

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 金田 大介

### 論文題目

The histone deacetylase inhibitor OBP-801 has in vitro/in vivo anti-neuroblastoma activity

### 論文内容の要旨

#### 【背景・研究目的】

神経芽腫は小児固形がんの中で、脳腫瘍に次ぐ頻度の高い小児がんである。*MYCN*増幅などの予後不良因子を持った高リスクの神経芽腫は集学的治療をもってしても未だ予後不良であり、新たな治療薬の開発が求められている。ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) は、がん抑制にかかわる遺伝子の転写活性を制御することから、がんに対する分子標的治療薬の開発ターゲットになっており、その阻害薬の開発や臨床応用が始まり、一部疾患では本邦でも認可されたものもある。神経芽腫においても、既存の HDAC 阻害剤での増殖の抑制や分化の誘導の報告が散見される。我々は、新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 OBP-801 の抗腫瘍効果、その基礎メカニズム、神経芽腫治療薬としての可能性を検討した。

#### 【方法】

本研究では、5つのヒト神経芽腫細胞株 (*MYCN*増幅株: IMR32、GOTO、KP-N-RTBM、*MYCN*非増幅株: SK-N-AS、SH-SY5Y) を対象とした。OBP-801 で処理した神経芽腫細胞の細胞増殖、細胞周期状態、タンパク質発現パターン、アポトーシスを調査した。細胞生存率と細胞周期は、WST-8 アッセイとフローサイトメトリーで解析した。アポトーシスは、アネキシン V 染色で検出し、アポトーシス関連タンパク質の発現はウェスタンブロッティングで調べた。OBP-801 の抗腫瘍活性を担癌マウスモデル (皮下 IMR32 異種移植) で検討した。

#### 【結果】

投与効果曲線解析の結果、平均半数阻害濃度値 (IC<sub>50</sub>) は、*MYCN*増幅細胞株の IMR32、GOTO、KP-N-RTBM で 2.2 ± 1.3 nM, 2.1 ± 0.6 nM, 12.3 ± 3.9 nM、*MYCN*非増幅細胞株の SK-N-AS、SH-SY5Y で 3.6 ± 0.4 nM, 2.6 ± 1.2 nM であった。OBP-801 はすべての細胞株で細胞増殖と成長を阻害した。ウェスタンブロッティングでは、OBP-801 はヒト神経芽腫細胞においてヒストン H4 およびヒストンの濃度依存的なアセチル化のマー

カーであるアセチル化ヒストン H4 の蓄積を誘導し、HDAC 阻害剤として働くことが示された。また、OBP-801 は、24 時間処理後、濃度依存的に p21 (CDKN1A) を誘導した。細胞周期と腫瘍の進行の負の制御に極めて重要な役割を果たす Rb (RB1) タンパク質のレベルは、IMR32 では変化しなかったが、SK-N-AS では減少していた。細胞周期関連タンパク質では、有糸分裂のマーカである phospho-histone H3 が投与後 24 時間で濃度依存的に増加した。アポトーシス関連蛋白では、アポトーシスに関与する total caspase-3 が減少し、caspase-3 の活性型である creaved caspase-3 が 24 時間後に濃度依存的に増加した。

マウス異種移植モデルにおいて、腫瘍を有するマウスに OBP-801 (10 mg/kg)、またはベークルを 2 週間にわたり週 3 回静脈内投与した (0、2、4、7、9、11 日目投与)。OBP-801 を投与したマウスは、30 日目に有意な腫瘍増殖の抑制を示した。対照群のマウスと比較して、投与群のマウスは投与中に体重が減少したが、30 日目には体重は同程度であった。治療群マウスの腫瘍は縮小したが、治療終了後に再び腫瘍サイズが大きくなったケースが 5 例中 2 例あった。コントロールの腫瘍と治療群の再増大した腫瘍から組織標本を作製し比較した。OBP-801 で治療して縮小した腫瘍は、病理学的壊死を示した。治療後に再増大した腫瘍においても、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H&E) は神経分化を示さなかったが、コントロールと比較して細胞密度の減少を示した。免疫染色では、分化を反映する S100、シナプトフィジン、クロモグラニン A の発現が高いことが知られている。一般に、異なる検体間のタンパク質発現を比較することは困難であるが、S100、シナプトフィジン、クロモグラニン A の発現が高い場合、分化を反映することが示唆される。残念ながら、S100 やクロモグラニン A の高発現は確認できなかった。シナプトフィジンの発現が対照群より強いことだけは確認できた。この H&E と免疫染色は、OBP-801 が神経突起の増加を誘導することを示したが、OBP-801 分化療法の有効性を証明するものではなかった。

#### 【考察】

以上より、OBP-801 は *MYCN* 増幅株・非増幅株どちらでも比較的低濃度で細胞増殖を抑制した。また、OBP-801 は、HDAC 阻害剤として、p21 (CDKN1A) と phospho-histone H3 を誘導し、神経芽腫細胞の G1 期停止と G2/M 期停止を引き起こし、アポトーシスを誘導した。マウス異種移植モデルにおいて、神経芽腫細胞の増殖を抑制したことから、OBP-801 が神経芽腫患者に対する副作用の少ない有望な治療薬であることを示している。