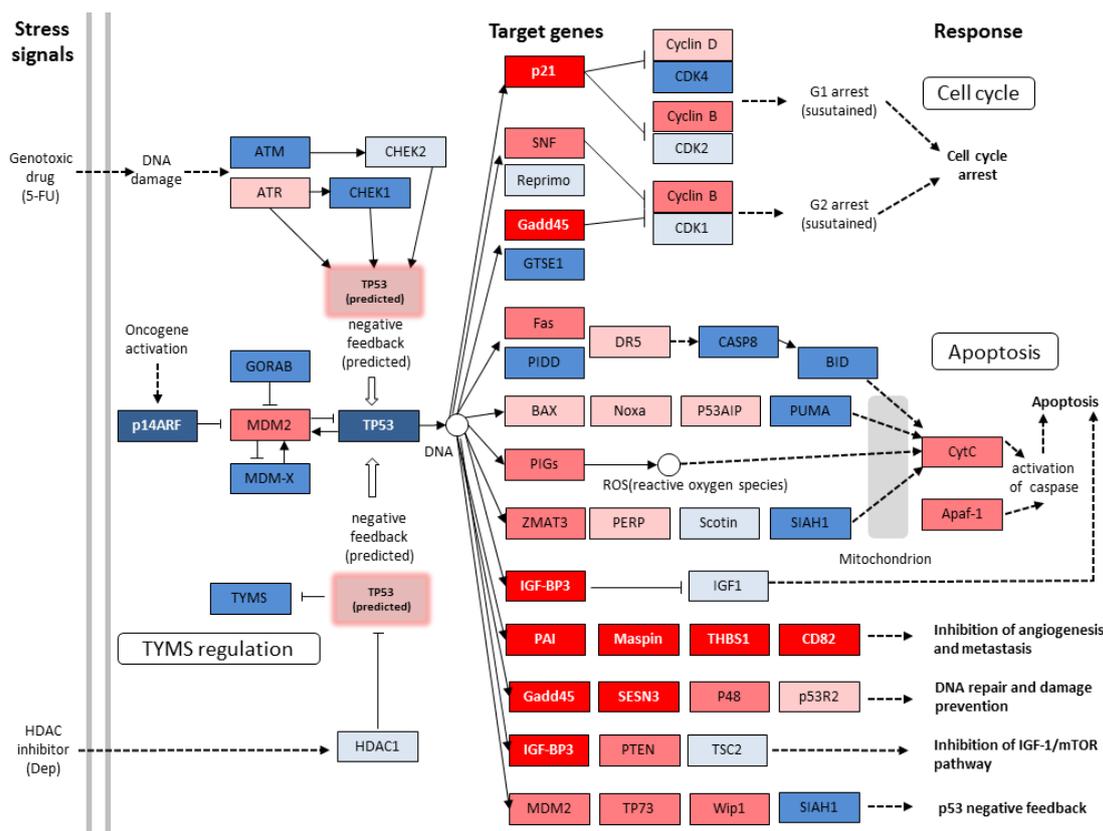


図 16. HCT-116 における 5-FU (1.75 μ M) +Dep (1nM) 7 日間作用による TP53 経路の遺伝子変動 (マイクロアレイ解析結果による) ■ (濃赤) は 3 倍以上の発現上昇, ■ (赤) は 1.5~3 倍の発現上昇, ■ (薄桃) は 1.5 倍未満の発現上昇, ■ (水色) は 1.5 倍未満の発現低下, ■ (青) は 1.5~3 倍の発現低下, ■ (濃青) は 3 倍以上の発現低下を示す。なお、TP53 の発現上昇後のネガティブフィードバックによる下方制御は予測に基づく。

活性低下などにより発現上昇し、その後ネガティブフィードバックにより著しく発現低下したと考えることは本研究で示された遺伝子発現変動を考える上で矛盾しない。

TYMS の発現低下も 5-FU と HDAC 阻害剤併用効果に関する多くの先行研究²³⁾⁻²⁶⁾と同様に観察されたが、TP53 の発現上昇が TYMS の発現に対して負の調節がされるという報告³⁸⁾もあり、同様の機序が起きている可能性がある。本研究で行った HCT-116 に対する 5-FU の高濃度 (2.5 μ M, 3.5 μ M, 5 μ M) 処理では濃度依存的な TYMS の発現低下を認め、5 μ M ではコントロールの 59%に低下した (図 13)。5-FU (5 μ M) と同等の TYMS 発現低下が、5-FU (1.75 μ M) と Dep (1nM) の併用 (TYMS の発現が 58%に低下) によりもたらされ、p21 発現上昇の結果とよく一致した。

HCT-116 における 5-FU と Dep 併用処理によるカスパーゼ活性化の主な経路は不明であるが、CytC, Apaf-1 といったカスパーゼ活性化経路の重要な遺伝子が発現上昇していることが本研究で示された。Dep は BCL2 ファミリーメンバーの発現を抑制することにより、ミトコンドリア経路を介して小細胞肺癌細胞においてカスパーゼ依存性アポトーシスを誘導するという報告³⁹⁾があるがその可能性も考えられる。

今回観察された p21 の発現上昇、TYMS の発現低下、カスパーゼ活性上昇が TP53 経路の活性化に基づくことを明確に裏付けるためには TP53 経路の遺伝子発現レベルのタイムコースをとること、TP53 のノックダウンあるいは TP53 変異細胞株を用いて同様の薬剤処理をした場合の阻害効果の変動について検討する必要がある。

5-FU と Dep 併用処理による MHC クラス II 遺伝子の発現上昇

マイクロアレイおよびそれに引き続き行った遺伝子オントロジー解析により、5-FU と Dep の併用が MHC クラス II 遺伝子、すなわち HLA-DPB1, HLA-DQB1, HLA-DRA, および HLA-DRB1 の mRNA レベルを著しく増加させることを明らかにした (HLA-DRA で 6.7 倍)。定量的リアルタイム PCR による HCT-116 における MHC クラス II 遺伝子の発現解析でも同様の結果が得られ、他の大腸癌細胞株 (HT-29, SW48) でも HLA-DRA の発現上昇が観察された (HT-29 で 5.5 倍, SW48 で 786 倍)。HCT-116 に対する 5-FU の高濃度 (2.5 μ M, 3.5 μ M, 5 μ M) 処理でも HLA-DRA の発現上昇は観察されたものの 5-FU と Dep の併用に比較して軽度であった (5 μ M で 1.9 倍)。非小細胞肺癌細胞においては HDAC 阻害剤 entinostat による MHC クラス II 遺伝子の発現上昇の報告⁴⁰⁾がある。また、胆管癌細胞に対する、gemcitabine と valproic acid の併用効果とマイクロアレイ解析を行い、併用処理により MHC クラス II 遺伝子の発現上昇を示した Iwahashi らの報告⁴¹⁾と一致する。MHC クラス II 遺伝子発現の顕著な活性化は 1.75 μ M の 5-FU 単独または 1nM の Dep 単独処理では認められず、5-FU と Dep の併用処理した場合のみ観察され、これと同時に p21 の発現上昇、TYMS の発現低下、およびカスパーゼ 3/7 活性化を引き起こした。MHC クラス II 発現上昇は、細胞周期の停止、DNA 合成阻害、および細胞アポトーシスプロセスと

何らかの関係を有する可能性がある。

Ting ら⁴²⁾ は NF- κ B, CREB, および RFX を含む DNA 結合因子および補体活性化因子, CIITA, 一般的な転写因子, および P300 / CBP 関連因子 (PCAF) を含むヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) を介し MHC クラス II 遺伝子が発現制御されることを著している。MHC クラス II 転写の正の調節因子として, ヒストンアセチル化が重要であるという報告もある^{43,44)}。本研究の網羅的遺伝子発現解析では, 5-FU と Dep の併用により PCAF, CREB3, CREB5, および CIITA の発現上昇が観察された (表 5)。大腸癌細胞株 Colon26 における検討では HDAC 阻害剤は CIITA 非依存性に MHC クラス II 遺伝子発現を増強するが, 他の癌細胞種では CIITA 依存的に発現増強することが報告⁴⁵⁾されている。本研究では 5-FU と Dep の併用により HAT である PCAF とともに CIITA, CREB の発現上昇が認められたことから, これらが MHC クラス II 遺伝子の著しい発現上昇の機序になることが推察される。一方, PCAF は, 肝細胞癌細胞株において抗アポトーシス細胞プロセスに対抗することによって癌細胞のアポトーシスを加速する⁴⁶⁾、乳癌細胞株において p53 の共活性化因子である⁴⁷⁾と報告されている。また, 一般的に HDAC 阻害剤による p21 発現上昇は p53 に非依存的である⁴⁸⁾とされているが, その機序に関連して PCAF は histone methyltransferase である G9a と関連して p21 の発現制御に関与しているという報告⁴⁹⁾がある。以上のことを本研究結果に合わせると, 薬剤曝露直後から起きていると予想される TP53 活性化, TP53 が下方制御された薬剤処理 7 日間後における p21 発現上昇, および

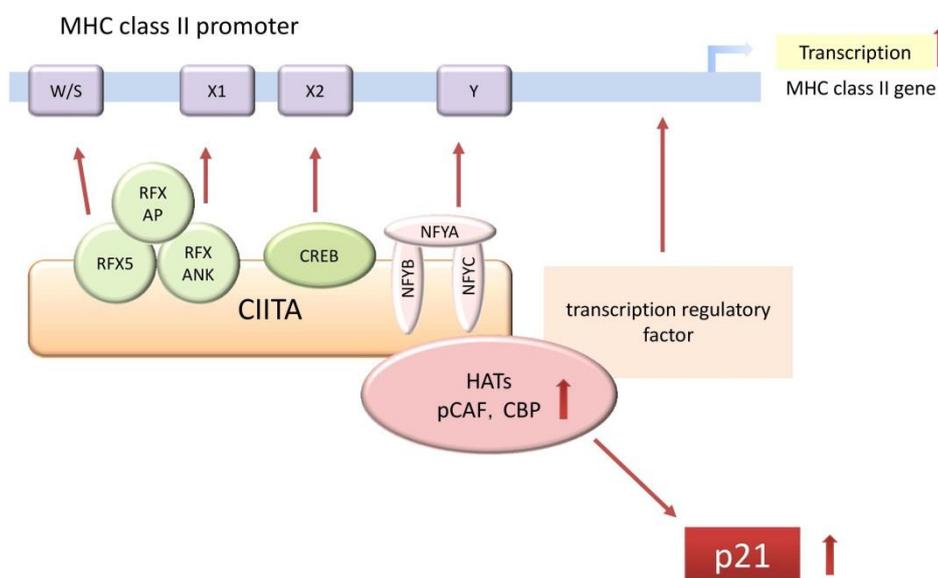


図 15. MHC クラス II プロモーターのトランスクリプトームモデルと HAT を介した MHC クラス II, p21, p53 遺伝子発現上昇メカニズムに関する予測図

MHC クラス II 遺伝子発現上昇は, HAT である PCAF の発現上昇が関与している可能性が考えられる (図 15)。これらのことを裏付けるためには PCAF, CBP などの HAT, CIITA, CREB などの MHC クラス II 遺伝子転写調節因子を特異的に阻害あるいは, ノックダウン

することによって MHC クラス II, p21, TP53 遺伝子発現が変化するかを検証する必要がある。

さらに、MHC クラス II 遺伝子発現の臨床的な意義として胃癌モデルを用いた検討では HLA-DR 抗原の発現と腫瘍細胞の分化との間の密接な相関が示され^{50,51)}、MHC クラス II 遺伝子の発現低下は、早期結腸直腸がんの転移能と関連する⁵²⁾ことも報告されており、腫瘍細胞中の MHC クラス II 遺伝子発現上昇はがんの予後良好のマーカーの一つであるとされている。本研究で観察された MHC クラス II 遺伝子発現上昇が癌細胞増殖抑制と関連性を有するという可能性と一致する。5-FU ベースの化学療法後の MHC クラス II 遺伝子発現誘導が効果予測マーカーとなり得る可能性があるが、*in vivo* で同様の遺伝子発現変動が起きるか、もし、効果予測マーカーとなり得る場合でも腫瘍細胞内の遺伝子発現変動をどのように評価するかなどさらなる検討が必要である。

5. 小括

HDAC 阻害剤 Dep 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確認された。また、HCT-116 における感受性増強は、p21 の発現上昇によって引き起こされる細胞周期停止、TYMS の発現低下、カスパーゼ-3/7 活性化によって示されるアポトーシス誘導の誘発を介して起こることが示唆され、これらには TP53 経路の活性化、およびヒストンアセチルトランスフェラーゼである PCAF の活性化を背景とする可能性がある。さらに、HCT-116 における感受性増強は、MHC クラス II 遺伝子発現上昇と並行して観察されたが、これらには PCAF をはじめとした MHC クラス II 遺伝子転写制御因子の発現上昇を背景とする可能性がある。

第3章 HDAC 阻害剤 depsipeptide 併用による 5-FU の効果増強に関連する周辺事象の検討

1. 緒言

第2章では、ヒト大腸癌細胞 HCT-116 において、HDAC 阻害剤 depsipeptide (Dep) は主要組織適合遺伝子複合体クラス II (MHC class II) および p21 遺伝子発現レベルの上昇、TYMS の発現レベル低下、カスパーゼ 3/7 活性化を伴い 5-フルオロウラシル (5-FU) の抗腫瘍活性を増強することについて述べた。

第2章では Dep の IC₅₀ レベルの濃度をもって 5-FU との併用を行ったが、HDAC 阻害剤単独では細胞毒性を起こさない低濃度域において 5-FU の効果増強を誘導する可能性についても検討の価値があると考えられる。ここでは、Dep に加え医薬品としての承認には至っていないものの、高い抗腫瘍活性の報告がある apicidin および oxamflatin についてもあわせて検討を行うこととした。apicidin は真菌の代謝産物から生成された HDAC 阻害剤であり、p21 およびゲルソリンの誘導を介して腫瘍細胞の増殖を阻害すると報告されている⁵³⁾。oxamflatin はヒドロキサム酸基を有する芳香族スルホンアミド誘導体であり、NIH3T3 細胞の形態学的突然変異を誘導する化合物として化学ライブラリから同定された。腫瘍細胞に対しては p21 およびゲルソリンの誘導を介して増殖を阻害すると報告されている⁵⁴⁾。

さらに、Dep は構造として環状ペプチドを持つ薬剤であるが、環状ペプチドはその特殊な化学構造により、天然ペプチドよりも生体内安定性が高く、標的への親和性も高いために、特異的な薬効を有していると考えられている⁵⁵⁾。環状ペプチド構造を有する医薬品としては cyclosporin A, bacitracin などがある。Dep の 5-FU 抗腫瘍効果増強作用が環状ペプチド構造に由来するものであるとすれば興味深い。cyclosporin A は、真菌が産生する環状ポリペプチド抗生物質の一つであり、1969 年にノルウェーの土壤に含まれていた *Tolypocladium inflatum* から発見された⁵⁶⁾。D-アミノ酸を 1 つ含む 11 のアミノ酸からなる。T リンパ球によるインターロイキン-2,4,5,13 やインターフェロン- γ などのサイトカイン転写を特異的かつ可逆的に抑制し、ひいてはサイトカイン産生と遊離を抑制するが、これはカルシニューリンによる細胞内情報伝達阻害によると考えられている。臨床では臓器移植による拒絶反応の抑制や自己免疫疾患の治療に使用される。ヒト大腸癌細胞においてはカルシニューリンパスウェイに依存せず細胞周期の進行を遅らせ、ネクロシスを誘導する作用⁵⁷⁾、また、p21 の発現上昇と PCNA (proliferating cell nuclear antigen) の発現低下を伴って細胞増殖抑制を示す⁵⁸⁾ ことについて報告がある。

bacitracin は枯草菌が産生する抗生物質で、バシトラシン A を主成分とする環状ポリペプチドの混合物である。細菌の細胞壁内膜を取り巻くペプチドグリカンの構成要素を支持する分子の脱リン酸化反応を妨げ、これにより細胞壁合成を阻害することによって抗菌作用を示す⁵⁹⁾。

本章では、第2章で述べた5-FUとDepの併用効果についての知見を補完するために、低濃度HDAC阻害剤併用による5-FU抗腫瘍活性の変化、Depと同様の環状ペプチド構造をもつ薬剤と5-FUの併用効果およびMHC class II遺伝子の発現変動について検討を行った。

2. 材料および方法

2-1 細胞培養および試薬

ヒト大腸癌細胞 HCT-116 (no CCL-247, アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC), Manassas, VA, USA) を, 10%ウシ胎児血清 (HyClone, South Logan, VT, USA) および1% penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) を添加したダルベッコ修飾イーグル培地 (DMEM; 4.5g/L D-グルコース; Gibco)にて, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養, 継代した. apicidin と oxamfatin は Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), cyclosporin A と bacitracin は和光純薬株式会社 (大阪, 日本), 5-FU は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) からそれぞれ購入した. 使用された他のすべての試薬は, 入手可能な高純度のものを使用した.

2-2 薬剤曝露

コロニー形成阻害アッセイで用いた5-FUの濃度は0.625, 0.875, 1.25, 1.75 および2.5 μ Mであった. 5-FUとの併用で使用したDepは1nM, apicidinは0.5 μ M, oxamfatinは0.1 μ Mであった. 環状ペプチド併用実験ではcyclosporin A単剤0.5 μ M, bacitracin単剤1M, 5-FUとの併用では5-FU (1.25 μ M) +cyclosporin A (0.5 μ M) またはbacitracin (1M), 5-FU (1.75 μ M) +cyclosporin A (0.5 μ M) またはbacitracin (1M) を用いた.

2-3 コロニー形成アッセイ

HCT-116をトリプシン処理後計数し, 20,000細胞/60-mm ディッシュでコロニー形成アッセイのために播種した. 7日間のインキュベーション後, コロニーをクリスタルバイオレットで染色し, 陽性コロニーの数を数えた. 50個を超える細胞を含むコロニーを陽性とみなして計数し, 各アッセイをトリPLICATEで別日に3回実施した.

2-4 クリスタルバイオレットアッセイ

HCT-116 細胞をトリプシン処理し後計数し, 6 ウェルプレートに 15,000 細胞/ウェルで播種した. 7 日間のインキュベーション後, 培地を除去し, 接着細胞を 10% ホルムアルデヒド (in PBS) でプレートに固定した. 次いで, 細胞を 0.5% クリスタルバイオレット水溶液で染色し, 33% 酢酸水溶液で色素を溶出させた. マイクロプレートリーダー Infinite F500 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) を用いて 550nm での吸光度を測定した. 各アッセイはトリPLICATEで別日に 3 回実施した.

2-5 RNA 抽出および定量的リアルタイム PCR

3つの独立した HCT-116 培養物から RNeasy Mini キット (Qiagen, Dusseldorf, Germany) を使用し, トータル RNA を抽出し, 1 μ g を cDNA synthesis kit (Roche, Basel, Switzerland) に使用した. 1 本鎖 cDNA を用いて, 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を用いてリアルタイム PCR を実施した. HLA-DRA の増幅プライマーの配列を表 1. に示す.

2-6 統計解析

データは, 平均 \pm 標準誤差 (SEM) として表し, 一元配置分散分析 (ANOVA), 事後検定として Tukey-Kramer 検定を行い統計学的有意性について分析した. P 値 0.05 未満を統計学的に有意な結果を示すとした.

3. 結果

3-1 低濃度 HDAC 阻害剤併用による HCT-116 の 5-FU に対する細胞感受性

HDAC 阻害剤 depsipeptide, apicidin, oxamflatin の HCT-116 に対する IC₅₀ はそれぞれ 1.09nM, 5.60 μ M, 0.76 μ M であった. HDAC 阻害剤単独では細胞増殖阻害作用を示さない濃度 (概ね IC₅₀ の 1/10 程度) を 5-FU と併用させた. 図 16A, B, C は, それぞれ Dep, apicidin, oxamflatin と 5-FU の併用による用量反応を示す. 0.1nM Dep の併用では 5-FU 濃度 0.875 および 1.25 μ M レベルで 5-FU の感受性をそれぞれ 10.8%, 15.1%低下させることが観察され, これは統計学的に有意であった. 0.05 μ M apicidin の併用でも同様に 5-FU 濃度 0.625 および 1.25 μ M レベルで 5-FU の感受性低下を示す傾向が見られたが統計学的に有意ではなかった. 0.1 μ M oxamflatin の併用では 5-FU 濃度のいずれのレベルにおいても感受性変動を示さなかった.

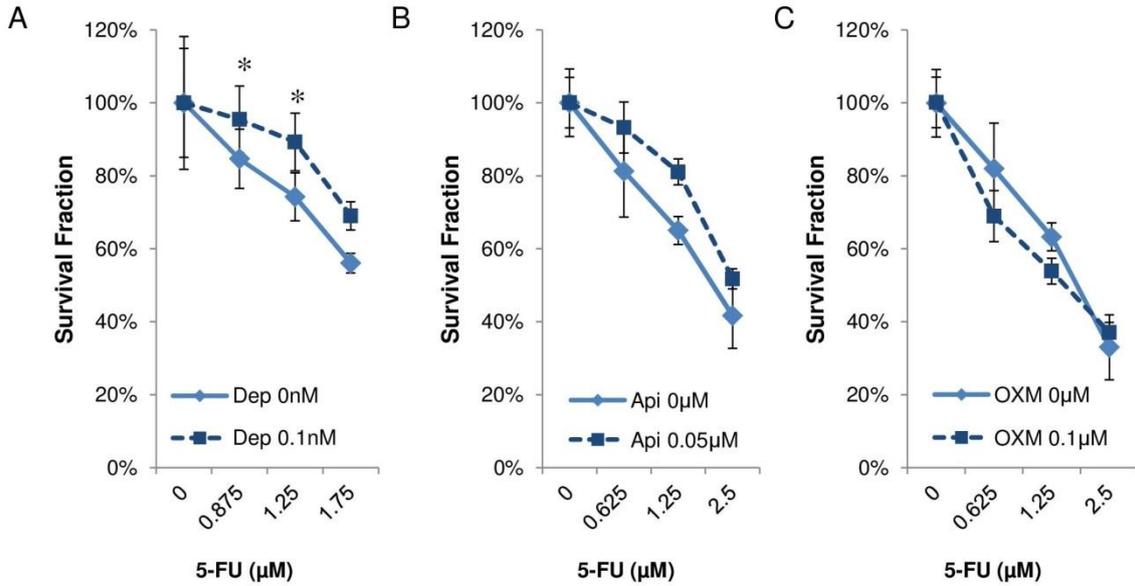


図 16. HCT-116 に対する (A) 5-FU と Dep 併用, (B) 5-FU と apicidin (Api) 併用 (C) 5-FU と oxamflatin (OXM) 併用によるコロニー形成能阻害効果. x 軸は薬剤濃度を表し, y 軸は生存率 (すなわち, 5-FU 0μM に対するコロニー形成能) を表す. * P < 0.05 (対 HDAC 阻害剤 0nM または 0μM)

3-2 環状ペプチド併用による HCT-116 の 5-FU に対する細胞感受性

環状ペプチド cyclosporin A, bacitracin の HCT-116 に対する IC_{50} はそれぞれ $0.56\mu M$, $1.10\mu M$ であった. cyclosporin A, bacitracin の IC_{50} 付近の濃度 (それぞれ $0.5\mu M$, $1\mu M$) と 5-FU の併用を行ったが, 5-FU 濃度 1.25 , $1.75\mu M$ いずれのレベルにおいても HCT-116 に対する 5-FU の増強作用は示さなかった (図 17A, B).

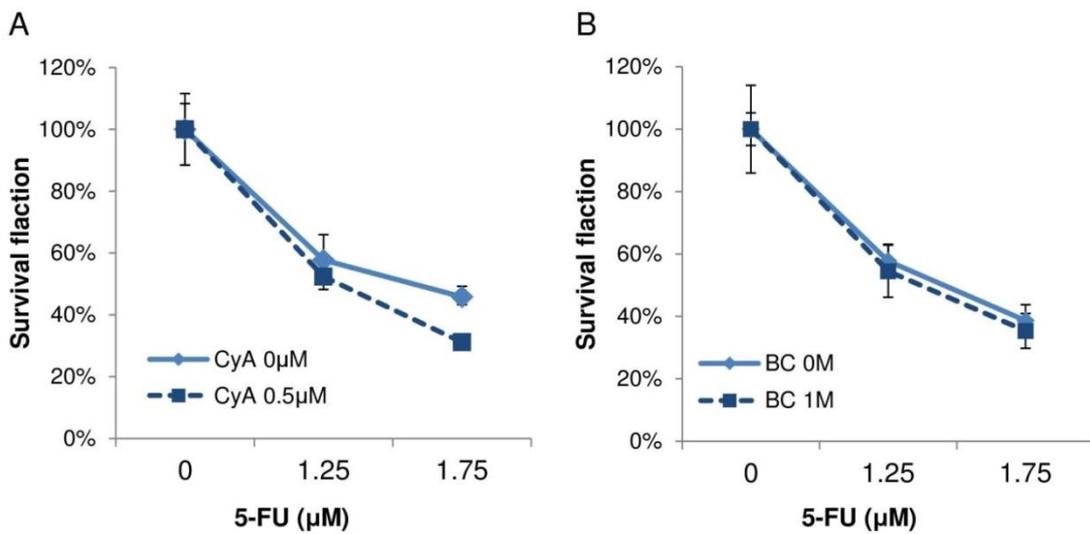


図 17. HCT-116 に対する (A) 5-FU と cyclosporin A (CyA) 併用, (B) 5-FU と bacitracin (BC) 併用による細胞増殖阻害効果. x 軸は薬剤濃度を表し, y 軸は生存率を表す.

3-3 HCT-116 における 5-FU (1.75 μ M) 単独, cyclosporin A (0.5 μ M) 単独および 5-FU (1.75 μ M) + cyclosporin A (0.5 μ M) 併用作用による HLA-DRA 遺伝子の発現解析

5-FU 単独, Dep 単独, および 5-FU と cyclosporin A (CyA) の併用で処理した HCT-116 細胞において, qRT-PCR により MHC クラス II 遺伝子である HLA-DRA の発現レベルを調べた (図 18). 溶媒コントロールに比べ CyA 単独では変動なく, 5-FU と CyA の併用で 1.5 倍とわずかに増加した ($P < 0.01$).

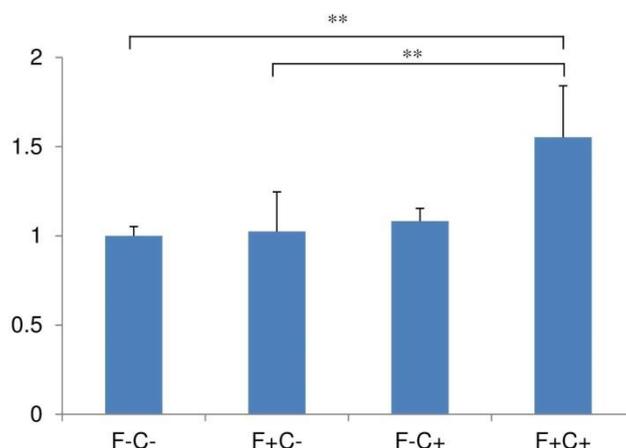


図 18. HCT-116 における HLA-DRA 遺伝子発現変動を示す. 溶媒コントロール (F-C-), 5-FU (1.75 μ M) 単独 (F+C-), CyA (0.5 μ M) 単独 (F-C+), 5-FU (1.75 μ M) + CyA (0.5 μ M) 併用 (F+C+) による処理を表す. mRNA レベルを qRT-PCR によって評価し, 各点での ACTB mRNA レベルによって補正した. y 軸は, ACTB mRNA に対する目的遺伝子の mRNA レベルを表す. ** $P < 0.01$ は有意差を示す.

4. 考察

低濃度 HDAC 阻害剤併用による HCT-116 の 5-FU に対する細胞感受性増強の可能性について検討したが, IC_{50} の 10%程度 of Dep, apicidin, oxamflatin を併用しても 5-FU の効果増強は観察されなかった. むしろ, Dep および apicidin では 5-FU 濃度 0.625~1.25 μ M レベルで感受性低下を示す傾向が見られ, Dep では統計学的に有意であった. これら低濃度 HDAC 阻害剤の作用としては, 標的は不明であるものの細胞増殖を促進する方向へ遺伝子発現制御が行われている, あるいは 5-FU の作用機序を低下させる相互作用が起きていることが原因であると推測される. HDAC 阻害剤のひとつであるポリノスタットの併用はヒトリンパ球腫瘍細胞における Brentuximab vedotin の有効性を低下させるという報告もある⁶⁰. この相互作用メカニズムには Brentuximab vedotin がターゲットとする CD30 の下方制御が関連しているとしている. FDA で承認され皮膚 T 細胞リンパ腫治療に使用されて

いる Dep (Istodax®) の添付文書情報によると、14 mg/m² を 4 時間以上かけて点滴静注投与した際の最高血中濃度 (C_{max}) は 377 ng/mL (697nM) とされているが、併用効果について述べた前章の Dep 濃度 1nM はこの約 700 分の 1 に相当する。癌細胞レベルで毒性を示す濃度であっても、生体内では必ずしも毒性が問題にならない濃度であることも考えられる。以上のことから、今後、5-FU と Dep の併用効果が *in vivo* で検討される場合は Dep の作用濃度が極めて重要である。

環状ペプチド併用による HCT-116 の 5-FU に対する細胞感受性変動に関する検討では、今回使用した cyclosporin A, bacitracin とともに併用効果増強という点では否定的な結果となった。また、MHC class II である HLA-DRA 遺伝子の発現レベルは 5-FU と cyclosporin A の併用において 1.5 倍とわずかに上昇したが、5-FU と Dep の併用に比べ軽度であった。cyclosporin A と抗がん剤の併用効果については、P 糖タンパクを高発現するラット大腸癌細胞において cyclosporin A の併用でドキソルビシン、ダウノルビシンに対する感受性が増強されたが、シスプラチンに対する感受性は増強されなかったという報告がある⁶¹⁾。これは cyclosporin A の P 糖蛋白阻害により抗がん剤の P 糖蛋白を介した排出が抑制されたためと考えられている。また、ヒト胃癌細胞において cyclosporin A は、NF-κB 活性化の阻害によりドセタキセル誘発アポトーシスを増強するという報告がある⁶²⁾。本研究で観察された結果とこれらの情報を踏まえると、Dep による HCT-116 の 5-FU に対する細胞感受性増強作用は、環状ペプチド構造物質の併用によりもたらされるものではないことが推察される。

5. 小括

0.1nM Dep をはじめとする低濃度 HDAC 阻害剤併用による HCT-116 の 5-FU に対する細胞感受性増強の可能性について検討したが、併用効果は認められなかった。しかし、併用効果を示した 1nM Dep も Dep の臨床血中濃度に対しては極めて低濃度であり、5-FU の感受性増強作用薬剤として有望であると考えられる。一方、5-FU は Dep と同様の環状ペプチド併用では感受性増強を示さないことが示された。

第4章 総合考察および結論

本研究で得られた知見は次のとおりである。HCT-116 に対する 5-FU+Dep の効果増強メカニズムの予測を図 19 に示す。

- 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。
- HCT-116 において 1nM Dep 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 μ M) と Dep (1nM) 処理の HDAC 活性低下は Dep 単剤と同等であった。
- HCT-116 において Dep が 5-FU の効果を増大させるメカニズムとして p21 発現上昇, TYMS 発現低下, およびカスパーゼ活性増強が観察された。これらには HDAC 活性の低下による TP53 発現上昇後の TP53 経路の活性化, TP53 および p21 制御因子とされる HAT のひとつである PCAF の発現上昇が背景にある可能性がある。
- HCT-116 における感受性増強は MHC クラス II 遺伝子発現上昇と並行して観察された。
- 0.1nM Dep などの低濃度 HDAC 阻害剤併用による HCT-116 の 5-FU に対する細胞感受性増強の可能性について検討したが、併用効果は認められなかった。
- 5-FU との併用効果を示した 1nM Dep は Dep の臨床血中濃度に対して、約 700 分の 1 と極めて低濃度であった。
- Dep と同様の環状ペプチド構造を持つ cyclosporin A, bacitracin と 5-FU 併用では感受性増強を示さなかった。また、MHC class II 遺伝子の発現上昇は軽度であった。

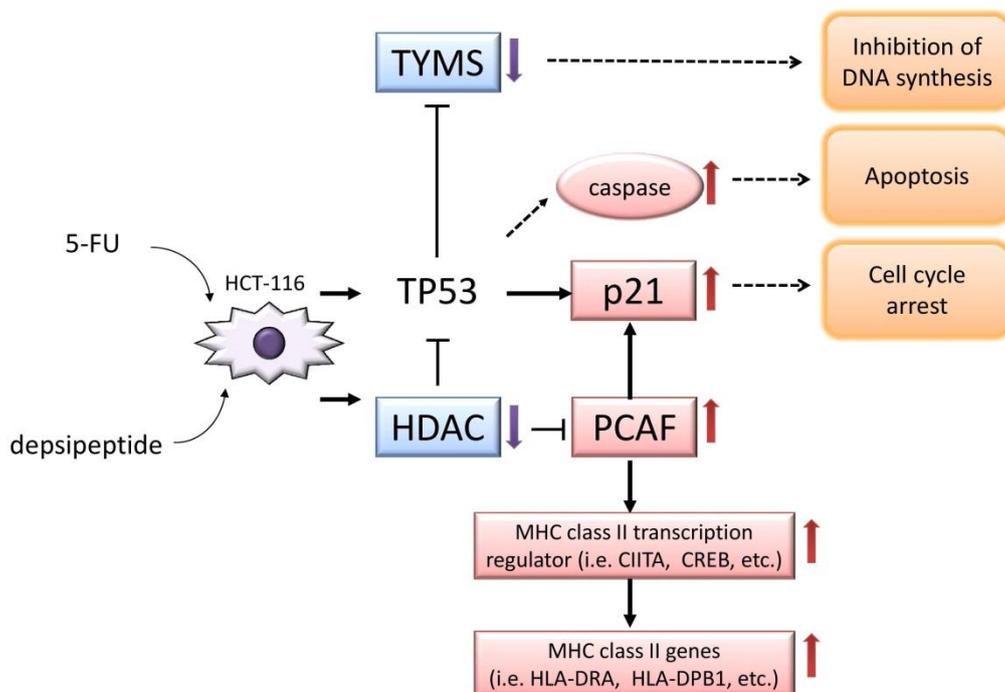


図 19. HCT-116 に対する 5-FU+Dep の抗腫瘍効果増強メカニズムの予測

このように、本研究では 5-FU と Dep 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。かつては、MHC クラス I 分子はほとんどすべての細胞に発現しているが、MHC クラス II 分子は抗原提示機能を有するマクロファージや樹状細胞といった、ある特定の免疫担当細胞に発現するものと考えられ、上皮細胞や固形癌細胞における存在性や機能についてはあまり明らかになっていなかった。近年、結腸直腸癌腫における HLA クラス II 抗原発現は良好な予後マーカーであるという報告⁶³⁾、正常な結腸粘膜および腺腫と比較した免疫組織学的および組織病理学的分析により、MHC クラス II 発現の消失は、腫瘍浸潤性 T 細胞の減少および結腸直腸癌の転移能の増加と関連するという報告⁶⁴⁾などがあり、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が主に臨床データより示されている。これらのことから、本研究で観察された MHC クラス II 遺伝子の発現レベルを評価することは、大腸がんの抗がん剤治療による細胞増殖抑制の目印として活用が期待できる。

以上より、大腸がんに対する 5-FU 治療における Dep 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。

謝辞

本研究の機会を与えていただき、遂行するにあたり終始ご懇篤なご指導とご助言を賜りました、岩手医科大学薬学部 薬物代謝動態学講座 小澤正吾 教授に深く感謝の意を捧げます。また、本研究の遂行にあたり多大なるご助言を賜りました岩手医科大学薬学部臨床医化学講座 那谷耕司 教授，生体防御学講座 大橋綾子 教授，情報薬科学講座 西谷直之 准教授，幅野渉 准教授に深謝いたします。さらに、本研究の実施にあたりご協力をいただきました岩手医科大学薬学部薬物代謝動態学講座 蒲生俊恵 助教，寺島潤 助教，博多修子 氏に感謝申し上げます。

引用文献

1. がんの統計 '15, 公益財団法人 がん研究振興財団, 2016
2. Longley DB, Harkin DP and Johnston PG: 5-fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3: 330-338, 2003.
3. 新臨床腫瘍学 がん薬物療法専門医のために (改訂第4版), 日本臨床腫瘍薬学会編, 南江堂, 2015
4. Meyerhardt JA and Mayer RJ: Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 352: 476-487, 2005.
5. Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, Petrelli N, Roth A, Schmoll HJ, Tveit KM and Gibson F: A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 14: 1-10, 2015.
6. Tsai HC and Baylin SB: Cancer epigenetics: Linking basic biology to clinical medicine. *Cell Res* 21: 502-517, 2011.
7. Dokmanovic M, Clarke C and Marks PA: Histone deacetylase inhibitors: Overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 5: 981-989, 2007.
8. Prince HM, Bishton MJ and Harrison SJ: Clinical studies of histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res* 15: 3958-3969, 2009.
9. Subramaniam D, Thombre R, Dhar A and Anant S: DNA methyltransferases: A novel target for prevention and therapy. *Front Oncol* 4: 80, 2014.
10. Minucci S and Pelicci PG: Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 38-51, 2006.
11. Liu S, Cheng H, Kwan W, Lubieniecka JM and Nielsen TO: Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest, apoptosis, and differentiation in clear cell sarcoma models. *Mol Cancer Ther* 7: 1751-1761, 2008.

12. Humeniuk R, Mishra PJ, Bertino JR and Banerjee D: Epigenetic reversal of acquired resistance to 5-fluorouracil treatment. *Mol Cancer Ther* 8: 1045-1054, 2009.
13. Keshelava N, Davicioni E, Wan Z, Ji L, Sposto R, Triche TJ and Reynolds CP: Histone deacetylase 1 gene expression and sensitization of multidrug-resistant neuroblastoma cell lines to cytotoxic agents by depsipeptide. *J Natl Cancer Inst* 99: 1107-1119, 2007.
14. Glaser KB: HDAC inhibitors: Clinical update and mechanism-based potential. *Biochem Pharmacol* 74: 659-671, 2007.
15. Ueda H, Nakajima H, Hori Y, Fujita T, Nishimura M, Goto T and Okuhara M: FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties, and antitumor activity. *J Antibiot (Tokyo)* 47: 301-310, 1994.
16. Ueda H, Nakajima H, Hori Y, Goto T and Okuhara M: Action of FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* no. 968, on Ha-ras transformed NIH3T3 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 1579-1583, 1994.
17. Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee KH, Nishiyama M, Nakajima H, Tanaka A, Komatsu Y, Nishino N, Yoshida M, et al: FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res* 62: 4916-4921, 2002.
18. Bots M and Johnstone RW: Rational combinations using HDAC inhibitors. *Clin Cancer Res* 15: 3970-3977, 2009.
19. Thurn KT, Thomas S, Moore A and Munster PN: Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncol* 7: 263-283, 2011.
20. Stiborová M, Eckschlager T, Poljaková J, Hraběta J, Adam V, Kizek R and Frei E: The synergistic effects of DN A-targeted chemotherapeutics and histone deacetylase inhibitors as therapeutic strategies for cancer treatment. *Curr Med Chem* 19: 4218-4238, 2012.

21. Ikehata M, Ogawa M, Yamada Y, Tanaka S, Ueda K and Iwakawa S: Different effects of epigenetic modifiers on the cytotoxicity induced by 5-fluorouracil, irinotecan or oxaliplatin in colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 37: 67-73, 2014.
22. Lee JH, Park JH, Jung Y, Kim JH, Jong HS, Kim TY and Bag YJ: Histone deacetylase inhibitor enhances 5-fluorouracil cytotoxicity by down-regulating thymidylate synthase in human cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5: 3085-3095, 2006.
23. Tumber A, Collins LS, Petersen KD, Thouggaard A, Christiansen SJ, Dejligbjerg M, Jensen PB, Sehested M and Ritchie J W: The histone deacetylase inhibitor PXD101 synergises with 5-fluorouracil to inhibit colon cancer cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 60: 275-283, 2007.
24. Di Gennaro E, Bruzzese F, Pepe S, Leone A, Delrio P, Subbarayan PR, Avallone A and Budillon A: Modulation of thymidilate synthase and p53 expression by HDAC inhibitor vorinostat resulted in synergistic antitumor effect in combination with 5FU or raltitrexed. *Cancer Biol Ther* 8: 782-791, 2009.
25. Fazzino W, Wilson PM, Labonte MJ, Lenz HJ and Ladner RD: Histone deacetylase inhibitors suppress thymidylate synthase gene expression and synergize with the fluoropyrimidines in colon cancer cells. *Int J Cancer* 125: 463-473, 2009.
26. Wolter F, Akoglu B, Clausnitzer A and Stein J: Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. *J Nutr* 131: 2197-2203, 2001.
27. Chou TC: Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Research* 70:440-446, 2010.
28. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
29. Mi H, Muruganujan A and Thomas PD: PANTHER in 2013: Modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res* 41: D377-D386, 2013.

30. Whitehead RP1, Rankin C, Hoff PM, Gold PJ, Billingsley KG, Chapman RA, Wong L, Ward JH, Abbruzzese JL, Blanke CD: Phase II trial of romidepsin (NSC-630176) in previously treated colorectal cancer patients with advanced disease: a Southwest Oncology Group study (S0336). *Invest New Drugs* 27:469-475, 2009
31. Wilson PM, El-Khoueiry A, Iqbal S, Fazzino W, LaBonte MJ, Groshen S, Yang D, Danenberg KD, Cole S, Kornacki M, Ladner RD, Lenz HJ: A phase I/II trial of vorinostat in combination with 5-fluorouracil in patients with metastatic colorectal cancer who previously failed 5-FU-based chemotherapy: *Cancer Chemother Pharmacol.* 65: 979-988, 2010
32. Henderson C, Mizzau M, Paroni G, Maestro R, Schneider C, Brancolini C: Role of caspases, Bid, and p53 in the apoptotic response triggered by histone deacetylase inhibitors trichostatin-A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *J Biol Chem.* 278: 12579-12589, 2003
33. Yu X, Guo ZS, Marcu MG, Neckers L, Nguyen DM, Chen GA, Schrupp DS: Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 Expression in Lung Cancer Cells by Depsipeptide FR901228. *J Natl Cancer Inst.* 94: 504-513, 2002
34. Chang J, Varghese DS, Gillam MC, Peyton M, Modi B, Schiltz RL, Girard L, Martinez ED: Differential response of cancer cells to HDAC inhibitors trichostatin A and depsipeptide. *Br J Cancer* 106: 116-125, 2012
35. Fang L, Igarashi M, Leung J, Sugrue MM, Lee SW and Aaronson SA: p21Waf1/Cip1/Sdi1 induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53. *Oncogene* 18: 2789-2797, 1999.
36. Geller JI, Szekely-Szucs K, Petak I, Doyle B and Houghton J A: P21Cip1 is a critical mediator of the cytotoxic action of thymidylate synthase inhibitors in colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 64: 6296-6303, 2004.
37. Longley DB, Boyer J, Allen WL, Latif T, Ferguson PR, Maxwell PJ, McDermott U, Lynch M, Harkin DP, Johnston PG: The role of thymidylate synthase induction in modulating p53-regulated gene expression in response to 5-fluorouracil and

- antifolates. *Cancer Res.* 62: 2644-2649, 2002
38. Zhang W, Ramdas L, Shen W, Song SW, Hu L, Hamilton SR: Apoptotic response to 5-fluorouracil treatment is mediated by reduced polyamines, non-autocrine Fas ligand and induced tumor necrosis factor receptor 2. *Cancer Biol Ther.* 2: 572-278, 2003
39. Doi S, Soda H, Oka M, Tsurutani J, Kitazaki T, Nakamura Y, Fukuda M, Yamada Y, Kamihira S and Kohno S: The histone deacetylase inhibitor FR901228 induces caspase-dependent apoptosis via the mitochondrial pathway in small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 3: 1397-1402, 2004.
40. Niesen MI and Blanck G: Rescue of major histocompatibility-DR surface expression in retinoblastoma-defective, non-small cell lung carcinoma cells by the MS-275 histone deacetylase inhibitor. *Biol Pharm Bull* 32: 480-482, 2009.
41. Iwahashi S, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Hanaoka J and Saito Y: Histone deacetylase inhibitor enhances the anti-tumor effect of gemcitabine: A special reference to gene-expression microarray analysis. *Oncol Rep* 26: 1057-1062, 2011.
42. Ting JP and Trowsdale J: Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109 (Suppl): S21-S33, 2002.
43. Beresford GW and Boss JM: CIITA coordinates multiple histone acetylation modifications at the HLA-DRA promoter. *Nat Immunol* 2: 652-657, 2001.
44. Masternak K and Reith W: Promoter-specific functions of CIITA and the MHC class II enhanceosome in transcriptional activation. *EMBO J* 21: 1379-1388, 2002.
45. Magner WJ, Kazim AL, Stewart C, Romano MA, Catalano G, Grande C, Keiser N, Santaniello F and Tomasi TB: Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. *J Immunol* 165: 7017-7024, 2000.
46. Gai X, Tu K, Li C, Lu Z, Roberts LR and Zheng X: Histone acetyltransferase PCAF accelerates apoptosis by repressing a GLI1/BCL2/BAX axis in hepatocellular

- carcinoma. *Cell Death Dis* 6: e1712, 2015.
47. Watts GS, Oshiro MM, Junk DJ, Wozniak RJ, Watterson S, Domann FE, Futscher BW: The acetyltransferase p300/CBP-associated factor is a p53 target gene in breast tumor cells. *Neoplasia* 6: 187-94, 2004
 48. Nakano K, Mizuno T, Sowa Y, Orita T, Yoshino T, Okuyama Y, Fujita T, Ohtani-Fujita N, Matsukawa Y, Tokino T, Yamagishi H, Oka T, Nomura H, Sakai T: Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. *J Biol Chem* 272: 22199-22206, 1997
 49. Oh ST, Kim KB, Chae YC, Kang JY, Hahn Y, Seo SB: H3K9 histone methyltransferase G9a-mediated transcriptional activation of p21. *FEBS Lett.* 588: 685-691, 2014
 50. Ma XC, Hattori T, Kushima R, Terata N and Kodama M: Expression of HLA-class II antigen in gastric carcinomas. Its relationship to histopathological grade, lymphocyte infiltration and five-year survival rate. *Acta Oncol* 33: 187-190, 1994.
 51. Ishigami S, Aikou T, Natsugoe S, Hokita S, Iwashige H, Tokushige M and Sonoda S: Prognostic value of HLA-DR expression and dendritic cell infiltration in gastric cancer. *Oncology* 55: 65-69, 1998.
 52. Fehlker M, Huska MR, Jöns T, Andrade-Navarro MA and Kemmner W: Concerted down-regulation of immune-system related genes predicts metastasis in colorectal carcinoma. *BMC Cancer* 14: 64-75, 2014.
 53. Han JW1, Ahn SH, Park SH, Wang SY, Bae GU, Seo DW, Kwon HK, Hong S, Lee HY, Lee YW, Lee HW: Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21WAF1/Cip1 and gelsolin. *Cancer Res* 60: 6068-6074, 2000.
 54. Kim YB1, Lee KH, Sugita K, Yoshida M, Horinouchi S: Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase. *Oncogene* 18: 2461-2470, 1999.

55. 林剛介, 大城幸紀, 菅裕明: 特殊環状ペプチドの翻訳合成と医薬品探索への展開, 生化学 82: 505-514, 2010.
56. Rühlmann A, Nordheim A: Effects of the immunosuppressive drugs CsA and FK506 on intracellular signalling and gene regulation. *Immunobiology* 198: 192-206, 1997
57. Werneck MB, Hottz E, Bozza PT, Viola JP: Cyclosporin A inhibits colon cancer cell growth independently of the calcineurin pathway. *Cell Cycle* 11: 3997-4008, 2012.
58. Masuo T, Okamura S, Zhang Y, Mori M: Cyclosporine A inhibits colorectal cancer proliferation probably by regulating expression levels of c-Myc, p21(WAF1/CIP1) and proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Lett.* 285: 66-72, 2009.
59. Stone KJ, Strominger JL: Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C55 -isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 3223-3227, 1971
60. Hasanali ZS, Epner EM, Feith DJ, Loughran TP Jr, Sample CE: Vorinostat downregulates CD30 and decreases brentuximab vedotin efficacy in human lymphocytes. *Mol Cancer Ther.* 13: 2784-2792, 2014
61. Van de Vrie W, Gheuens EE, Durante NM, De Bruijn EA, Marquet RL, Van Oosterom AT, Eggermont AM: In vitro and in vivo chemosensitizing effect of cyclosporin A on an intrinsic multidrug-resistant rat colon tumour. *J Cancer Res Clin Oncol.* 119: 609-614, 1993
62. Nakahara C, Nakamura K, Yamanaka N, Baba E, Wada M, Matsunaga H, Noshiro H, Tanaka M, Morisaki T, Katano M: Cyclosporin-A enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of nuclear factor-kappaB activation in human gastric carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 9: 5409-5416, 2003
63. Warabi M, Kitagawa M, Hirokawa K: Loss of MHC class II expression is associated with a decrease of tumor-infiltrating T cells and an increase of metastatic potential of colorectal cancer: immunohistological and histopathological analyses as compared with normal colonic mucosa and adenomas. *Pathol Res Pract.* 196: 807-815, 2000

64. Sconocchia G, Eppenberger-Castori S, Zlobec I, Karamitopoulou E, Arriga R, Coppola A, Caratelli S, Spagnoli GC, Lauro D, Lugli A, Han J, Iezzi G, Ferrone C, Ferlosio A, Tornillo L, Drosler R, Rossi P, Attanasio A, Ferrone S, Terracciano L: HLA class II antigen expression in colorectal carcinoma tumors as a favorable prognostic marker. *Neoplasia* 16: 31-42, 2014