

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	病態制御領域 内分泌代謝内科学分野 萩原莉恵
<p>(論文題目)</p> <p>Involvement of histone deacetylase 1/2 in adrenocorticotrophic hormone production and proliferation of corticotroph tumor AtT-20 cells.</p> <p>(ACTH 産生腫瘍細胞のホルモン産生と細胞増殖における histone deacetylase 1/2 の関与)</p>	
<p>【目的】</p> <p>クッシング病は、下垂体 ACTH 産生腺腫を原因として、ACTH の自律分泌により慢性的なコルチゾール分泌過剰を呈する疾患である。高コルチゾール血症により、糖代謝異常・脂質異常症・高血圧症増悪による心血管疾患のリスクや易感染状態となることで重症感染症のリスクが高まるため、早期の診断と治療が求められる。治療としては、手術による腫瘍の切除が第一選択であり、下垂体に作用する薬物療法の効果は限定的である。このため、新たな薬物療法の開発が望まれている。</p> <p>Histone deacetylase (HDAC)は遺伝子の転写制御に関与しており、このため、HDAC 阻害剤は悪性腫瘍において腫瘍増大抑制効果があるとされている(1)。我々は、汎 HDAC 阻害剤である trichostatin A が、下垂体 ACTH 産生腫瘍細胞において、ACTH 産生と細胞増殖を抑制することを以前報告した。更に、同細胞増殖抑制作用における細胞増殖因子 pituitary tumor-transforming gene 1 (PTTG1) の関与を示した(2)。</p> <p>Romidepsin は、本邦で主に末梢性 T 細胞性リンパ腫に対して使用されている強力な選択的 HDAC1/2 阻害剤である。近年 HDAC 阻害剤は悪性腫瘍だけでなく非悪性腫瘍に対する効果も認められている。ヒト下垂体腫瘍において <i>HDAC1</i> 及び <i>2</i> 遺伝子発現の増加が報告されている。以上より本研究において、下垂体 ACTH 産生腫瘍細胞に対する romidepsin の ACTH 合成及び細胞増殖抑制作用について検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>マウス下垂体 ACTH 産生腫瘍 AtT-20 細胞を継代培養した。同細胞に選択的 HDAC1/2 阻害剤である romidepsin を添加し、その濃度や添加時間を変化させ、ACTH 前駆体遺伝子 <i>proopiomelanocortin (Pomc)</i> 及び <i>Pttg1</i>、<i>Hdac1/2</i> mRNA 発現の変化について real time PCR 法により調べた。また、romidepsin 添加後の細胞増殖能の変化については Cell Counting Kit-8 を用いて評価した。更に、HDAC1 又は <i>2</i> の siRNA を細胞内に導入し、上記遺伝子レベルの変化と細胞増殖能の変化を測定して、HDAC1/2 の関与について検討した。</p> <p>同実験を 3 回行って解析した。統計学的処理は ANOVA を用い、引き続き shceffe の多重比較検定を行った。P &lt; 0.05 の危険率をもって有意とした。</p> <p>【結果】</p> <p>Romidepsin 添加による時間依存性を検討した結果、添加 24 時間後に <i>Pomc</i> 及び <i>Pttg1</i> mRNA がそれぞれ 27%及び 69%へ低下した。Romidepsin の用量依存性を検討したところ、romidepsin 10 nM によって、<i>Pomc</i> 及び <i>Pttg1</i> mRNA は有意な低下を認め、これらの変化は濃度依存性に低下することが分かった。更に、romidepsin 10 nM 添加により細胞数は有意に低下を示した。</p> <p>次に、HDAC1/2 の関与について実験を行った。Romidepsin により、<i>Hdac1</i> mRNA は増</p>	

加し、*Hdac2* mRNA は低下を示した。*Hdac1* をノックダウンさせると、*Pttg1* mRNA 発現及び細胞数は低下した一方で、*Pomc* mRNA の発現には影響を与えなかった。また、*Hdac2* をノックダウンさせた際には、*Pomc* 及び *Pttg1* mRNA 発現や細胞数に変化は認められなかった。

#### 【考察】

Romidepsin 投与により *Pomc*・*Pttg1* mRNA 及び AtT-20 細胞数が低下したことから、romidepsin は ACTH 産生及び細胞増殖を抑制する効果があると考えられた。

本検討では、*Hdac2* ノックダウン及び romidepsin 投与後に、*Pomc* mRNA と細胞数に変化は認めなかった。よって、HDAC2 の発現が *Pomc* mRNA や細胞増殖へ影響を与える可能性は少ないと考えられた。また、romidepsin は *Pomc* mRNA 発現を低下させたが、*Hdac1* ノックダウンによって *Pomc* mRNA 発現は変化しなかった。これらの結果から、romidepsin は *Hdac1/2* mRNA の発現とは関係なく、阻害剤独自の効果として HDAC1/2 の働きを阻害する事で、対象因子のアセチル化を導き作用すると考えられた。更に、romidepsin にはグルココルチコイド受容体の分子シャペロンである heat shock protein 90 発現の抑制作用も報告されており、同抑制作用を介した影響も考慮される。

PTTG1 は細胞周期の進行及び下垂体の細胞増殖に関与すると報告されている(3)。過去に我々は trichostatin A の添加により *Pttg1* mRNA が低下し、AtT-20 細胞の増殖が抑制されたことを示した。さらに *Pttg1* ノックダウンにより AtT-20 細胞の増殖は抑制されたことから、PTTG1 が HDAC 阻害剤による細胞増殖抑制作用に関与していると考えられた(2)。以上より本研究において romidepsin は PTTG1 を介して AtT-20 細胞の増殖を抑制させたと考えられた。また、*Hdac1* ノックダウンにより *Pttg1* mRNA の低下を認めたことから、HDAC1 は PTTG1 を介した細胞増殖作用に関与していることが示唆された。

Romidepsin は、汎 HDAC 阻害剤と比較して、HDAC 1/2 への強い選択性を有し、副作用の軽減につながる可能性がある。同剤は、実際、ヒトにおいて、汎 HDAC 阻害剤にみられる grade 4 toxicity を認めていない。更に、本邦では末梢性 T 細胞性リンパ腫において実臨床で使用されていることから、ヒトにおいてその他の疾患への応用が期待される。

本研究はマウス下垂体腫瘍細胞による結果であり、今後は、*in vivo* やヒト下垂体腫瘍細胞に対する効果についての検討が更に必要である。

#### 【結語】

Romidepsin はマウス下垂体 ACTH 産生腫瘍由来である AtT-20 細胞において ACTH 産生を抑制し、さらに PTTG1 を介して細胞増殖を抑制させると考えられた。また、HDAC1 は PTTG1 を介する細胞増殖に関与している可能性がある。以上より、選択的 HDAC1/2 阻害剤である romidepsin は、下垂体 ACTH 産生腫瘍を原因とするクッシング病の新規治療薬として今後期待できる可能性がある。

#### 【参考文献】

- (1) Rana Z, Diermeier S, Hanif M, Rosengren RJ. Understanding failure and improving treatment using HDAC inhibitors for prostate cancer. *Biomedicines* 2020; 8: 22.
- (2) Nakada Y, Kageyama K, Sugiyama A, Desaki R, Takayasu S, Niioka K, et al. Inhibitory effects of trichostatin A on adrenocorticotrophic hormone production and proliferation of corticotroph tumor AtT-20 cells. *Endocr J* 2015; 62: 1083-90.
- (3) Chesnokova V, Zonis S, Wawrowsky K, Tani Y, Ben-Shlomo A, Ljubimov V, et al. Clusterin and FOXL2 act concordantly to regulate pituitary gonadotroph adenoma growth. *Mol Endocrinol* 2012; 26: 2092-103.