

## 研究成果報告（概要）

## 1. 研究課題

和文 核内受容体 RAR の分解抑制による新たな細胞制御技術の開発
英文 Development of novel molecules that regulate degradation of retinoid receptors in the cell

## 2. 申請者名(代表研究者)

氏名 湯浅 磨里	ローマ字表記 Mari Yuasa
所属大学・機関名 東京医科歯科大学	英訳表記 Tokyo Medical and Dental University
研究科専攻名・部課名等 生体材料工学研究所 薬化学分野	英訳表記 Department of Organic and Medicinal Chemistry, Institute of Biomaterials and Bioengineering
役職名 助教	英訳表記 Assistant Professor

## 3. 共同研究者（下段 英訳表記）

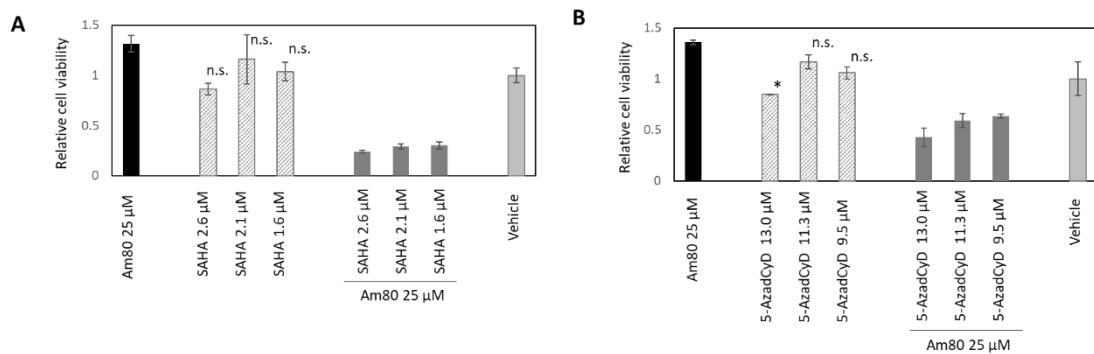
	所属機関名・研究科等名・役職
(氏名) 影近 弘之	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 薬化学分野 教授
(英訳表記) Hiroyuki Kagechika	(英訳表記) Department of Organic and Medicinal Chemistry, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Professor

4.研究について

**研究背景**

核内受容体は、増殖、分化、発生や代謝を司る重要な転写因子であり、乳がん治療薬タモキシフェンのターゲットであるエストロゲンレセプター (ER; estrogen receptor)、2 型糖尿病の治療薬ロシグリタゾンのターゲットであるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ; peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) など、創薬の重要なターゲットとなっている。同じく核内受容体であるレチノイン酸受容体 (RAR; retinoic acid receptor) はレチノイドの作用により、発生や分化を厳密に制御している。また、多くのがん細胞で核内受容体が抑制されているという報告がある。

我々は幾つかのがん細胞でエピジェネティックな変化により RAR  $\alpha$  の発現が抑制されている点に着目した。がん細胞で抑制されている核内受容体を回復させる試みとしては、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤および DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤が多く開発されており、それらを用いることで、がん細胞でサイレンシングされた核内受容体の発現を回復させることを検討した。図 1 に Am80 とエピジェネティック阻害剤の併用による前立腺がん細胞での細胞増殖抑制効果を示す (図.1)。



**図 1. The enhanced growth-inhibitory effect of Am80 with HDAC or DNMT inhibitor on LNCaP cells**  
LNCaP cells were treated singly or in combination as indicated for 72 h, and cell viability was determined by MTT assay.

また、エピジェネティック阻害剤 (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、SAHA) による RAR  $\alpha$  の発現促進が達成された場合でも RAR  $\alpha$  の分解が進み、下位遺伝子の発現が十分に持続しないこともわかってきた。このことを背景に RAR  $\alpha$  の分解プロセス解明と制御法 (制御化合物) の開発を目指した。

**RAR  $\alpha$  分解プロセスの検討**

RAR  $\alpha$  の転写活性は核内受容体自体の分解により抑えられると考えられる。申請者による検討で RAR  $\alpha$  も Am80 による活性化後、分解が起こっていた。そこで Am80 とプロテアソーム阻害剤の併用により分解を抑制したところ RAR  $\alpha$  の分解が抑制され、予想通りがん細胞の増殖抑制が見られた (未発表データ)。分解に関する検討を進めていくなかで、SAHA による発現促進が単なる発現タンパク量の増加だけでなく、核移行の過程に関連していることが分かってきた。この核移行の過程を明らかにすることは、分解機構を理解するために必須であるため、核移行の過程を調査した。

SAHA は広範な HDAC 阻害剤であるため、LNCaP の増殖阻害を指標に、どのクラスの HDAC が RAR の核移行を制御するかアイソタイプ特異的 HDAC 阻害剤で検討した。結果、ClassIIb に属する HDAC が関与することが示唆された。ClassIIb は、HDAC のなかでは特殊な細胞質で HSP90 やチューブリンを脱アセチル化する酵素である (図 2)。

つづいて、HDAC 阻害剤を添加した条件における RAR $\alpha$  のタンパク質量を WB で検討したところ、予想通り Am80、SAHA 単剤では発現量が高く、KD5170 のような特異的ヒストンアセチル化阻害剤との併用では、RAR $\alpha$  のタンパク量が減少していることが分かった(図 3)。

この結果より、アゴニストである Am80 の存在と HDAC6 の阻害により RAR の核内移行が促進され、下位遺伝子の転写活性化を引き起こしたのち分解されている可能性が示唆された。このような結果から分解制御を解明する上では、細胞内の核移行をある程度調節出来る、もしくは核移行にブレーキの掛かっていない細胞株が今後の分解制御化合物のスクリーニング適している事が明らかになった。

これらの結果は以下の論文にまとめた。また「Highlighted paper selected by Editor-in-Chief」にも選ばれた。

*Biol Pharm Bull.* 2019;42(3):448-452.

Class IIb HDAC Inhibition Enhances the Inhibitory Effect of Am80, a Synthetic Retinoid, in Prostate Cancer. Ishigami-Yuasa M, Ekimoto H, Kagechika H.

### 今後の見通し

RAR $\alpha$  の核移行制御を明らかにしたことで、RAR $\alpha$  の発現・移行・分解制御の全体像の解明に近づきつつある。申請時に実験計画書に記載したタンパク質分解の阻害剤による検討と FLRF の各種欠失ミュータントの作成は順調に進んでおり、分解制御化合物の取得に向けて研究を進めている。

図 2. The half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values of HDAC inhibitors in combination with Am80

Combination agent	HDAC inhibitory Classification	Am80 concentration	
		0 $\mu$ M	25 $\mu$ M
SAHA	I, IIb and IV	1.5	1.2
KD5170	I, IIa and IIb	0.51	0.11
MGCD0103	I and IV	0.75	1.4
R306465	I	1.0	1.4

The 50% growth-inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values of various class-specific HDAC inhibitors in combination with Am80 were determined after treatment for 72 h.

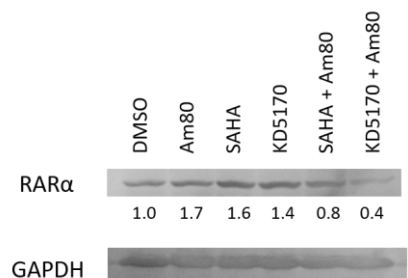


図 3. Changes of RAR $\alpha$  protein expression in LNCaP cells

Western blot analysis was performed with antibodies against RAR $\alpha$  in LNCaP cells treated as indicated for 48 h. GAPDH was used as the loading control.