

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID  
マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化に関する研究

( H20-生物資源-一般-006 )

平成 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 村上 孝

平成 23(2011)年 5 月

## 目 次

### I. 総合研究報告

創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID  
マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化に関する研究 ----- 1

村上 孝

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 11

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 13

創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID  
マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化に関する研究

研究代表者 村上 孝 自治医科大学准教授

研究要旨：平成22年度では、実質的なin vivoイメージングが可能なルシフェラーゼ発現がん細胞株16種類を追加し、JCRB細胞バンクに寄託することができた。前年度までの実績を加えると計65種類に登る。これらのヒト細胞資源は、適宜宿主の間質細胞との供培養が可能であり、がん微少環境を模倣することができる。この条件では発光を指標に薬効評価が可能である。このような細胞基盤のアッセイ系は重症免疫不全マウスでの薬効イメージング解析系に移すことができる。したがって、本細胞資源開発は、in vitro から動物実験（in vivo）までを共通した資源を用いて評価することができる。本細胞資源は、がん創薬促進の観点では、ハイスループット（HTP）スクリーニング、in vitro がん微少環境模倣型スクリーニングにも耐え、マウス個体内における化合物・薬物評価をカバーし得る「有効かつ高度化された細胞資源」である。これら充実した高度化細胞資源は次世代のがん創薬のプラットフォームを提供するものである。

研究分担者

なし

A. 研究目的

近年、分子生物学的な生命現象の解明を起点に、実際の生体内での生命現象を詳述する試みが成されている。個体があってこそ成立する固有の生命現象も近年のイメージング技術の進歩によって解明されようとしている。本研究では、生体エネルギー(ATP)に依存した「発光」に注目し、イメージング情報を試験管内から生きた個体内で統一できるシステムを開発することを目指した。特に、発生起源によって異なる特性を有するヒトがん細胞において、新規化合物（抗体医薬を含む）の in vitro 評価から個々のがん細胞の体内動態を系統的に解析できるモデルは、ヒトがんの創薬研究で最も要求度の高いシステムの一つと考えられる。

本研究では、簡便かつ高感度なルミネッセンス発光によるバイオイメージング創薬基盤の充実を目的に、

- 1) ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株を作製し、それらを公的細胞バンクへの登録・充実化した。
- 2) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態（転移）情報を可能な限り付与するとともに、2) 既存の薬物・分子標的化合物への感受性のプロファイルをも追加し、ヒトがん細胞に対する先端的医薬品開発の促進・支援に貢献することを目指した。

B. 研究方法

- 1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

肺がん、乳がん、膵臓がん、卵巣がん、メラノーマなどのヒトがん細胞株のソースはヒューマンサイエンス研究資源バンク（HSSRB）、American Type Culture Collection (ATCC)等から汎用性の高い細胞株を分譲・購入した。pMSCV-luc 発現ベクターを細胞にトランスフ

エクシオンし、ピューロマイシン耐性細胞を選択し、ルシフェラーゼ(*Photinus pyralis*)を安定発現するヒトがん細胞株を作製した。

ホタル由来ルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株の *in vitro* ルミネッセンス発光量をプロファイル化するため、ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の限界希釈系列を作製し、細胞数 ( $10^1 - 10^5$  個) とルミネッセンス発光量を試験した。機器は Thermo 社、Applisskan を用いた。

昨年度では、ピューロマイシン耐性を指標とした Luc 発現細胞の選別の際、胃がんや大腸がん細胞株では、極端に発光量が低いクローンしか得られない場合が多かったため、レンチウイルスベクター (pLL 3.7-CMV-Luc) による Luc 遺伝子導入試験を実施した。

## 2) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態解析

VeVo770 超音波解析装置 (VisualSonics 社) のガイド下に NOD/SCID マウスの左心室腔内へ樹立したルシフェラーゼ発現がん細胞株を注射し、全身散布による主要臓器 (肝臓、肺、脳など) への血行性転移動態についてイメージング解析を行った (図 1)。使用機器は Xenogen 社 IVIS<sup>®</sup> を用いた。微少転移巣について観察するため、観察期間の終了時に各臓器を *ex vivo* に取り出しルシフェラーゼ発光の検定、もしくは病理検索を行なった。

### **The use of a high-resolution ultrasound (25-75 MHz) allows accurate intra-cardiac injection.**

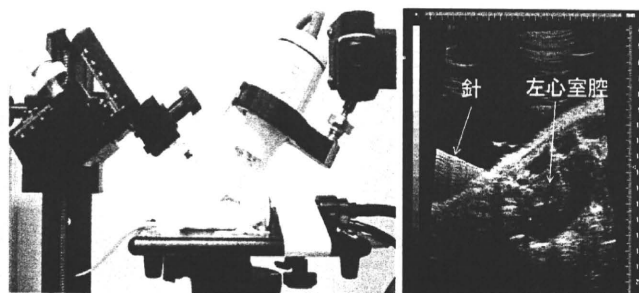


図1: マウス左心室腔内への正確な細胞接種

## 3) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性試験

ルミネッセンス発光は細胞内 ATP に依存する簡便かつ鋭敏な評価系であり、細胞生存と極めて関連する。したがって、様々な細胞傷害の評価系として利用する

ことができる。作製された細胞について、文科省がん特定領域研究 (化学療法基盤情報支援班) より分与された「標準阻害薬キット」(288 種類) を用いてパイロット試験を実施した。

## 4) Natural Killer (NK) 細胞による細胞傷害試験

NK細胞株を effector として用い、Luc発現膵臓がん細胞株に対する *in vivo* 細胞傷害試験を行った。Luc発現膵臓がん細胞は NOD/SCID マウスの腹腔内に接種した「腹膜播種モデル」を用い、培養NK細胞をマウスに投与した。

### (倫理面への配慮)

本研究では、研究実施機関である自治医科大学 DNA 実験安全委員会の指針 (遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律: カルタヘナ法) に従い立案され、実験計画は同委員会の承認を得て行なった。

また動物実験に関しても、実験動物関連法規 (動物の保護及び管理に関する法律; 実験動物の飼養及び保管等に関する基準; 動物の処分方法に関する指針) を遵守し、同大学動物実験指針にしたがって実験を行った。

## C. 研究結果

### 1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

平成22年度では、ヒトがん細胞株 (乳癌、大腸癌、前立腺癌、悪性黒色腫など) 約 40 種類についてルシフェラーゼヒトがん細胞株の樹立を試み、実質的にマウス生体内での発光が観察できる細胞株 15 種類を作製した。また、がんの治療学的な観点から、免疫学的に完全な動物個体内での腫瘍動態を解析できる系の需要が高まり、汎用性の高い C57BL/6 マウスや BALB/c マウスに由来するマウスがん細胞も含まれる (表 1: 平成23年3月31日まで)。これらの細胞はすべてヒューマンサイエンス研究資源バンク (HSSRB) に寄託を済ませた。

作製されたルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の細胞数を  $10^1$  個 -  $10^5$  個までの限界希釈系列を作製し、Ther

mo社、Applisskanを用いた発光量の測定を行った。10<sup>5</sup>個細胞当たり100,000単位以上の高い発光を示すものを「very good」、100,000〜50,000単位 (/10<sup>5</sup>個)を「good」、10,000単位以下 (/10<sup>5</sup>個)を「poor」とした(尚、「poor」と判断された細胞株はin vivoでの発光解析に不向きのため寄託していない)。

尚、実施研究機関における組み換えDNA実験に対する点検と安全確認の要請の指示があったため、その間の細胞作製、並びにマウスへの細胞接種実験は行っていないことを付記する。

表1. 細胞バンク寄託済みルシフェラーゼ発現細胞株

組織別	細胞株	Luc 発光
胃がん	MKN-7	very good
乳がん	* 4T1	good
メラノーマ	G361	very good
	* B16-F0	very good
	* B16-F10	very good
大腸がん	SW420	good
	HCT-116	very good
	HCT-15	good
	DLD-1	good
	* Colon26	very good
肺がん(非小細胞)	NCI-H441	very good
	NCI-H2228	very good
	HCC-827	very good
	NCI-H1975	very good
膵臓がん	AsPC-1	very good
線維芽細胞	* NIH3T3/ATCC	very good

\*, マウス由来細胞株

2) 免疫不全マウス体内におけるがん細胞動態解析  
作製されたルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株から「good」以上の範疇にある細胞株についてNOD.C.B-17-Prkdc<sup>scid</sup>/J(NOD/SCID)マウスにおける血行性転移の自然動態をモニタリングした。5 x 10<sup>5</sup>個細胞を左心室腔内に接種し、「ルミネッセンス発光」を指標に経時的な変化を追跡した。例えば、悪性黒色腫細胞では脳、肝、肺に転移し易い傾向が観察されている(図2A)。

実際、ex vivoに取り出しルシフェラーゼ発光の検定した結果でも、脳、肝、肺への転移が観察された。さらに、リンパ節、腸管への転移も観察された。脳転移に関しては、顕微鏡学的検索により脳表近くから実質に向かってがん細胞が浸潤する像が観察された。

これら臓器に対する転移親和性は他のメラノーマ細胞においても同様の傾向を示した。その一方で、大腸が

### ヒトがんの種類に依存した臓器選択的転移の特徴

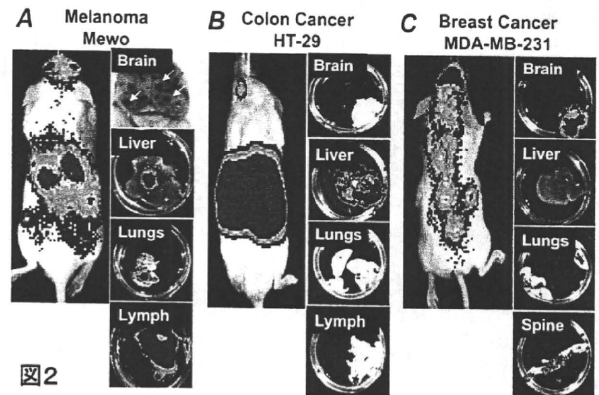


図2

マウス体内でもヒトのがん細胞の転移特性は引き継がれる傾向にある

ん細胞株ではin vivo イメージング解析では肝転移が顕著であり、ex vivoに取り出しルシフェラーゼ発光検定では、肝臓の他に、腎転移が顕著であり、肺やリンパ節にも小さな転移巣が検出された(図2B)。トリプルネガティブやErbB2陽性の乳がん細胞株では、乳がんの特徴的な骨転移が観られる他、脳転移や肺転移が観察されている(図2C)。これらの結果は、昨年度までの結果を反映し、がんの臨床的病態の特徴として知られていた「臓器選択的な転移」がマウスを宿主とする異種移植系においても再現されることを強く示唆している(図3)。

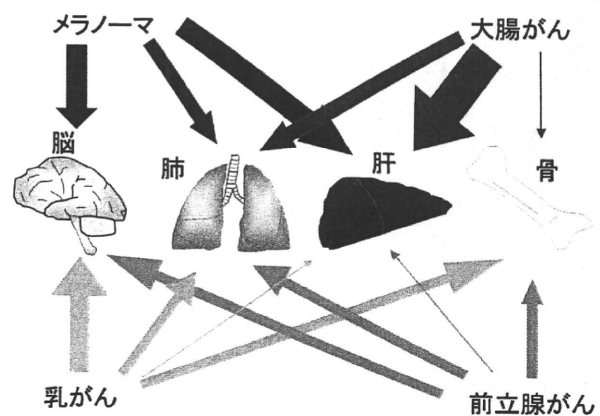


図3: がんの種類に依存した臓器選択的転移の特徴

さらに、臓器特異的転移に関連して、初期の脳転移動態の違いについても観察を行なった。脳に親和性のあるSK-MEL-28メラノーマ細胞と親和性の低いSK-MEL-2メラノーマ細胞を左心室から接種した。高脳転移メラノーマ細胞株は、1) 細胞接種後30 minから24 hr以内のイメージング解析では脳への有意な親和性は観察されなかったが、15日以降に顕著な転移性増殖が認められること(図4)、2) 親株との比較において*in vitro*で再構築されたラット血液脳関門(BBB)を効率よく浸潤透過しうることが判明した(図5)。

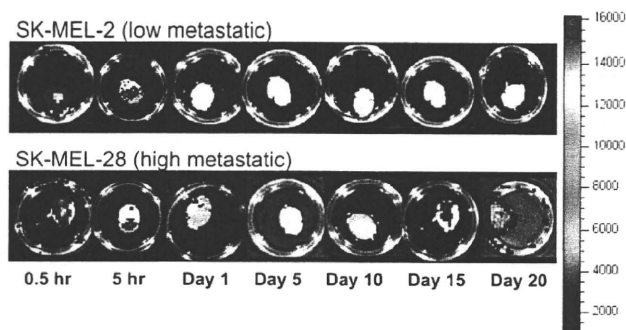


図4. メラノーマSK-MEL-2細胞とSK-MEL-28細胞における転移性脳腫瘍形成の初期動態解析

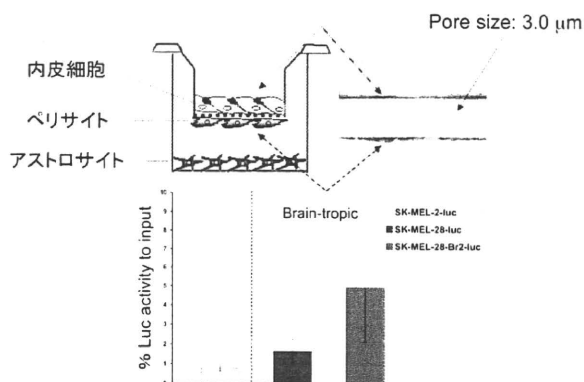


図5. 血液脳関門(Blood-brain barrier: BBB) *in vitro* 再構成モデル

さらに、アジレント社製マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析を進めた結果、高脳転移メラノーマ細胞株で2倍以上高い遺伝子413個の中に、TGF-beta 受容体2、LM07、PDE4Dなどの上皮間葉転換(EMT)にかかわる遺伝子の発現が高いことが判った。これらの結果から、少なくともメラノーマの脳転移には細胞のEMT化が関与していることが示唆された。B16-F0メラノーマ細胞を用いた同系移植による動物接種実験では、B16-F0メラノーマ細胞

は明らかな脳親和性を示さなかったため、上記の候補遺伝子を強制発現させた同系移植モデルによる絞り込み等を行なう必要があると考えられた。

### 3) 既存の薬物・分子標的化合物に対する感受性試験

文科省がん特定領域研究(化学療法基盤情報支援班)より供与して頂いた「標準阻害薬キット」(288種類)を用いて発光量を指標としたHTS(High Throughput Screening)試験が可能か否かについて検定を行った。細胞は $1-2 \times 10^4$ 個を白色96穴プレートに播き、24時間培養した後に化合物を添加した。その48時間後に発光基質D-ルシフェリンを添加し、発光量を測定した。96穴の内部対照(control)を100%としたスクリーニングを行った結果、発光率10%以下の化合物が各細胞株に対して5%程度の頻度で検出された。大腸がん細胞での結果を表2に示す。解析を進めていくとJak2阻害剤、AKT阻害剤、プロテアソーム阻害剤など、がんの種類にほぼ共通した阻害効果が観察されている。

これらの結果は、ルシフェラーゼ発光を基盤とした「*in vitro*」アッセイ系であるものの、次に問題となる動物モデルでの有効性をテストする上では、統一された細胞資源で試験できる意義は大きいものと考えられた。したがって、本細胞資源は、がん創薬促進の観点からは有用なものと捉えられる。

### 4) Natural Killer(NK)細胞による細胞傷害試験

がんに対する免疫監視機構においては、NK細胞が重要な役割を演ずる。アロ反応ではあるものの、NK細胞に対する細胞傷害の感受性評価はがんに対する細胞治療の可能性を探る上で重要な案件である。Luc発光を指標にした膵臓がんのNK細胞感受性の例では(昨年度)、PANC-1、BxPC-3細胞はNK細胞に対して感受性が高いものの、KP-3L細胞では比較的抵抗性を示した。KP-3L細胞はNOD/SCIDマウス個体内において浸潤性が強く、高い転移能を有していた。このことは、悪性度の高いがん細胞はNK細胞に対する免疫監視機構から逃避することができ、がん細胞自身のNK細胞感受性をもたせる薬剤が個体内における治療に必要であることが示唆された。

表2 大腸がん細胞株の薬剤感受性

Category	Compound	HT-29	KM-12	SW620	DLD-1	HCT-116
1-A blank	none (DMSO)	100	100	100	100	100
1-B antitumor (thymidylate synthetase)	5-FU	13.2				
1-G antitumor (DNA)	Mitomycin C					11.5
1-F antitumor (DHFR)	Methotrexate		11.1			
1-G antitumor (DNA)	Mitomycin C		12.2	6.1		
1-H antitumor (tubulin)	Vinblastine sulfate		14.4			
2-C antitumor (DNA)	Daunorubicin, HCl	10.6	11.6	6.5		14.3
2-D antitumor (DNA)	Doxorubicin, HCl	2.1		4		
2-F antitumor (RNA)	Actinomycin D		11.7	10.4		
2-G antitumor (topo I)	Camptothecin		8	9.8		
2-H antitumor (topo I/II)	Acclarubicin			5.4		
3-B actin filament	Cytchalasin D	8.8				
3-G CAMKII	KN93			9		
3-E AKT	NL-71-101	7.2				
4-A CDC2	Kenpaullone		10.1		14.4	3
4-B CDK2	Purvalanol A			14.4		
4-F COX-1	Sulindac sulfide	1				
4-G COX-1	Valeryl salicylate	0.7				
4-H COX-2	NS-398	0				
5-B cyclicphosphodiesterase	Theophylline	3.2				
5-C DNA methyltransferase	Azacitidine			9		
5-D DNA polymerase	Aphidicolin	7.2				
5-F EGFR	AG1478	3.5				
6-C GR	Dexamethasone	0.5				
6-D GSK-3	GSK-3 inhibitor II	1				
6-E HDAC	Scriptaid	0.2	12.1	6.1		
6-F HDAC	Trichostatin A	8.2	2			
6-H protein synthesis	Cycloheximide	14.1	10.5			
7-B HSP90	Radicaloj		1.6		2.9	
7-C HSP90	17-AAG	9		11.3	1.3	
7-D IGF-1R	AG1024		2.4			
7-H Jnk-2	Cucurbitacin I	4.6	3.1		3.9	
8-D MEK	U0126	11.6				
8-G NF-kB	N-Acetyl-L-cysteine	3				
9-B p38 (MAPK)	PD169316	0.2				
9-D p70 S6K	Rapamycin		9.7			
10-D PI3K	LY294002				14.3	
11-A PKC, PKA, PKG, MLCK	Staurosporine	6.7	1.8		10.3	
11-B PLA2	cPLA2 inhibitor				4.7	
11-D PP2A	Cantharidin		4.8			
11-G PP2B/CKBP	FK-506				7.7	
11-H proteasome	MG-132	2.2	3.4		1.9	
12-A proteasome	Lactacystin		5	14.1	0.5	
12-D ROCK	Y27632	8.3				
12-G tubulin depolymerization	Nocodazole				8.8	
12-H tyr phosphatase (PTP)	Denfostatin				10.4	
1-B p53	Pifithrin- $\alpha$ (cyclic)		1.8	5	3.8	2.9
1-C p53 activator	PRIMA-1	0.1				
1-H acetyl-CoA carboxylase (ACC)	TOFA	6.6				
2-C F1-ATPase	Oligomycin		1.2			
2-D V-ATPase	Bafilomycin A1	3	5.4		0.5	
3-E cathepsin G	7-GL-F-CMK		0.3			
4-B Gdc75	NSC95397		5.5			
4-F Na ionophore	Monensin	9	6.5	11.4	6.7	
4-G Na K ATPase	Quabain	1.5	0.5		12.6	
4-H Na K Mg ATPase	Sanquinarine	1	0.1	0.2	0.1	
5-B K channel	Dequalinium	10.8	1.2			
5-D K ionophore	Valinomycin	9.6	0.8		2.3	
5-E K ionophore	Nigericin	6.2	0.3		4.1	
6-C Ga ionophore	AZ3187	2.6	1.6		0.5	
6-D Ga ionophore	Ionomycin		2.4			
6-E Ca-ATPase	Thapsigargin	4.1			1.1	
7-C mitochondrial complex I	Rotenone		0.8			
7-D mitochondrial complex III	Antimycin A1		0.6	1.6		
7-E CRM1	Leptomycin B*	7.7				
8-G guanylate cyclase	LY 83583	3.9	1	0.2	1.6	
9-B HIF	Chetomin	1	0.3	2.5	0.3	
9-G 12, 15-lipoxygenase	ETYA	0.6				
10-B Mdm2	MDM2 inhibitor				11.1	
10-G MPTP opener	Londamane	6				
12-C RNA polymerase	,-Amanitin	9.2				
12-D telomerase	MST-312		7.6		6.8	
1-C AKT	Akt Inhibitor IV	1.1	0.2	14.4	0.1	
1-D AKT	Akt Inhibitor VIII Isozyme-Selective, Akt-1/2				0.2	
1-F AMPK	compound C	7.2				
1-G ATM	ATM, ATR kinase inhibitor	2.6	9.6			
1-H ATM	ATM kinase inhibitor	11	10.7	4.7		
2-C Aurora	Aurora kinase inhibitor III		14.7			
2-D Bcr-abl	AG857	11.1				
2-G CAMKII	KN-93		9.5			
2-H CAMKII	KN-62	9.3				
3-B CDK	Kenpaullone		9.6		7.1	3.8
3-C CDK	purvalanol A		12.8			
3-F CDK	Alsterpaullone, 2-cyanoethyl		14.1			
3-F CDK	Cdk1/2 inhibitor III		10.9			
3-G CDK	Cdk2/9 inhibitor		13.6			
5-D DGK	Diacetylglucosyl kinase inhibitor	13.1				
6-E Fms	oFMS Receptor Tyrosine Kinase inhibitor	3.3				
6-F Fyn	SU6656	2				
6-G GSK	GSK-3 inhibitor IX	4.5		10.3		
6-H GSK	1-Azabenzpaullone	11.4				6.7
7-A GSK	indirubin-3'-monoxime	9.5				1.4
7-B HER2	AG825	9.5				
7-C IGF-1R	AG1024	10.1				
7-F IKK	IKK-2 inhibitor VI		14.5			
7-H Jnk	JAK inhibitor I	3.1				
8-A Jnk	JAK3 inhibitor VI					13.5
8-E Lck	PP2				14.2	
8-G MEK	PD98059				10.5	
8-H MEK	U-0126			14.2	13.7	
9-A MEK	MEK inhibitor I			1.1		
9-B Met	SU11274	11.2				
9-G PDGFR	SU11652	3	7.3	7.8	0.6	
10-G PKC	Go7874	1.9	2.5		0.3	
11-A PKG	KT5823	2.1				
11-B PKR	PKR inhibitor		11.6			
11-D Raf	ZM 336372	4.3				
11-F ROCK	Y-27632	9				
11-G Hsp90	radicaloj	11.9	2		5.1	
11-H Src	PP1 analog	0.3				
12-A Syk	Syk inhibitor	2.2				

このような細胞治療の視点で、膵臓癌に対するNK細胞の治療応用の可能性について腹膜播種モデルによる検討した。細胞はPANC-1-luc細胞を用い、アロ培養NK細胞を腹膜に接種する実験を行なった(図6)。その結果、NOD/SCIDマウス体内において活性化培養アロNK細胞は膵臓癌の腫瘍性増殖を一定期間制御できることが示された。

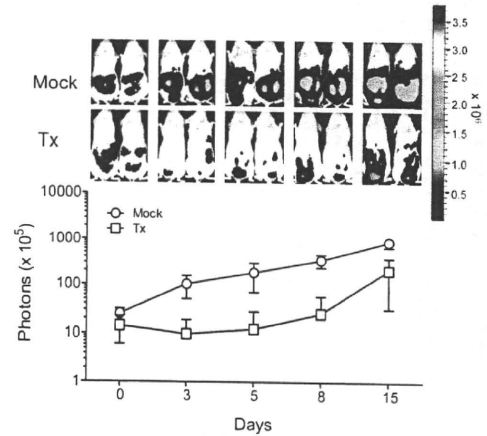


図6. NK細胞に対する膵がんPANC-1細胞のin vivo感受性試験

#### D. 考察

イメージング技術の発展により、がんに関する基礎研究だけでなく抗がん剤の創薬研究においても、動物の個体内でのがん細胞動態をリアルタイムに把握しながら薬効評価を評価することが可能となった。しかしその一方で、動物の個体内でのイメージング試験に供されるべき細胞株が十分に整備されているとは言いがたく、評価系の構築に先立ってイメージング用プローブを遺伝子導入した細胞株を作製しなければならない場合が多い。また、がん細胞株を用いたin vitroの化合物スクリーニングとin vivoの評価系を統一された同じ細胞で利用することができれば、より精度の高い薬効評価につながると考えられる。さらに薬効評価に利用する細胞株に、その細胞株に関する遺伝子発現プロファイルや各種薬剤の応答性のデータが付随されていれば、抗がん剤のスクリーニングや作用機序解析の際に有用な情報となる可能性がある。本研究助成において、学会や研究会などでの当該細胞資源の開発状況を積極的に公表した結果、米国Harvard大学 (Simon C



Robson 教授)、東京大学大学院医学系研究科(松島綱治 教授)、群馬大学重粒子研究センター(吉田由香里 助教、中野隆史教授)、早稲田大学先進理工学部生命医科学科(仙波憲太郎 教授)、長崎大学大学院(田中邦彦 准教授)、東京薬科大学薬学部(根岸洋一 准教授)との技術開発を含めた共同研究につながっている(その他研究機関や製薬業界からの問い合わせも多数)。当該細胞資源の公的寄託機関からの細胞配付が安定してなされれば、さらに創薬研究開発が促進されるものと期待している。

発光用プローブとして代表的なルシフェラーゼはATP要求性であり、細胞内のATPの状態を反映することから、細胞の生存状態とよく相関する。また発光波長は600nm付近と長波長側であるため透過性が高く、*in vivo*の解析に有利である。短所としては、発光には基質(D-ルシフェリン)投与が必要な点が挙げられる。ただし、マウス体内の部位で基質が届かないことによって発光しないという問題はほとんどないと考えられる。またそれ以外に、深部と比較して体表面に近い光がより強く検出されること、黒色細胞では発光の検出感度が低いことが挙げられる。一方、「蛍光」用のバイオプローブとして代表的なGFPは必ずしも細胞内のエネルギー状態を反映しない(蛋白が存在すれば、死細胞でも光る)こと、バックグラウンドが高いことから、創薬細胞資源の用途には化学発光プローブの方が適していると考えられる。しかしながら、移植されたがん細胞の浸潤や初期動態を細胞単位で観察するには蛍光プローブを用いたイメージング解析は高い解像度が得られる点で魅力的である(二光子レーザー顕微鏡による観察)。将来的には、薬物(化合物)処理による細胞個々の動態(運動性)が生体内で観察できる細胞資源の開発も視野に置くべきかもしれない。

本研究開発では、ルシフェラーゼ遺伝子の導入後、ピューロマシシ耐性細胞によって選別が為されてきた。ピューロマシシ耐性株が樹立できているにもかかわらず、実質的なルシフェラーゼ発光に至らない細胞株が多く存在していた。この事象は細胞株に依存し、高分

化型腺癌で顕著であった。導入ベクター非依存的にピューロマシシ耐性を獲得している可能性があったため、元来の細胞株の特性を損なわない方法として選択薬剤の暴露を避ける方法論について試行錯誤を繰り返した。その結果、細胞分裂に依存しないレンチウイルスベクターを高濃度に濃縮する方法が極めて有効であることがわかった。平成20-21年度ではオンコウイルス型のレトロウイルスベクター(pMSCV-luc)中心であったが、平成21年度後半からは適宜、レンチウイルスベクター(pLL3.7-CMV-luc)を使い分けながら細胞作製の効率化を図ってきた。

本研究により作製された細胞資源は依然として試験管内における評価系では優れたパフォーマンスを発揮する。従来までのMTTアッセイやThymidineもしくはBrdUを用いた細胞傷害試験よりも操作が著しく簡便であり、しかも鋭敏なHTS(High Throughput Screening)試験系として利用可能であった。このような評価は免疫担当細胞との相互作用による細胞傷害試験にも応用が可能であり、広く汎用性が期待できる。これまでの*in vitro*薬剤感受性の評価は二次元評価が通例であり、この方法論であっても一定のスクリーニング効果は観察されていた。しかし、モデル動物を用いた評価ではしばしば*in vitro*で得られた結果を反映しないことが問題となっていた。最近、当該がん細胞資源に間質細胞として骨髄由来間質細胞を混和・共培養し、その条件下で薬効を評価する系が報告された(McMillin, et al. Nat Med 2010; 16: 483-489)。従来までの評価系ではがん微少環境とはほど遠く、間質細胞の存在下で発光を指標として評価することに意義がある。実際、マウスを用いた*in vivo*評価モデルとの相関性が示されている。本研究によって開発された細胞資源は上記のようなモデル系であればすぐに応用することが可能であり、また3次元培養法との組み合わせによりさらに臨床的がん微少環境を模倣した系に発展させることができる。このような評価系もLuc発現を可能にする充実した細胞資源があつて実現することであり、本細胞資源を用いた新しい創薬局面が生まれることを期待して



いる。

平成21年度以降では本邦で発生頻度の高い胃がん細胞、またしばしば治療に苦慮する膵臓がんなど、邦人細胞株を追加してきた。さらに、肺がん（非小細胞性肺がん）の罹患率にも配慮し、その主なドライバー変異とされるK-Ras変異やEGFR変異株、更にはEML4-ALK融合型変異陽性のルシフェラーゼ発現細胞株を作製した。これらの細胞資源は分子標的薬の開発や現在問題となっている薬剤耐性獲得の原因究明のよい素材になると考えている。すなわち、培養系を主軸としたin vitro研究から（マウス等の）個体研究をカバーすることが可能なため、がん細胞自身側の原因と個体内環境による原因の両サイドから研究することができる。したがって、本邦に固有の遺伝子変異を含めたがん創薬研究にも貢献できる素材を追加するできたものと思われる。

すでに米国で先行した「NCI60」細胞パネルは国際的にも非常に有用であり、日本人由来のがん細胞株を含めた「JFCR-39」の作成により一層進化したがん創薬細胞基盤ができています。本研究ではこれらの情報にin vivo情報を重ねることにより、一層有用なカタログになることを期待している。前述した間質細胞との相互作用を含めた薬剤感受性情報による修正が加わるとその有用性はさらに増すことが期待できる。

本プロジェクトの関連で、ルミネッセンス発光の利用が「がん幹細胞」研究への応用性についても検討を行なった。その結果、発光イメージングが「がん幹細胞」研究にも応用可能性が示された (Yanagisawa, et al. Clin Cancer Res. 2009)。現在、がん幹細胞の純粋な培養系は存在しないが、このハードルを乗り越えることでがん幹細胞を標的とした新しいHTP創薬研究が提案できると考えている。

作製した細胞資源は公共の細胞バンクに登録し、研究者が利用できる仕組みを構築する予定である。最近、高速シーケンサーの出現により従来までとは異なる高い精度の遺伝子発現研究が成されようとしている。当該研究資源による転移動態（時空間的データ）と高い精度の遺伝子発現情報を統合したシステムが出来上がるこ

とにより、特定のがん腫の臓器転移を予測することが可能になるかもしれない。大量のデータによって複雑度が増加するものの、情報処理システムやバイオインフォマティクス解析の革新により容易な抽出系が確立されることを期待したい。今後は遺伝子発現と転移動態が時空間的に統合されたデータの公開方法について検討したい。

## E. 結論

平成22年度では、実質的なin vivoイメージングが可能なルシフェラーゼ発現がん細胞株を16種類作製し、JCRB細胞バンクに寄託することができた。前年度までの実績を加えると計65種類に登る。これらのヒト細胞資源は、適宜宿主の間質細胞との共培養が可能であり、がん微少環境を模倣することができる。この条件では発光を指標に薬効評価が可能となる。このような細胞基盤のアッセイ系は重症免疫不全SCIDマウスでの薬効イメージング解析に移すことができる。したがって、本細胞資源開発は、in vitro から動物実験 (in vivo) までを共通した資源を用いて評価することができる系と云える。本細胞資源は、がん創薬促進の観点では、ハイスループット (HTP) ・スクリーニング、in vitro がん微少環境模倣型スクリーニングにも耐え、マウス個体内における化合物・薬物評価をカバーし得る「有効かつ高度化された細胞資源」である。これら充実した高度化細胞資源は次世代のがん創薬のプラットフォームを提供するに違いない。

## F. 健康危険情報

該当なし (省略)

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Chun NAL, Murakami T. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. "Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications II", edited by

- Samuel Achiefu & Ramesh Raghavachari. *Progr Biomed Opt Imaging*. 2010; 11 (29): 757606 (1-7).
2. Kimura M, Murakami T, Kizaka-Kondoh S, Itoh M, Yamamoto K, Hojo Y, Takano M, Kario K, Shimada K, Kobayashi E. Functional molecular imaging of integrin-linked kinase-Akt/PKB-mediated signaling and associated role of beta-parvin. *J Cell Sci*. 2010; 123: 747-55.
  3. Murai K, Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Igarashi T, Seo N, Murakami T, Kobayashi E, Mochida J. Primary immune system responders to nucleus pulposus cells: evidence for immune response in disc herniation. *Eur Cells Mater*. 2010; 19:13-21.
  4. Kobayashi M, Murakami T, Uchibori R, Chun NAL, Kobayashi E, Morita T, Ozawa K. Establishment and characterization of transplantable luminescence-labeled rat renal cell carcinoma cell lines. *J Urol*. 2010; 183(5): 2029-35.
  5. Murakami T. Transcriptional modulation using histone deacetylase inhibitors for cancer immunotherapy. Chapter 14 in "Experimental and Applied Immunotherapy". Edited by Medin JA & Fower DH. 2010, Nov. 30 (pp 307-322). Humana Press, Springer (New York).
  6. Iwasaki J, Hata T, Hishikawa S, Fujimoto Y, Uemoto S, Murakami T, Kobayashi E. Use of rat segmental intestine for fetal pancreatic transplantation. *Microsurgery* 2010 May;30(4):296-301.
  7. Ohsawa I, Murakami T, Guo L, Enosawa S, Ishibashi N, Isaji S, Uemoto S, Kobayashi E. Chemopreventive anti-cancer agent acyclic retinoid suppresses allogeneic immune responses in rats. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(8):985-9.
  8. Sun X, Wu Y, Gao W, Enjoji K, Csizmadia E, Muller CE, Murakami T, Robson SC. Adenosine generation by CD39/ENTPD1 on CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells dampens anti-tumor immunity. *Gastroenterology* 2010; 139 (3):1030-40.
  9. Yamaguchi A, Murakami T, Takahashi M, Kobayashi E, Sugawara Y. Luminescence imaging of regenerating free bone graft in rats. *Plast Reconstr Surg* 2011 Jan;127(1):78-87.
  10. Feng L, Sun X, Csizmadia E, Han L, Murakami T, Wang X, Robson SC, Wu Y. Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular ATP. *Neoplasia* 2011 Mar;13(3):206-16.
  11. Miyagaki T, Sugaya M, Murakami T, Kadono T, Okochi H, Tamaki K, Sato S. CCL11-CCR3 interaction promotes survival of anaplastic large cell lymphoma cells via ERK1/2 activation. *Cancer Res*. 2011 Mar 15;71(6):2056-65.
2. 学会発表
1. Miyagaki T, Sugaya M, Kadono T, Murakami T, Okochi H, Tamaki K and Sato S. Eotaxin-CCR3 interaction promotes survival of anaplastic largecell lymphoma cells via ERK1/2 activation. The 70<sup>th</sup> Society for Investigative Dermatology. Atlanta, GA, May 5-8, 2010.
  2. 村上 孝. 株化ヒトがん細胞を用いたNOD/SCIDマウス体内における転移動態の発光イメージング. 第20回日本サイトメトリー学会学術集会(ワークショップ3:生体内イメージングの現状と応用). 東京(港区:東京慈恵医科大学). 2010年6月27日.
  3. Murakami T, Chun AL N Takahashi M. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. 第16回日本遺伝子治療学会年次学術集会. 栃木(宇都宮) 2010年7月1-3日.
  4. Murakami T, Chun ALN, Matsui A, Sato A. Kinetics of brain metastasis in human melanoma cells using the bio-luminescent imaging. 第69回日本癌学会学術総会 大阪 2010年9月22-24日.
  5. Matsui A, Chun ALN, Murakami T. Human cancer cell lines for in vitro and in vivo bio-luminescence assay. 第69回日本癌学会学術総会 大阪 2010年9月22-24日.
  6. Ohsawa I, Murakami T, Guo L, Enosawa S,

Ishibashi N, Isaji S, Uemoto S, Kobayashi E. Chemopreventive anti-cancer agent acyclic retinoid suppresses allogeneic immune responses in rats. 第69回日本癌学会学術総会 大阪 2010年9月22-24日.

7. Masuyama J-I, Iwamoto S, Murakami T, Miyazaki A, Fujita S. Selective expansion of human NK cells from peripheral blood mononuclear cells costimulated with OKT3 and Campath-1H. 第69回日本癌学会学術総会 大阪 2010年9月22-24日.

8. Shin-ichi Takeda, Junko Chinda, Akihiko Numata, Takashi Murakami, Masafumi Takahashi, and Eiji Kusano. Development of features of glomerulopathy in tumor-bearing rats: a potential model for paraneoplastic glomerulopathy The 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Colorado Convention Center. Denver, CO. November 16-21, 2010.

9. Takeshi Kikuchi, Jun Hotta, Kohji Negishi, Tomohiro Arata, Takashi Murakami, Yasutaka Fujita, Eiji Kobayashi. Tissue ATP levels visualization system: Introducing luciferase transgenic rat. 10<sup>th</sup> Congress of the International Society for Experimental Microsurgery. Oct. 29-Nov.1, 2010. Sao Paulo, Brazil.

### 3. その他の発表

1. 村上 孝. 「創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化」 Work in Progress. 第3回日本分子イメージング学会学術集会. 2008年5月23日 (大宮).

2. 村上 孝. がんの発光イメージングと治療モデルへの応用. 関西医科大学大学院講座 (大阪). 2008年11月17日.

3. 村上 孝. 「創薬基盤型バイオイメージングに向けたヒトがん細胞株の SCID マウス体内動態と細胞傷害感受性のカタログ化」 ヒューマンサイエンス振興財団主催. 2008年11月27日. (HS

レポート No. 65 「臨床予測性を高める創薬研究テクノロジー、研究資源の動向調査」 Part II - テーラーメイド医療実現に向けてのバイオメーカー関連施設、探索研究およびトランスレーショナルリサーチ. 研究資源委員会調査報告書 (平成21年3月 ヒューマンサイエンス振興財団) p249-258 掲載.

4. 村上 孝. 「発光イメージングによるヒトがん細胞の臓器特異的転移の動態」 Work in Progress 第4回日本分子イメージング学会学術集会. 2009年5月14-15日 (東京千代田区).

5. Takashi Murakami. Transcriptional modulation using the histone deacetylase inhibitor and cancer immunotherapy (Invited Speaker). DNA Vaccines Conference in Asian 2009 (at Beijing International Convention Center), July 9-10, 2009. Beijing, China.

6. 村上 孝. 『NOD/SCID マウス体内におけるヒトがん細胞株の臓器特異的転移の発光イメージングのカタログ化』 第4回 IVIS ユーザー会 In vivo イメージングシンポジウム (住商ファーマインターナショナル株式会社主催). 2009年9月30日. 東京国際フォーラム (有楽町).

7. 村上 孝、Nicole AL Chun、高橋将文. NOD/SCID マウス体内におけるヒトがん細胞株の臓器特異的転移の発光イメージング. 第1回細胞機能可視化研究会. 2009年10月9日. 東京大学医学部教育研究棟 13F (東京).

8. 村上 孝. NOD/SCID マウスの体内における株化ヒトがん細胞の臓器特異的転移の発光イメージング. 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院セミナー (長崎) 2009年11月5日.

9. 村上 孝. NOD/SCID マウスの体内における株化ヒトがん細胞の臓器特異的転移と発光イメージング. 群馬大学大学院医学系研究科 平成21年度がんプロフェッショナル養成プラン 腫瘍放射線学・特別講演 (第3回). 2009年12月18日 (前橋).

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年
<u>Murakami T</u>	Transcriptional modulation using histone deacetylase inhibitors for cancer immunotherapy (Chapter 14)	Medin JA & Fower DH	<i>Experimental and Applied Immunotherapy</i>	Humana Press (Springer)	New York	2011

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Chun NAL, <u>Murakami T.</u>	Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice.	<i>Progr Biomed Opt Imaging.</i>	11(29)	757606 (1-7)	2010
Kimura M, <u>Murakami T.</u> , Kizaka-Kondoh S, Itoh M, Yamamoto K, Hojo Y, Takano M, Kario K, Shimada K, Kobayashi E.	Functional molecular imaging of integrin-linked kinase-Akt/PKB-mediated signaling and associated role of beta-parvin.	<i>J Cell Sci.</i>	123(Pt 5)	747-755	2010
Murai K, Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Igarashi T, Seo N, <u>Murakami T.</u> , Kobayashi E, Mochida J.	Primary immune system responders to nucleus pulposus cells: evidence for immune response in disc herniation.	<i>Eur Cells Mater.</i>	19	13-21	2010

Kobayashi M, <u>Murakami T</u> , Uchibori R, Chun NAL, Kobayashi E, Morita T, Ozawa K.	Establishment and characterization of transplantable luminescence-labeled rat renal cell carcinoma cell lines.	<i>J Urol.</i>	183(5)	2029- 2035	2010
Iwasaki J, Hata T, Hishikawa S, Fujimoto Y, Uemoto S, <u>Murakami T</u> , Kobayashi E.	Use of rat segmental intestine for fetal pancreatic transplantation.	<i>Microsurgery</i>	30(4):	296-301	2010
Ohsawa I, Murakami T, Guo L, Enosawa S, Ishibashi N, Isaji S, Uemoto S, Kobayashi E.	Chemopreventive anti-cancer agent acyclic retinoid suppresses allogeneic immune responses in rats.	<i>Int Immunopharmacol.</i>	10(8)	985-989	2010
Sun X, Wu Y, Gao W, Enyoji K, Csizmadia E, Muller CE, <u>Murakami T</u> , Robson SC.	Adenosine generation by CD39/ENTPD1 on CD4+Foxp3+ regulatory T cells dampens anti-tumor immunity	<i>Gastroenterology</i>	139 (3)	1030-104 0	2010
Yamaguchi A, <u>Murakami T</u> , Takahashi M, Kobayashi E, Sugawara Y.	Luminescence imaging of regenerating free bone graft in rats.	<i>Plast Reconstr Surg</i>	127(1)	78-87	2011
Feng L, Sun X, Csimazmadia E, Han L, <u>Murakami T</u> , Wang X, Robson SC, Wu Y.	Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular ATP	<i>Neoplasia</i>	13(3)	206-216	2011
Miyagaki T, Sugaya M, <u>Murakami T</u> , Kadono T, Okochi H, Tamaki K, Sato S.	CCL11-CCR3 interaction promotes survival of anaplastic large cell lymphoma cells via ERK1/2 activation.	<i>Cancer Res.</i>	71(6)	2056-206 5	2011

**Chapter 14** 1  
**Transcriptional Modulation Using Histone** 2  
**Deacetylase Inhibitors for Cancer** 3  
**Immunotherapy** 4

**Takashi Murakami** 5

**Abstract** Epigenetic processes, in addition to well-characterized genetic abnormalities, 6  
play a critical role in cancer initiation and progression. The acetylation status 7  
of histones affects levels of gene expression, and causes aberrant transcriptional 8  
repression in cancer cells. As a result, this is also implicated with unresponsive- 9  
ness to immune-based therapies as well as conventional chemotherapies against 10  
cancer. To sensitize cancer cells to those therapies, histone deacetylase inhibitors 11  
(HDACi) have attracted much attention as epigenetic-modulating agents, because 12  
these compounds possess the pleiotropic effects on malignant cells such that they 13  
are more prone to differentiation, growth arrest, and apoptosis. This chapter will 14  
highlight the pleiotropic antitumor effects of HDACi when combined with antigen- 15  
specific tumor immunotherapy, and describe the potential clinical implications for 16  
the improved cancer immunotherapy. 17

**Keywords** Adoptive immune cell-transfer • Gene expression • Histone acetylation 18  
• Histone deacetylase inhibitors • Tumor-sensitization 19

**Introduction** 20

Great efforts and innovations in biomedical science have been made in the field of 21  
cancer immunology since the latter part of the twentieth century, and attempts to 22  
enhance cellular immune responses have used various cancer antigens and immunizing 23  
vectors (e.g., [1, 2]). However, the effectiveness of cancer immunotherapy in 24  
humans remains limited [2, 3]. For example, IL-2, a cytokine that nonspecifically 25  
stimulates T cells, is approved by the US Food and Drug Administration for the 26  
treatment of patients with metastatic melanoma or renal cancer, and can mediate 27

---

T. Murakami(✉)  
Division of Bioimaging Sciences, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical  
University, 3311-1Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi, 329-0498, Japan  
e-mail: takmu@jichi.ac.jp



28 cancer regression in around 15–20% of treated patients [4]. Cancer vaccine strategies  
29 also allow for the generation of immune T cells that recognize antigenic peptides  
30 present on tumor cells, whereas the regression of growing tumors in patients treated  
31 with active immunization has been very sporadic and rare [2]. In contrast, cell  
32 transfer approaches, such as those using adoptive cell transfer or adoptive immuno-  
33 therapy, may be relatively effective and have been demonstrated in one case to  
34 mediate cancer regression in 50–70% of patients with metastatic melanoma [2].  
35 Although this cell transfer approach has provided important clues concerning  
36 requirements for the successful immunotherapy of cancers in general [5, 6], the fact  
37 that tumors have primarily remained so resistant to T-cell attack requires further  
38 investigation and explanation. This chapter will focus on genetic alterations in  
39 cancer cells and the potential modification of such cells for effective cancer  
40 immunotherapy.

41 In order to mediate antitumor effects, T cells of sufficient avidity for the recogni-  
42 tion of tumor antigens must be present in sufficient quantities, pass to the tumor site  
43 by extravasating from the circulation, and then mediate effector functions to destroy  
44 cancer cells. Indeed, all of these criteria may be required for effective treatment.  
45 However, the cellular unresponsiveness of solid tumors through aberrant transcrip-  
46 tional regulation remains a critical barrier that limits the therapeutic potential of  
47 adoptively transferred T cells in patients with cancer. Herein, I will highlight aberrant  
48 transcriptional regulation in cancer cells and describe potential tumor sensitization  
49 strategies employing the use of histone deacetylase (HDAC) inhibitors to enhance  
50 adoptive immunotherapy.

## 51 **Histone Acetylation in Cancer**

### 52 *Histone Acetylation and Gene Expression*

53 Complexes of genomic DNA and histones form the nucleosome of chromatin in  
54 eukaryotic cells, where 146 base pairs of double-stranded DNA are wrapped around  
55 a central core of four basic histones (H3, H4, H2A, and H2B). Each nucleosomal  
56 structure has eight histone proteins arranged in a tripartite structure with one  
57 (H3H4) tetramer and two H2AH2B dimers. Nucleosomes are separated by linker  
58 DNA and compacted into higher-ordered structures by histone H1 [7]. While this  
59 provides a mechanism of inserting several meters of DNA into a single nucleus,  
60 structural compactations can also restrict the access of regulatory proteins to the  
61 DNA. The N-terminal tails of all four histones protrude outward from the core  
62 histones and are thus accessible to histone-modifying enzymes [7]. Many studies  
63 over the past decade have demonstrated that multiple covalent modifications (acety-  
64 lation, phosphorylation, methylation, ubiquitination, sumoylation, and ADP-  
65 ribosylation) take place on histone tail residues and, as more recent data has  
66 demonstrated, within the body of the histone proteins. The histone code hypothesis  
67 suggests that a dynamic constellation of these posttranslational modifications

determines the binding of chromatin remodeling factors to the nucleosome [8]. 68  
These factors regulate the accessibility of transcription factors, cofactors, and the 69  
general transcriptional machinery to DNA by altering the chromatin structure, 70  
which ultimately determines gene expression. All of the epigenetic alterations 71  
currently recognized on histones are reversible, and separate sets of enzymes for 72  
removing these modifications have been identified [9]. The histone acetyltrans- 73  
ferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) enzymes determine the status of 74  
nucleosome histone acetylation, one of the most extensively studied of the chromatin 75  
modifications. It is the balance between the opposing activities of HATs and 76  
HDACs that determines chromatin structure at the gene level and, therefore, at the 77  
gene expression level. Additionally, the relative amount of total cellular HATs and 78  
HDACs determines the global status of acetylation in the genome. This balance is 79  
important in regulating the cellular response to endogenous and exogenous stimuli. 80  
Histone acetylation is generally correlated with gene activation, whereas histone 81  
deacetylation is correlated with gene repression. HDAC enzymes also modulate the 82  
acetylation of numerous other nonhistone proteins such as p53, cytoskeleton 83  
protein  $\alpha$ -tubulin, and the molecular chaperone Hsp90 [10–12]. Direct acetylation 84  
of transcription factors and cofactors by HATs is another important mechanism by 85  
which acetylation regulates gene expression [13]. 86

### ***Classification of HDAC Enzymes and Activity in Normal and Cancer Tissues***

There is increasing evidence to suggest that the 18 HDAC enzymes (HDACs) in 89  
humans are not redundant in function. These HDACs are currently divided into four 90  
classes based on phylogenetic and functional properties [14, 15]. Class I HDACs 91  
(1–3, 8) are structurally similar to yeast transcription factor RPD3. Class II HDACs 92  
(4–7, 9, 10) possess homology to yeast HDA1 deacetylase and are subdivided into 93  
two classes: class IIa HDACs (4, 5, 7, 9) and class IIb HDACs (6 and 10). Class III 94  
HDACs (sirtuins) are structurally similar to yeast SirT2, and the only known class 95  
IV HDAC is HDAC 11. 96

Class I and class II HDACs are zinc-dependent enzymes containing catalytic 97  
sequences that can be inhibited by zinc chelating compounds [15]. Class IV HDAC 98  
(HDAC11) has conserved residues in the catalytic center that are shared by both 99  
class I and class II HDACs [14, 16], although the target substrates remain to be 100  
identified [17]. Class III HDACs require NAD<sup>+</sup> as a cofactor for enzymatic activity 101  
(they do not contain zinc in the catalytic site) [18]. Given their zinc-dependent 102  
enzymatic activity, class I, class II, and class IV enzymes are referred to as classical 103  
HDACs, and represent the main targets in current clinical drug development. 104

While there are structural similarities among HDACs, these enzymes possess 105  
nonredundant roles during embryogenesis. For example, mice lacking HDAC 1, 2, 106  
3, or 7 show aberrant cell cycle regulation or abnormal blood vessel development, 107  
and lead to embryonic lethality (reviewed in [17]). In contrast, knockout mice of 108

109 HDAC 4, 5, 6, or 9 are not lethal, but show markedly abnormal cardiovascular,  
110 bone, and muscle development [17]. These findings suggest that individual HDAC  
111 enzymes possess unique roles in embryonic development and organ-specific functions,  
112 and highlight the potential adverse effects associated with the systemic targeted  
113 inhibition of HDACs.

114 Given the specific roles of HDACs in normal tissues, it is perhaps not sur-  
115 prising that the effects of targeted inhibition of HDACs in cancer cells seem to  
116 be tissue-dependent. For instance, knockdown of HDAC 1 inhibits proliferation  
117 of colon cancer cells in culture, and induces apoptosis in osteosarcoma and  
118 breast cancer cells [19, 20]. Inhibition of HDAC 2 can induce growth arrest in  
119 colon cancer cells, but not in osteosarcoma and breast cancer cells [19, 20].  
120 However, knockdown of HDAC 2 down-regulates estrogen receptor (ER)  
121 expression, and potentiates tamoxifen-induced apoptosis in ER-positive breast  
122 cancer cells [21]. Knockdown of HDAC-2 enhances p53-dependent gene acti-  
123 vation and repression, and can inhibit the proliferation of cultured breast cancer  
124 cells [22]. These examples suggest that HDAC enzymes in cancers may be  
125 associated with tissue-specific programming.

## 126 *Histone Modifications in Cancer*

127 The transformation of a cell from a normal to a cancerous state involves multiple  
128 processes, which include both genetic and epigenetic pathways. Chromatin modi-  
129 fication and DNA methylations are epigenetic changes that can regulate gene  
130 expression, thereby influencing cell growth and differentiation without altering  
131 DNA sequences. Aberrant DNA methylation, which is a well-characterized gene  
132 silencing mechanism, is a hallmark of cancer [23]. Furthermore, alterations in  
133 both histone acetyltransferases and HDACs have been found in many human  
134 cancers [14, 16, 24–32]. For example, a mutation in the cAMP response element-  
135 binding protein (CREB) binding protein leads to the inactivation of its histone  
136 acetyltransferase activity (Rubinstein-Taybi syndrome) [33], and loss of  
137 heterozygosity in the CREB binding protein locus has been observed in a subset  
138 of lung cancers [34]. Thus, dysregulation of histone modifications also appears to  
139 induce inappropriate gene expression or repression, thereby contributing to the  
140 pathogenesis of many forms of cancers. To date, there are three major mecha-  
141 nisms known to be involved in epigenetic modifications found in cancer: (1) acti-  
142 vation of silenced genes, particularly oncogenes; (2) silencing of normally active  
143 tumor suppressors; and (3) silencing of certain immune genes involved in the  
144 antitumor response. There is substantial accumulating evidence that oncogenes  
145 and tumor suppressor genes are regulated by HDACs, and that both HAT and  
146 HDAC mutations potentially occur during carcinogenesis (reviewed by [35]).  
147 Although it has been established that tumor suppressor and immune-associated  
148 genes are often silenced by HDACs in cancer cells, the events leading to epigenetic  
149 silencing remains poorly understood.

**HDAC Inhibitors and Cancer Cell Death-Sensitivity** 150

*Inhibition of HDACs and Gene Expression in Cancer* 151

As described earlier, aberrant transcriptional repression of genes that control cell growth and differentiation is associated with cancer development, and alteration of HDACs underlies the transcriptional repression associated with many cancer types [36, 37]. Thus, blockade of HDACs might restore global gene expression in cancer cells, making these sensitive to cell cycle arrest, differentiation, and apoptotic cell death [38, 39]. The mode of action of HDAC inhibitors, as transcriptional modulators, differs from that of other anticancer agents [16]. Indeed, HDAC inhibitors are expected to be effective for many cancer types that are unresponsive to conventional chemotherapy [16, 39]. Table 14.1 presents a summary of how HDAC inhibitors may function in cancer therapy. Gene expression profiles in cancer cells mediated by HDAC inhibitors of diverse structural classes are time and dose dependent [40, 41]. However, although many similarities have been observed concerning the effects of various HDAC inhibitors on gene expression, it is notable that some profiles are agent-specific [42].

HDAC inhibitors have shown cytotoxicity against a variety of human and rodent cancer cells *in vitro* and *in vivo* [43], and some of these inhibitors are being tested in clinical studies [39] (Table 14.2). For example, depsipeptide (also referred to as FK228 or FR901228) is regarded as a promising HDAC inhibitor for use in the treatment of human melanoma. Depsipeptide was originally isolated from *Chromobacterium violaceum* (No 968) as a compound that reversed the malignant phenotype of H-ras-transformed fibroblasts by blocking the p21 ras-mediated signal transduction pathway [44, 45]. Depsipeptide suppressed cell proliferation and induced apoptosis in human uveal melanoma cell lines at relatively high doses [36], and produced substantial therapeutic effects against various malignancies [39].

<b>Table 14.1</b> Representative biological effects of HDAC inhibitors in cancer therapy	t1.1
<b>Inhibition of cell proliferation</b>	t1.2
Induction of p21, G1 arrest, and cellular differentiation	t1.3
Augmentation of nuclear receptor response driving terminal cell differentiation	t1.4
Reactivation of silenced tumor suppressor genes (in combination with DNA methyl transferase inhibitors)	t1.5
Suppression of telomerase gene expression	t1.6
<b>Induction of apoptosis</b>	t1.8
Activation of mitochondria-dependent apoptosis	t1.9
Activation and/or sensitization of death-receptor mediated killing	t1.10
Induction of topoisomerase II (potential alteration of sensitivity to DNA-damaging agents)	t1.11
<b>Other mechanisms</b>	t1.12
Alteration of angiogenic signaling	t1.13
Alteration of microtubule function	t1.14
Induction of MHC antigens on the cell surface (to augment immune responses)	t1.15
Suppression of IL-2-mediated gene expression	t1.16

t2.1 **Table 14.2** Representative histone deacetylase inhibitors in clinical development

t2.2	t2.3		HDAC target	Clinical phase
	Group	Compound	(effective concentration)	trial
t2.4	Hydroxamates	Trichostatin A (TSA)	Class I, II, IV (nM)	–
t2.5		Vorinostat, Suberoylanilide	Class I, II, IV (uM)	III
t2.6		hydroxamic acid (SAHA)		
t2.7		M-carboxycinnamic acid	N/A (uM)	–
t2.8		bishydroxamate (CBHA)		
t2.9		LAQ-824/LBH589	Class I, II, IV (nM)	I
t2.10		PXD-101 (Bellinostat)	Class I, II, IV (uM)	II
t2.11	Cyclic peptide	Depsipeptide (FK288)	Class I (HDAC 1,2)(nM)	II
t2.12	Aliphatic acids	Valproic acid	Class I, IIa (nM)	II
t2.13		Phenyl butyrate	Class I, IIa (nM)	II
t2.14		AN-9 (Pivanex)	N/A (uM)	II
t2.15	Benzamides	MS-275	Class I (HDAC 1, 2, 3)(uM)	II
t2.16		MGCD0103	Class I (uM)	II
t2.17	N/A not available			

175 In a clinical trial, Schrump et al. [46] examined global gene expression profiles  
 176 in laser-captured tumor cells from pre- and posttreatment biopsies from lung cancer  
 177 patients receiving depsipeptide infusions. Pretreatment RNA was used as the refer-  
 178 ence for each respective posttreatment array study. Considerable heterogeneity was  
 179 detected in baseline as well as posttreatment gene expression profiles. Only 16  
 180 genes were induced by at least twofold in one or more patients following depsipep-  
 181 tide treatment. In contrast, more than 1,000 genes were repressed by at least two-  
 182 fold in one or more patients following depsipeptide infusion [46]. Interestingly, the  
 183 genes that were induced or repressed by at least twofold following depsipeptide  
 184 treatment seemed to be down-regulated or overexpressed, respectively, in resected  
 185 primary lung cancers relative to adjacent, histologically normal bronchial epithelial  
 186 cells. In other words, depsipeptide appears to normalize gene expression in lung  
 187 cancer cells.

188 In another *in vitro* study to determine the molecular basis of the cytotoxic  
 189 effect of depsipeptide against melanoma, depsipeptide treatment resulted in sup-  
 190 pression of the Ras-MAPK signaling pathway through Rap1 up-regulation,  
 191 thereby leading to apoptosis in human melanoma cells [37]. Recent investigations  
 192 have revealed that abnormalities in the Ras-B-Raf-MAP kinase pathway are  
 193 observed in most patients with melanoma [47, 48], and that this aberrant signal-  
 194 ing plays a critical role in melanoma development [49]. Thus, gene up-regulation  
 195 induced by depsipeptide renders melanoma cells more susceptible to apoptotic  
 196 cell death [37]. Additionally, since HDAC inhibitors potentially enhance Fas  
 197 death receptor and MHC class I expression on cancer cells (see Table 14.1), the  
 198 use of these inhibitors may prove to be a useful adjunct in human immunotherapy  
 199 strategies against cancer [50, 51].