



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Histone methyltransferase EZH2阻害剤による非小細胞肺癌細胞に対する抗腫瘍効果、及びhistone deacetylase (HDAC) 阻害剤との併用効果の検討 [全文の要約]
Author(s)	高階, 太一
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2157 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11675号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58990
Type	doctoral thesis
File Information	Taichi_Takashina_summary.pdf



学位論文(要約)

Histone methyltransferase EZH2 阻害剤による非小細胞肺癌細胞に対する抗腫瘍効果、及び histone deacetylase (HDAC) 阻害剤との併用効果の検討

(The analysis of effects of combined epigenetic therapy with EZH2 and HDAC inhibitors on NSCLC cells)

2015 年 3 月

北海道大学

高階 太一

背景

全世界的に肺癌は悪性新生物に関連した死亡率の第1位を占めており、現在もその罹患率は増加傾向にある。日本においても、検診受診の必要性の啓発や近年の治療法の改善にもかかわらず、全癌死亡に対し肺癌がもっとも頻度の高い癌の一つとなっている。組織型としては、非小細胞肺癌が全肺癌の約85%を占めており、非小細胞肺癌に対する治療法の改善が肺癌全体の予後の改善につながると考えられる。

分子生物学の進歩に伴い、癌細胞にはジェネティックな遺伝子異常に加えて、様々なエピジェネティック異常が関与していることが判明した。最近、DNAメチル化やヒストン修飾異常を標的とした治療の臨床試験が行われ始めており、現在、非小細胞肺癌を含む様々な癌腫においてエピジェネティック療法の有用性について検証されている。

ポリコーム(PcG)遺伝子群はショウジョウバエの発生に必要なhomeobox(Hox)geneの抑制因子として発見され、ヒトにおいても保たれている。EZH2(enhancer of zeste homologue 2)はPcG蛋白複合体PRC2を構成する蛋白質の一つであり、ヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有している。EZH2はヒストンコア蛋白H3の27番目のリジンのトリメチル化を介したエピジェネティックスの制御によって、PRC2が標的とする、分化に関わる一連の遺伝子の発現を抑制し、様々な癌種の形成に関わっている。EZH2は様々な癌種との関わりも報告されている。前立腺癌や乳癌においてEZH2の高発現が予後不良と相関していた。さらに、最近B細胞性リンパ腫のサブセットにおいてEZH2の活性型遺伝子変異も同定された。非小細胞肺癌においてもEZH2に関わる報告は散見されており、我々は以前、157の非小細胞肺癌手術検体における免疫組織学的検討で、正常組織でほとんど発現していないEZH2が非小細胞肺癌でしばしば過剰発現しており、EZH2の高発現は非腺癌、低分化度、Ki-67、cyclin Eの高発現と相関しており、全ての病期で予後不良因子であり、Stage IではEZH2の高発現が独立した予後不良因子であることを報告した。肺を含めた他臓器(心臓、肝臓、腎臓、結腸、膀胱)の正常組織においてもEZH2はほとんど発現していないことも報告されており、これらの知見も勘案するとEZH2は非小細胞肺癌を含む種々の癌種において治療標的となる可能性が考えられた。

The cyclopentenyl analog of 3-deazaadenosine (DZNep)はS-adenosylhomocysteine hydrolase阻害剤として発見され、1986年Glazerらによって報告された。DZNepはadenosylhomocysteine hydrolaseを阻害することで、S-adenosyl-L-methionine-dependent lysine methyltransferaseに拮抗作用を示すadenosylhomocysteineを細胞内に蓄積させて、メチルトランスフ

ェラーゼ活性を阻害する。2007 年に DZNep が EZH2 を含む PRC2 構成蛋白質を減少させ、ヒストンメチル化の抑制を介して乳癌細胞のアポトーシスを誘導する事が示された。その後、前立腺癌、直腸癌、急性骨髄性白血病、膠芽腫等の癌種において細胞増殖の抑制やアポトーシスの誘導を示すことが報告された。しかしながら現在、非小細胞肺癌に対する DZNep の作用は明らかとはなっていない、非小細胞肺癌に対する抗腫瘍効果の検討が必要である。

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は癌で過剰に発現しており、ヒストンを脱アセチル化することでヌクレオソーム構造がより凝集し DNA の転写が抑制される方向に働く。その結果、細胞の分化やアポトーシスが抑制されると考えられている。HDAC 阻害剤は、この HDAC の過剰発現を阻害することで、アセチル化ヒストンを蓄積させる。その結果、細胞増殖が阻害されている間に抑制されていた遺伝子の発現が活性化され、分化、アポトーシスを促進することで抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。

今回、我々は未だ報告がない非小細胞肺癌細胞株に対する DZNep の細胞増殖への効果、及びその機序を明らかにするとともに、最近、種々の血液腫瘍において、エピジェネティックスを制御する EZH2 と HDAC の同時阻害が細胞のアポトーシスを相乗的に誘導したことが示されていることから、抗腫瘍効果を高める可能性がある DZNep と HDAC 阻害剤である SAHA の併用療法の非小細胞肺癌細胞株に対する影響について引き続いて検討を行った。

方法

非小細胞肺癌細胞株 H1299、A549、PC-3、H1975 を用いて、まず small interfering RNA (siRNA) を用いて EZH2 をノックダウンした際の細胞増殖への影響について検討した。続いて MTT proliferation assay 及び Soft-agar colony formation assay を用いて DZNep の足場依存性及び足場非依存性の細胞増殖への影響について検討した。また、細胞周期やアポトーシスへの影響を FACS 法で解析した。各種蛋白発現への影響をウェスタンブロット法で、DZNep と SAHA の併用効果について combination index plot を用いて評価した。また H1975 マウスゼノグラフトモデルを用いて *in vivo* 抗腫瘍効果を検討した。

結果

siRNA を用いて EZH2 をノックダウンした結果、4 種類の非小細胞肺癌細胞株の増殖が抑制された。MTT assay において DZNep は 4 株ともに濃度依存性に細胞増殖を抑制した。IC₅₀ は 0.08~0.21 μ M の範囲にあり、非癌細胞より有意に感受性を認めた。また、Soft agar assay でも、DZNep はこの assay で検討可能な 3 株で足場非依存性の細胞増殖も抑制した。Flow cytometry を用いた細胞周期の

測定では DZNep は $0.2 \sim 1.0 \mu\text{M}$ の濃度で 4 株ともに G1 期細胞停止と subG1 fraction の増加を認めた。また、Annexin V と PI を用いた flow cytometry による解析では、DZNep は濃度依存性にアポトーシスを誘導したことが示され、特に EGFR 遺伝子変異陽性株である H1975 と PC-3 においてその効果は顕著であった。また、DZNep は PRC2 構成蛋白質である EZH2、SUZ12 と EED の発現と、H3K27me3 を低下させた。また、H1975 と PC-3 においては cyclin A の発現を低下させ、p27 の発現は亢進した。以上の結果から、DZNep は G1 期細胞周期停止やアポトーシスを介して非小細胞肺癌細胞株の増殖を抑制することが示された。

続いて DZNep と SAHA の併用療法の非小細胞肺癌細胞株に対する抗腫瘍効果について検討をした。併用療法は 4 株ともに相乗的に細胞増殖を抑制し、EZH2 と H3K27me3 の発現を各々単剤よりも低下させた。また、併用により p27 の上昇と cyclin A の低下を強く認め、ヒストン H3K9、K14、K18、K27、K56 のアセチル化の亢進も認めた。また、併用療法は単剤より強くアポトーシスを誘導し、一部の細胞株において、アポトーシス誘導性蛋白である Bim の発現を亢進させた。特に EGFR 遺伝子変異を有する H1975 と PC-3 においてその効果は顕著であり、EGFR の発現を軽度、EGFR のリン酸化、及び下流の AKT と ERK1/2 のリン酸化を強く抑制した。また、併用療法は Wnt/ β -カテニン経路に拮抗作用を示す NKD1 の発現を誘導し、H1975 においては EGFR の転写誘導因子である β -カテニンやその下流の cyclin D1 の発現を抑制し、EGFR の発現を抑制する機序の一つと考えられた。次に H1975 マウスゼノグラフトモデルで *in vivo* 抗腫瘍効果を検討したところ、併用療法は単剤と比しより強く腫瘍の増大を抑制した。腫瘍組織においても併用群において、EZH2、H3K27me3 の発現の低下及び EGFR、AKT、ERK1/2 のリン酸化の抑制を認めた。各群間において有意な体重減少やその他明らかな副作用は認めなかった。

考察

前述したように、DZNep は乳癌、膠芽細胞腫、急性骨髄性白血病、神経芽細胞腫等の癌腫において抗腫瘍効果が報告されており、我々の検討では DZNep は非小細胞肺癌細胞株においても G1 細胞周期停止やアポトーシスを介して細胞増殖を抑制することが示された。EZH2 を標的とした DZNep による治療は非小細胞肺癌の治療法の一つとなる可能性があると考えられた。

一方、HDAC 阻害剤である SAHA はすでに再発性の皮膚 T 細胞性リンパ腫の治療に対する適応が FDA より認可されており、進行期非小細胞肺癌細胞の患者に対する幾つかの臨床試験も実施されている。

上記の結果を受けて、今回我々は非小細胞肺癌に対するより強力なエピジェネティック治療を探索するために、AML やマントル細胞リンパ腫において有効性

が示された DZNep と SAHA の併用療法の非小細胞肺癌細胞に対する抗腫瘍効果について検討を行った。

その結果、EZH2 と HDAC の同時阻害による非小細胞肺癌に対する相乗効果が初めて示された。この相乗効果は H3K27me3 の発現の抑制、様々な部位のヒストンのアセチル化の誘導、EZH2 を含む PRC2 構成蛋白質の発現の抑制、p27 の発現の誘導、cyclin A の発現の抑制、そしてアポトーシスの誘導等と関連していると考えられた。興味深いことに併用療法は EGFR 野生型細胞だけでなく、EGFR 遺伝子変異陽性細胞においても EGFR シグナル経路を抑制した。さらに、併用療法は、EGFR-TKI 抵抗性の H1975 マウスゼノグラフトモデルにおいても単剤と比し有意に腫瘍の形成を抑制した。

ヒストンメチル化とアセチル化の抑制に加えて、EZH2 を含む PRC2 構成蛋白質の発現の低下は、EZH2 と HDAC による併用療法の抗腫瘍効果の重要な機序であると推察される。DZNep と HDAC 阻害剤の併用療法による PRC2 構成蛋白質の発現抑制は他の癌腫においても報告されている。さらに、胆嚢癌における検討では SAHA の抗腫瘍効果は HDAC の発現には依存せず EZH2 の発現に依存することが報告された。DZNep による PRC2 構成蛋白質の発現の低下は、蛋白分解亢進によることが示されている。各々の PRC2 の構成成分の蛋白量は、PRC2 複合体中の他の構成蛋白質の存在に依存しており、活性型 PRC2 複合体の外では不安定な状態となることが示されている。PRC2 の活性には HDAC との結合が必要であり、SAHA による PRC2 構成蛋白質の発現の低下も蛋白不安定性が関与している可能性がある。DZNep と SAHA によるアポトーシスの誘導は、他の癌腫においても報告されている。両剤の併用による Bim の BH3 ドメインを含むアポトーシス促進性の isoform (BIM_{EL}, BIM_L and BIM_S) の発現上昇は、両剤によるアポトーシス亢進と関係している可能性がある。Wu らは非小細胞肺癌細胞株の H1299 と A549 を含むいくつかの癌種において、EZH2 がエピジェネティックに Bim の発現を抑制することで E2F1 依存性のアポトーシスを抑制すること、EZH2 のノックダウンが Bim の発現を誘導し、E2F1 のアポトーシス活性を増強することを報告した。さらに、Nakagawa らは EGFR 遺伝子変異陽性であるものの Bim のアポトーシス促進性である BH3 ドメインのヘテロ欠失型多型を有し、EGFR-TKI の感受性が比較的低い PC-3 において、SAHA が Bim の BH3 ドメインを含む isoform、特に BIM_{EL} を誘導することで、ゲフィチニブの感受性を回復させることを報告した。これらの知見を勘案すると、本研究の結果から BIM が非小細胞肺癌細胞において DZNep と SAHA によるアポトーシスのエフェクターとして働いている可能性が考えられた。

本研究で示された EGFR シグナル経路の抑制は、EZH2 と HDAC の同時阻害による非小細胞肺癌細胞の *in vitro* 及び *in vivo* の増殖抑制効果に関与していると考えられる。EGFR 野生型細胞だけでなく、EGFR 遺伝子変異陽性細胞でも、併用

療法による EGFR リン酸化の抑制が強く認められたことは興味深い知見である。機序は明らかではないが、非小細胞肺癌細胞株の EGFR 野生株と遺伝子変異陽性株の両方において、HDAC の阻害が EGFR の発現とそのリン酸化を抑制したことが報告されている。しかし、これまで EZH2 阻害による EGFR リン酸化抑制の報告はない。一方、EZH2 や HDAC1 が Wnt に拮抗作用を示す因子である NKD1、PPP2R2B 等のプロモーター領域に結合し、ヒストンメチル化や脱アセチル化を介して、それらの因子の転写を抑制して、 β カテニンの発現とその下流の EGFR の発現を低下させることが報告されている。Wnt/ β カテニン経路は肺癌においても活性化されており、肺癌細胞の増殖や転移、生存を促進していることが報告されている。本研究においても、併用療法によって NKD1 や PPP2R2B の発現が増強し、 β カテニンの発現が低下したが、その変化は軽微であり、全ての細胞株や条件で認められたものではなかった。

以上の結果より、併用療法は EGFR 遺伝子変異陰性細胞だけでなく、EGFR 遺伝子変異陽性細胞においても、主に EGFR のリン酸化を抑制することで EGFR シグナル経路を抑制することが示唆され、その機序を明らかにするために更なる検討が必要である。EGFR-TKI T790M 耐性変異を含む EGFR 変異陽性非小細胞肺癌では、恒常的にベースラインの EGFR リン酸化が亢進しているため、DZNep と SAHA の併用療法によるエピジェネティック治療の良い適応になる可能性がある。

最近の報告によると、肺癌細胞株に対して DZNep を膵臓癌に対する治療薬であるゲムシタビンに併用することで、細胞増殖をより強く抑制しアポトーシスを有意に誘導したことが示された。また、非小細胞肺癌を含む固形癌に対してドセタキセルに SAHA を併用した第一相試験や非小細胞肺癌や頭頸部癌に対して、HDAC 阻害剤である panobinostat を erlotinib に併用する第一相試験や切除不能非小細胞肺癌に対して、erlotinib に加えて HDAC 阻害剤である entinostat を併用する第二相試験も施行されている。このように既存の治療薬に加えてエピジェネティック治療薬を併用する治療戦略についても現在数多く検証されており、DZNep や SAHA についても併用療法の更なる検討も必要である。

結論

EZH2 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用療法が、*in vitro* 及び *in vivo* で非小細胞肺癌に対して相乗的な抗腫瘍効果を発揮し、EGFR-TKI 抵抗性肺癌を含む非小細胞肺癌に対するより有効なエピジェネティック治療となる可能性があると考えられた。