

論 文 概 要

- 論文題目 **The Sirtuin Inhibitor Tenovin-6 Upregulates Death Receptor 5 and Enhances Cytotoxic Effects of 5-Fluorouracil and Oxaliplatin in Colon Cancer Cells**

(ヒト大腸癌細胞に対する sirtuin 阻害剤 tenovin-6 の抗腫瘍効果に関する研究)

- 指導教員

臨床医学系 兵頭 一之介 教授

(所 属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

(氏 名) 上野 卓教

<研究目的>

本邦における結腸直腸癌患者は増加の一途をたどっており、2011年の人口動態調査では日本人癌死因の第3位となっている。切除不能進行・再発結腸直腸癌に対する化学療法は近年目覚ましく進歩しており、従来の殺細胞性抗がん薬である5-FU, oxaliplatin, irinotecanに加え、分子標的薬である抗VEGF抗体、抗EGFR抗体、さらにはmulti-kinase阻害薬が新たに保険承認を受け、生存期間の延長をもたらした。しかし、依然として満足のできる治療成績ではなく、皮膚・神経毒性などの有害事象や薬剤耐性など解決すべき問題も多く、さらなる新規治療薬の開発が必要と考えられる。

これまでの研究で、ヒト癌組織におけるがん抑制遺伝子p53の変異率は約50%と報告されており、p53経路の不活性化が発癌に重要な役割を担っている^[1-3]。p53は多様な分子によりepigeneticな修飾を受けていることが知られており、Sirtuin1 (SIRT1)はp53を負に制御する分子の一つである。SIRT1はclassIIIに属するNAD⁺依存性のhistone deacetylase (HDAC)であり、腫瘍組織中のSIRT1の過剰発現は大腸癌を含め多くの癌種で認められている。また、癌の増殖促進機能を有する可能性も考えられているが^[4]、がんにおけるSIRT1の役割は未だ明らかではない^[5]。

SIRT1阻害剤の一つであるtenovin-6はp53を活性化する薬剤として注目を集めている。Leinらは30000種類のdrug-likeな小分子のうち、p53を活性化する小分子をスクリーニングした後、SIRT1とSIRT2を阻害するものを同定し、tenovin-6と命名した。tenovin-6はヒト悪性黒色腫細胞において*in vitro*及び*in vivo*で良好な抗腫瘍効果を示した^[6-8]。

さらに、tenovin-6はp53野生株のみならず、p53欠失株あるいはp53変異株においても抗腫瘍効果を示しており^[8]、これらの結果から、p53非依存性の経路の存在が予想されていた。また、HDAC阻害剤が、外因性アポトーシス経路のdeath receptor 5 (DR5)を発現誘導するという報告もあることから^[9, 10]、我々はtenovin-6が大腸癌細胞株においてDR5の発現を誘導させ、アポトーシスを引き起こすという仮説を立てた。本研究はその仮説に基づき、大腸癌細胞株に対するtenovin-6単独及び既存の標準治療薬剤との併用での抗腫瘍効果を*in vitro*および*in vivo*にて検証する目的で計画・実行された。

<研究対象>

ヒト大腸癌細胞：p53野生株2種類 (HCT116, LoVo)

p53変異株3種類 (DLD-1, HT29, CaCo2)

コントロールとして用いたその他の細胞株：

ヒト繊維芽細胞株 (MRC5)

<研究方法>

- 1) まず、上記のヒト大腸癌細胞株 5 種類を用い、各細胞株における SIRT1 及び SIRT2 の発現レベルを Western blotting 法にて解析した。また、これら細胞株における SIRT1 及び SIRT2 遺伝子発現について、Quantitative RT-PCR 法にて解析した。
- 2) 次に、p53 野生株 2 種類 (HCT116, LoVo) 及び p53 変異株 3 種類 (DLD-1, HT29, CaCo2) を tenovin-6 と 72 時間共培養し、その抗腫瘍効果について WST-8 assay にて評価した。また、ヒト線維芽細胞株 (MRC5) 及び大腸癌細胞株 (HCT116, DLD-1) について tenovin-6 投与後の細胞増殖抑制効果を比較した。
- 3) 同様に、10 μ M tenovin-6 との共培養 0, 4, 8, 24 時間後におけるアセチル化 p53 およびアポトーシス関連蛋白 (p21^{Waf/Cip1}, DR5, Cleaved PARP) の経時的な発現レベルを Western blotting 法にて解析した。
- 4) 上記の p53 野生株 HCT116 細胞 及び p53 変異株 DLD-1 細胞を 10 μ M tenovin-6 と共培養し、アポトーシスの誘導について Flow cytometry にて解析した。
- 5) また、SIRT1 siRNA を用いて、p53 野生株 HCT116 細胞及び p53 変異株 DLD-1 細胞の SIRT1 発現を抑制後、抗腫瘍効果の有無について WST-8 assay を用い評価し、同時に p21^{Waf/Cip1}, DR5, cleaved PARP の発現レベルについて Western blotting 法を用い解析した。
- 6) 同様に、DR5 siRNA を用いて、p53 野生株 HCT116 細胞の DR5 発現を抑制し、tenovin-6 10 μ M 投与後の抗腫瘍効果の減弱について WST-8 assay で評価した。また、同様の手法で DR5 発現抑制後の tenovin-6 投与による DR5, cleaved PARP, cleaved caspase-3 の蛋白発現レベルの変化について Western blotting 法を用い解析した。
- 8) 更に、上記の p53 野生株 HCT116 細胞を tenovin-6 (2, 5 μ M) と oxaliplatin (2 μ M), 5-FU (2 μ M) あるいは SN-38 (2 nM) と共培養し、併用した薬剤の相互作用について、Chou らの報告した Combination Index (CI)-isobologram 法^[11]にて評価した。
- 9) 最後に、*in vivo* における tenovin-6 の抗腫瘍効果について、HCT116 細胞皮下移植ヌードマウスを用い評価した。p53 野生株 HCT116 細胞浮遊液を 5~6 週齢のヌードマウス右大腿部皮下へ移植し、腫瘍体積の平均値が約 100 mm³ に達した時点で、コントロール群と治療群とに割り付けした。腫瘍皮下移植モデルへの治療群として、tenovin-6 30 mg/kg 投与群, oxaliplatin 5 mg/kg 投与群, tenovin-6 30 mg/kg 及び oxaliplatin 5mg/kg 併用投与群を各々設け (n=6)、週一回投与 (tenovin-6 のみ day11 に追加投与) し、各群の腫瘍容積の評価を行った。コントロール群には同量の DMSO の投与を行った。また、無拘束・自由給水・自由摂食の状態にて、体重変動や異常行動の有無をも観察した。

<研究結果>

p53 野生株 2 種類 (HCT116, LoVo), *p53* 変異株 3 種類 (DLD-1, HT29, CaCo2) すべての大腸癌細胞株において SIRT1 蛋白の高発現及び *SIRT1* 遺伝子増幅が認められた。一方で SIRT2 蛋白及び *SIRT2* 遺伝子の明らかな過剰発現・増幅は認められなかった。これらの細胞株 5 種に対し、tenovin-6 は *p53* 変異の有無に関わらず、顕著な抗腫瘍効果を示した。CaCo2 における IC₅₀ は他の細胞に比較しやや高値であった。また、tenovin-6 のヒト線維芽細胞株 (MRC5) に対する細胞増殖抑制効果は、大腸癌細胞株(HCT116, DLD-1)に比較して有意に低かった。さらに tenovin-6 投与後の大腸癌細胞株でアポトーシスが誘導・活性化されたことが Flow cytometry で確認された。次に、tenovin-6 投与後のアポトーシス関連蛋白(p21^{Waf1/Cip1}, DR5, Cleaved PARP)の発現レベルの経時的な変化について解析したところ、CaCo2 を除く 4 種類の細胞株で明らかな DR5、cleaved PARP の発現誘導が認められた。

また、DR5 siRNA を用い、*p53* 野生株 HCT116 細胞の DR5 発現を抑制した上で、tenovin-6 を投与したところ、control に比較し tenovin-6 の抗腫瘍効果は有意に減弱した。同様に、DR5 の発現抑制後に tenovin-6 を投与した HCT116 細胞の抽出蛋白を解析したところ、control と比較し cleaved PARP, cleaved caspase 3 蛋白発現の減弱が見られた。しかし、*SIRT1* siRNA を用いた、大腸癌細胞株(HCT116, DLD-1)の *SIRT1* 発現抑制実験では、tenovin-6 投与時と同様のアポトーシス関連蛋白の変化は認められなかった。

臨床にて進行直腸大腸癌に対し広く用いられている 5-FU, oxaliplatin, SN-38 (irinotecan の活性代謝物)と tenovin-6 との相互作用について検討を行ったところ、oxaliplatin, 5-FU において相乗効果が見られた。特に oxaliplatin に関しては、併用療法で DR5 発現の増強効果が認められた。HCT116 細胞皮下移植ヌードマウスを用いた動物実験では、control と比較し、oxaliplatin と tenovin-6 治療併用群において腫瘍の増殖が有意に抑制された。tenovin-6 治療群において一頭のみ原因不明で day16 に死亡したが、その他は体重減少・下痢などの明らかな有害事象は見られなかった。

<考察>

我々の実験では、tenovin-6 は大腸癌細胞株に対し強い抗腫瘍効果を示した。これまでの報告の多くでは、tenovin-6 の抗腫瘍効果において *p53* が重要な役割を果たしており、*p53* 非依存の抗腫瘍効果については機序不明とされていた⁸⁾。しかしながら、我々の実験結果から上記 5 種類の大腸癌細胞株では *p53* 遺伝子変異の有無に関わらず IC₅₀ はほぼ同様であった。そのため tenovin-6 の抗腫瘍効果は *p53* 遺伝子変異の有無に依存しないと考えられた。さらに、tenovin-6 投与後の細胞株抽出蛋白を解析したところ、CaCo2 を除く 4 種類の細胞株で DR5 の発現誘導が確認された。また、HCT116 細胞について DR5 を発現抑制したところ、tenovin-6 の抗腫瘍効果の減弱が確認された。これらの結果は、DR5 が tenovin-6 の抗腫瘍効果において重要な役割を担っていることを示している。

5-FU, oxaliplatin, SN-38 と tenovin-6 の併用効果を検討したが、*in vitro* 実験では、tenovin-6

が 5FU 及び oxaliplatin との併用投与で大腸癌細胞株に相乗的な抗腫瘍効果を示し、また *in vivo* 実験でも oxaliplatin との併用でそれを支持する結果が得られた。tenovin-6 と oxaliplatin の組み合わせは大腸癌細胞株に対し優れた抗腫瘍効果を示し、今後の臨床応用に向けた更なる検討が期待された。

<結論>

以上の結果から sirtuin 阻害薬 tenovin-6 は大腸癌細胞株に対し単独もしくは 5-FU や oxaliplatin との併用で強い抗腫瘍効果を示した。今後の大腸癌化学療法において、tenovin-6 は有望な薬剤になり得る可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 307-10.
2. Sherr, C.J. and F. McCormick, *The RB and p53 pathways in cancer*. Cancer Cell, 2002. **2**(2): p. 103-12.
3. Feki, A. and I. Irminger-Finger, *Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **52**(2): p. 103-16.
4. Olmos, Y., J.J. Brosens, and E.W.F. Lam, *Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer*. Drug Resistance Updates, 2011. **14**(1): p. 35-44.
5. Brooks, C.L. and W. Gu, *How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer?* Nat Rev Cancer, 2009. **9**(2): p. 123-8.
6. Alcain, F.J. and J.M. Villalba, *Sirtuin inhibitors*. Expert Opin Ther Pat, 2009. **19**(3): p. 283-94.
7. Brooks, C.L. and W. Gu, *p53 Activation: a case against Sir*. Cancer Cell, 2008. **13**(5): p. 377-8.
8. Lain, S., et al., *Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator*. Cancer Cell, 2008. **13**(5): p. 454-63.
9. Nakata, S., et al., *Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells*. Oncogene, 2004. **23**(37): p. 6261-71.
10. Liu, G., et al., *Salermide up-regulates death receptor 5 expression through the ATF4-ATF3-CHOP axis and leads to apoptosis in human cancer cells*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(7): p. 1618-28.
11. Chou, T.C. and P. Talalay, *Quantitative-Analysis of Dose-Effect Relationships - the Combined Effects of Multiple-Drugs or Enzyme-Inhibitors*. Advances in Enzyme Regulation, 1984. **22**: p. 27-55.