



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
Author(s)	高階, 太一
Description	配架番号 : 2157
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11675号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11675
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61509
Type	doctoral thesis
File Information	Taichi_Takashina.pdf



学位論文

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 the combined epigenetic therapy with EZH2 and HDAC inhibitors on NSCLC cells)

2015 年 3 月

北海道大学

高階 太一

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	4 頁
略語表	1 5 頁
実験方法	1 6 頁
実験結果	2 1 頁
考察	3 9 頁
総括および結論	4 2 頁
謝辞	4 3 頁
引用文献	4 4 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に掲載された。

Junko Kikuchi, Taichi Takashina, Ichiro Kinoshita, Eiki Kikuchi, Yasushi Shimizu, Jub Sakakibara-Konishi, Satoshi Oizumi, Victor E. Marquez, Masaharu Nishimura and Hirotoshi Dosaka-Akita

Epigenetic therapy with 3-deazaneplanocin A, an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, inhibits growth of non-small cell lung cancer cells. Lung Cancer 78:138-43. (2012)

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

Taichi Takashina, Ichiro Kinoshita, Junko Kikuchi, Yasushi Shimizu, Jun Sakakibara-Konishi, Satoshi Oizumi, Masaharu Nishimura, and Hirotoshi Dosaka-Akita.

Combined epigenetic therapy with inhibitors of EZH2 and HDACs synergistically inhibits proliferation of non-small cell lung cancer cells British Journal of Cancer

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 高階太一、木下一郎、菊地順子、菊地英毅、清水康、榊原純、大泉聡史、西村正治、秋田弘俊
ヒストンメチル化酵素 EZH2 阻害薬 3-deazaneplanocin A による非小細胞肺癌株に対する増殖抑制効果の検討
第 52 回日本呼吸器学会学術講演会，2012 年 4 月 20 日 神戸
2. 高階太一、木下一郎、菊地順子、菊地英毅、清水康、榊原純、大泉聡史、西村正治、秋田弘俊
ヒストンメチル化酵素 EZH2 阻害薬 3-deazaneplanocin A による非小細胞肺癌株に対する増殖抑制効果の検討
第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会，2012 年 7 月 26 日 大阪
3. 高階太一、木下一郎、菊地順子、菊地英毅、清水康、榊原純、大泉聡史、西村正治、秋田弘俊
ヒストンメチル化酵素 EZH2 阻害薬 3-deazaneplanocin A による非小細胞肺癌株に対する増殖抑制効果の検討

第 53 回日本肺癌学会学術総会， 2012 年 11 月 8 日 岡山

4. Taichi Takashina, Ichiro Kinoshita, Junko Kikuchi, Eiki Kikuchi, Yasushi Shimizu, Jun Sakakibara-Konishi, Satoshi Oizumi, Masaharu Nishimura, Hirotoshi Dosaka-Akita
Effects of combined epigenetic therapy with EZH2 and HDAC inhibitors on NSCLC cells.

第 72 回日本癌学会学術総会， 2013 年 10 月 3 日 横浜

5. Taichi Takashina, Ichiro Kinoshita, Junko Kikuchi, Eiki Kikuchi, Yasushi Shimizu, Jun Sakakibara-Konishi, Satoshi Oizumi, Masaharu Nishimura, Hirotoshi Dosaka-Akita
Effects of combined epigenetic therapy with histone methyltransferase EZH2 inhibitor DZNep and the histone deacetylase inhibitor SAHA on NSCLC cells.

15th World Conference on Lung Cancer, October 27, 2013, Sydney, Australia

6. 高階太一、木下一郎、菊地順子、清水康、池澤靖元、榑原純、大泉聡史、西村正治、秋田弘俊
EZH2 阻害薬とヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の併用療法の非小細胞肺癌細胞に対する抗腫瘍効果の検討

第 54 回日本肺癌学会学術総会， 2013 年 11 月 21 日 東京

7. Taichi Takashina, Ichiro Kinoshita, Junko Kikuchi, Yasushi Shimizu, Jun Sakakibara-Konishi, Satoshi Oizumi, Masaharu Nishimura, Hirotoshi Dosaka-Akita
Effects of combined epigenetic therapy with histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor SAHA on non-small cell lung cancer cells.

American Association for Cancer Research, April 5, 2014, San Diego, California

8. Taichi Takashina, Ichiro Kinoshita, Junko Kikuchi, Yasushi Shimizu, Jun Sakakibara-Konishi, Satoshi Oizumi, Masaharu Nishimura, Hirotoshi

Dosaka-Akita

Effects of cotreatment with EZH2 inhibitor DZNep and HDAC inhibitor SAHA on NSCLC cells and EGFR signaling pathway.

第 73 回日本癌学会学術総会，2014 年 9 月 27 日 横浜

9. 高階太一、木下一郎、菊地順子、清水康、榊原純、大泉聡史、西村正治、秋田弘俊

EZH2 阻害薬と HDAC 阻害薬の併用療法の非小細胞肺癌細胞に対する抗腫瘍効果と EGFR シグナル変化

第 55 回日本肺癌学会学術総会，2014 年 11 月 14 日 京都

緒言

1) 肺癌治療の現状

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2010年の死亡数に関して男性24%、女性14%と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¹、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。

進行非小細胞肺癌の治療としては、1990年代に複数のメタアナリシスが報告され、化学療法を施行することにより有意に生存期間を改善することが示された。なかでも、Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Groupのメタアナリシスでは、シスプラチンを含む抗癌剤治療が支持療法と比べて、生存期間中央値を6~8週、1年生存率を15~25%に改善することが示された²。その後、殺細胞効果を持つ白金製剤（シスプラチンまたはカルボプラチン）に、90年代に登場した新規抗癌剤（ゲムシタビン、ビノレルビン、イリノテカン、パクリタキセル、ドセタキセル）のうちいずれか1種類を併用し、3~4週ごとに4~6回治療することが標準的となった。その後の複数の第Ⅲ相試験によって、これらの新規抗癌剤のいずれの併用レジメンが優れているかが検証され、その結果TAX326ではシスプラチン+ドセタキセルがシスプラチン+ビノレルビンの併用療法に比べて奏効率が高く、生存が延長していた³が、その他の試験⁴⁻⁶では白金製剤と併用する新規抗癌剤としてはどれを選択しても大きな差はないと考えられるようになった。ただいずれの併用療法においても、その延命効果は、生存期間中央値で約10~12ヶ月程度^{6,7}と限界がある。

1990年代前半頃から癌遺伝子/癌抑制遺伝子の異常によって、癌の悪性形質を説明し臨床応用していこうとする研究が広まり、多くの遺伝子異常が予後因子として報告されてきた。近年、分子生物学的因子によって薬剤の感受性を予測し、合理的な薬剤選択を行おうとする研究も多くなされるようになっている。その結果、分子標的薬の開発や臨床応用が活発化した。現在、非小細胞肺癌においては上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬

（EGFR-TKI）や抗血管内皮増殖因子（VEGF）抗体、ALK阻害薬などを含めた幾つかの分子標的治療薬の有効性が報告されている。EGFR遺伝子変異はアジア地域に多く、その変異はチロシンキナーゼ領域に局限し、特に exon18

～21 に 40 種類以上の変異が報告されている。そのうち exon19 のアミノ酸欠失変異と exon21 の L858R 点突然変異が約 90%を占めている。これらの変異は活性型変異であり、変異例ではリン酸化が持続し、EGFR-TKI に対する親和性が増強する。変異陽性例で約 80%の症例にゲフィチニブ（EGFR-TKI）が奏功する⁸と報告されている。日本人の EGFR 遺伝子変異陽性患者を対象として初回治療においてゲフィチニブを投与した場合、従来の第一選択薬であったカルボプラチン＋パクリタキセルの併用治療と比し無増悪生存期間が明らかに長いことも証明された⁹。抗 VEGF 抗体であるベバシズマブはすでに大腸癌に対して FOLF0X4 との併用で使用されていたが、進行期非小細胞肺癌患者に対する第Ⅱ相試験でカルボプラチン＋パクリタキセルの標準療法に併用することで、特に非扁平上皮癌患者において有意な生存期間の延長を示した¹⁰。また Echinoderm microtubule-associated protein like protein 4（EML4）と anaplastic lymphoma kinase（ALK）の融合遺伝子 EML4-ALK を有する進行非小細胞肺癌患者に対する ALK 阻害薬 crizotinib の投与は奏効率 57%、病勢制御率 87%と優れた治療効果を示した¹¹。現在、この様に様々な標的に作用する分子標的治療薬が数多く開発され、肺癌を対象とした臨床試験も行われている。しかしながら、肺癌の分子標的治療は他疾患と比べ混沌としているのが現状で、また副作用の問題や耐性獲得などによる再増悪などいまだその効果は不十分である。そのため、非小細胞肺癌患者に対して新たな治療標的の発見や治療効果予測因子や有害事象の危険因子に基づいた症例選択、耐性の予測や克服などを介した、より適格な治療戦略の確立が重要である。

2) エピジェネティックス（epigenetics）について

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。エピジェネティック（epigenetic）な遺伝子制御とは「DNA 塩基配列の変化を伴わない、細胞分裂後も継承される遺伝子発現あるいは細胞表現型の変化」と定義される。エピジェネティックな遺伝子制御は、「DNA 塩基の修飾」と「ヒストンの修飾」を介して活性化され、エピジェネティックな遺伝子サイレンシングは癌抑制遺伝子の発現を抑制し、遺伝子変異と同様に癌の起始や進行を調節する重要なメカニズムである¹²。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、非小細胞肺癌に対しては Rosalyn らが DNA メチル化阻害剤であるアザシチジンとヒストン脱アセチル化阻害剤であるエンチノスタットを併用した治療効果を報告し、エピジ

エネティック療法の有望性の可能性が初めて認められた¹³。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。

3) ポリコーム蛋白 (Polycomb group proteins) について

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¹⁴。PcG 蛋白は Hox 蛋白に加えて染色体上の様々な部分に結合していることも報告されており^{15,16}、哺乳類においては、PcG 遺伝子は空間的、時間的発現様式を呈している¹⁵。PcG 蛋白はエピジェネティックな遺伝子サイレンシングを調節して、胚幹細胞、成体幹細胞の維持やいくつかの腫瘍抑制経路の抑制にも関与している¹⁷。PcG 蛋白と様々な癌との関連に関わる報告も散見されており (図 1)、PcG 蛋白が癌抑制遺伝子座である cyclin dependent kinase 2a (cdkn2a) locus を抑制することで、この locus がコードしている p16^{INK4a} や p19^{ARF} を抑制し、細胞周期の進行やアポトーシスの抑制をもたらすという報告もある¹⁷。

PcG 蛋白は複合体を形成することでその効果を発現すると考えられており、BMI-1、RING1、HPH1/2/3、HPC1/2/3 から構成される Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) と EZH2 (enhancer of zeste 2)、EED (embryonic ectoderm development)、SUZ12 (suppressor of zeste 12 homolog)、RbAp46/48、AEBP2 から構成される Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) に大別される (図 2)。PRC2 はまず細胞シグナル伝達経路からシグナルを受けて、DNA 中の Polycomb Response Element (PRE) に結合する。次に PRC2 と結合したヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) が PRE のヒストンテイルの脱アセチル化を促進し、PRC2 がヒストンテイルをメチル化しやすい状態に誘導する。この結果、クロマチン構造がゆるみ、PRC2 や HDAC が標的とする遺伝子のプロモーターに結合することが容易となる。その後、遺伝子のプロモーター領域のヒストンテイルが脱アセチル化され、その後メチル化される。このメチル化によって PcG 蛋白のクロマチンの N 末端の結合領域が形成され、PRC1 が標的遺伝子のプロモーターに誘導されて転写の開始を抑制することで、その標的遺伝子の発現を抑制し続ける。従って、PRC2 が転写の開始を抑制し、PRC1 はその抑制状態を維持するように働くため、PRC2 は PRCi (initiation)、PRC1 は PRCm (maintenance) とも呼ばれる。

Table 2 Human cancers with altered expression of PcG proteins		
Protein	Cancer type	References
EZH2	B-cell non-Hodgkin lymphoma	42
	Bladder	112–114
	Breast	46,115–117
	Colon	118
	Hodgkin lymphoma	43
	Liver	119
	Mantle cell lymphoma	44
	Melanoma	115
	Prostate	47,115
SUZ12	Breast	41
	Colon	
	Liver	
BMI1	B-cell non-Hodgkin lymphoma	42
	Leukaemia	120
	Mantle cell lymphoma	121
	Medulloblastoma	91
	Neuroblastoma	122
	Non-small cell lung cancer	123
PCL3	Colon	124
	Skin	
	Lung	
	Rectal	
	Cervical	
	Uterus	
	Liver	
RAE28	Acute lymphoblastic leukaemia	125

参考文献 17 : Sparmann, A. *et al.* *Nat. Rev. cancer.* (2006) より引用。

図 1 PcG 蛋白と種々の癌腫との関連に関する報告

Table 1 Polycomb nomenclature				
Proteins			Protein domains	Functions
<i>Drosophila melanogaster</i>	Human	Mouse		
PRC2 initiation complex				
ESC	EED	EED	WD40 repeats [*]	
E(Z)	EZH1	EZH1/ENX2	SET domain [†]	Histone methyltransferase
	EZH2	EZH2/ENX1		
SU(Z)12	SUZ12	SUZ12	Zinc-finger domain	
PRC1 maintenance complex				
PC	CBX2/HPC1	CBX2/M33	Chromodomain	Methyl-lysine binding
	CBX4/HPC2	CBX4/MPC2		
	CBX8/HPC3	CBX8/PC3		
PH	EDR1/HPH1	EDR1/MPH1/RAE28	Zinc-finger SPM domain [§]	
	EDR2/HPH2	EDR2/MPH2		
	EDR3/HPH3	EDR3		
RING	RING1/RNF1/RING1A	RING1/RING1A	RING-finger domain	Ubiquitin ligase
	RNF2/RING1B	RNF2/RING1B		
PSC	BMI1	BMI1	RING-finger domain	
	RNF110/ZFP144/PCGF2	RNF110/ZFP144/MEL18		
	ZNF134	ZNF134		
PHO	YY1	YY1	Zinc-finger domain	Sequence-specific DNA binding
PHO-like				DNA binding
SCM	SCML1	SCMH1	Zinc-finger SPM domain [§]	
PCL	PHF1	PHF1/PCL1	PHD-finger domain	

参考文献 17 : Sparmann, A. *et al.* *Nat. Rev. cancer.* (2006) より引用。

図 2 Polycomb 蛋白群の種類および機能

4) EZH2 (enhancer of zeste 2) について

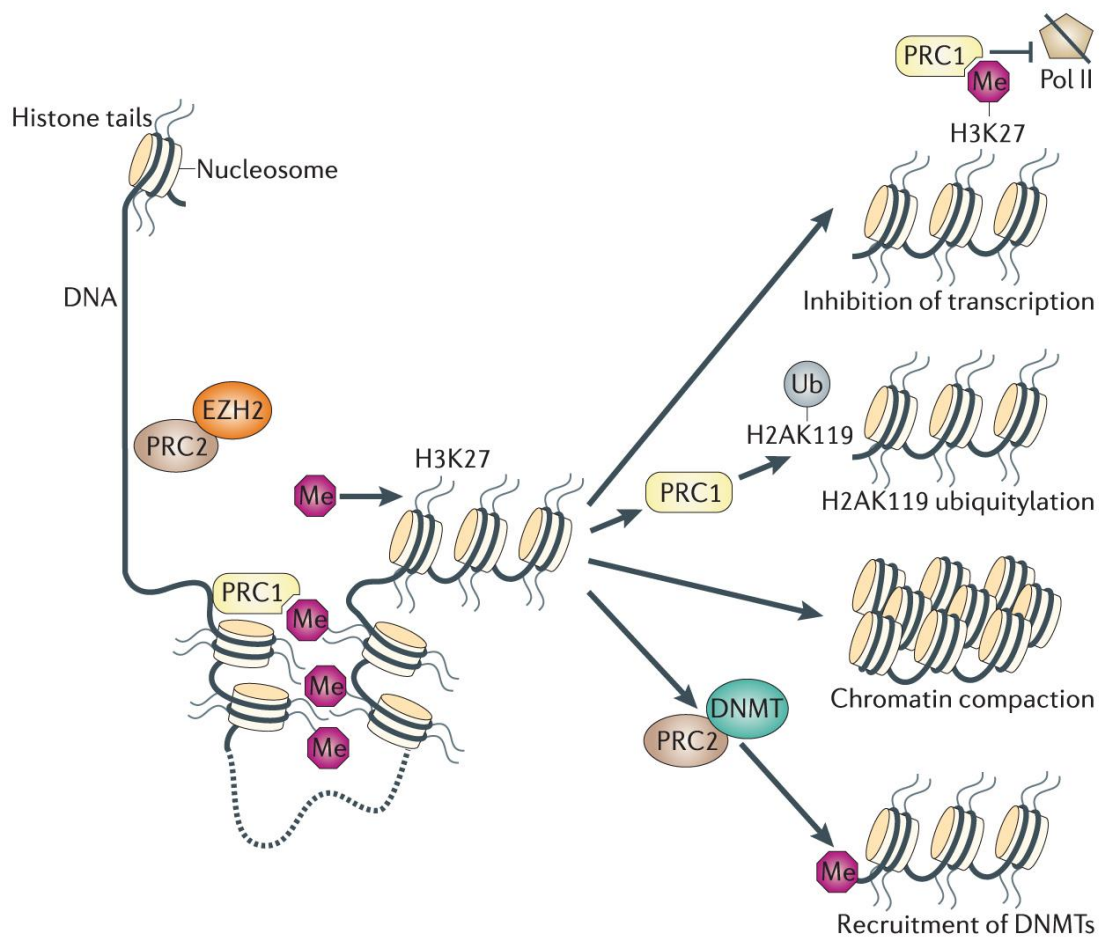
EZH2 (enhancer of zeste homologue 2) は PcG 蛋白複合体 PRC2 を構成する蛋白の一つであり、ヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有している。EZH2 はヒストンコア蛋白 H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化を介したエピジェネティックスの制御によって、RNA ポリメラーゼ II の阻害やヒストンコア蛋白 H2A の 119 番目のリジンのユビキチン化、DNA メチルトランスフェラーゼの誘導等の様々な機序を通して、PRC2 が標的とする、分化に関わる一連の遺伝子の発現を抑制し、様々な癌種の形成に関わっている¹⁷ (図 3)。

EZH2 は EED とともに複合体を形成し、HDAC 活性のもとでその効果を発現

する¹⁸。EED は EZH2 の他に、同じ PRC2 蛋白群に属する SUZ12 や AEBP2 と相互に作用し、RbAp48 に関しては SUZ12 と強く結合する。EZH2 のメチルトランスフェラーゼ活性には EED と SUZ12 との複合体形成が必要であり、RbAp48 は SUZ12 が EZH2-EED 複合体に作用するのを助け、AEBP2 は EZH2-EED-SUZ12 のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を強く増強させるように機能する¹⁹。

EZH2 は様々な癌種との関わりも報告されている。最初に EZH2 との関係が報告されたのは前立腺癌であった。EZH2 は前立腺癌、特に転移巣において過剰発現しており、高発現しているほど予後不良であった。逆に EZH2 をノックダウンすると G2 細胞周期停止を介して細胞増殖を抑制した¹⁴。続いて乳癌において EZH2 の高発現が予後不良と相関しており、EZH2 の過剰発現が足場非依存性細胞増殖を促進し、浸潤能を高めたとの報告がなされた²⁰。その他、悪性黒色腫²¹、子宮癌²¹、胃癌²²、腎細胞癌²³で EZH2 が過剰発現しており、その高発現と腫瘍の悪性度、転移能、予後不良と相関していることが報告されている。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²⁴。また、EZH2 のノックダウンは細胞増殖の抑制やアポトーシスの誘導、腫瘍形成の抑制と関連することが、前立腺癌¹⁴、膵臓癌²⁵、腎細胞癌²⁶等で報告されている。

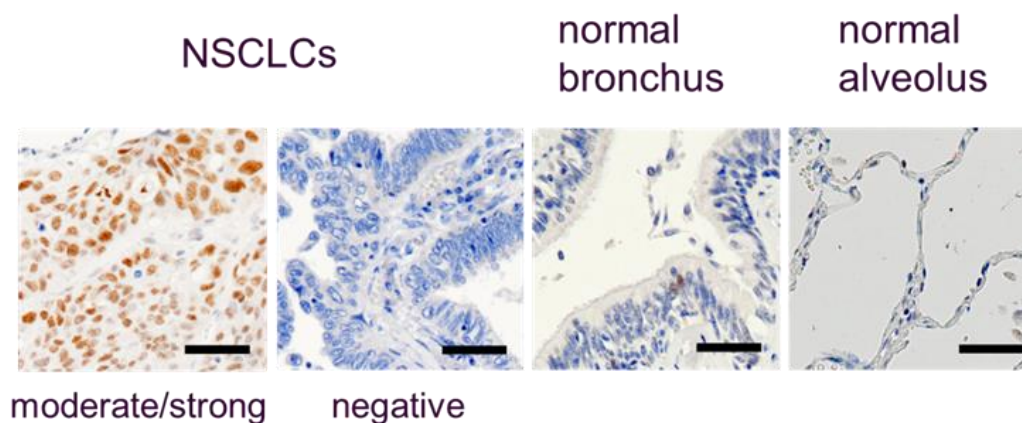
非小細胞肺癌においても EZH2 に関わる報告は散見されている。扁平上皮癌で EZH2 は高発現しており、EZH2 は過形成/扁平上皮化生/軽度、中等度、高度異形性/扁平上皮癌で発現頻度が高くなったという報告²⁷、また、肺癌細胞株において煙草煙抽出物を暴露すると PcG 蛋白が Wnt シグナルを活性化することで癌幹細胞を維持するシグナルを活性化したという報告²⁸もなされた。我々は以前、157 の非小細胞肺癌手術検体における免疫組織学的検討で、正常組織でほとんど発現していない EZH2 が非小細胞肺癌でしばしば過剰発現しており、EZH2 の高発現は非腺癌、低分化度、Ki-67、cyclin E 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²⁹ (図 4)。Takawa らは肺を含めた他臓器 (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を報告しており³⁰、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。



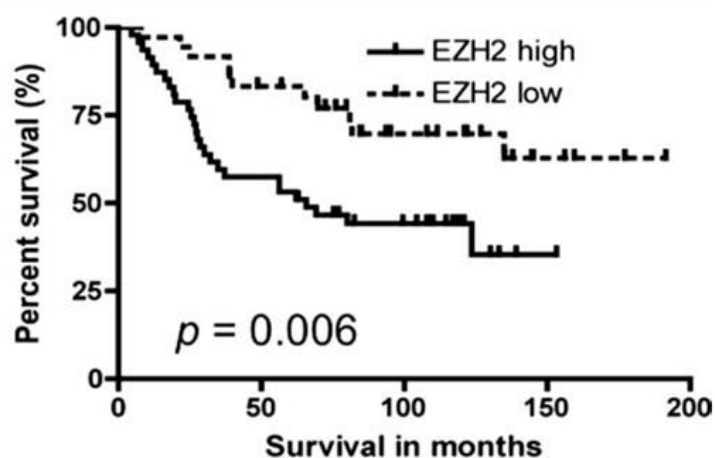
参考文献 17 : Sparmann, A. *et al.* *Nat. Rev. cancer.* (2006) より引用。

図 3 Polycomb 蛋白のエピジェネティックな遺伝子発現抑制の機序

EZH2 immunohistochemical analysis



Overall survival of patients with pStage I NSCLC after complete resection



参考文献 29 : Kikuchi, J. *et al.* Cancer. (2012) より引用。

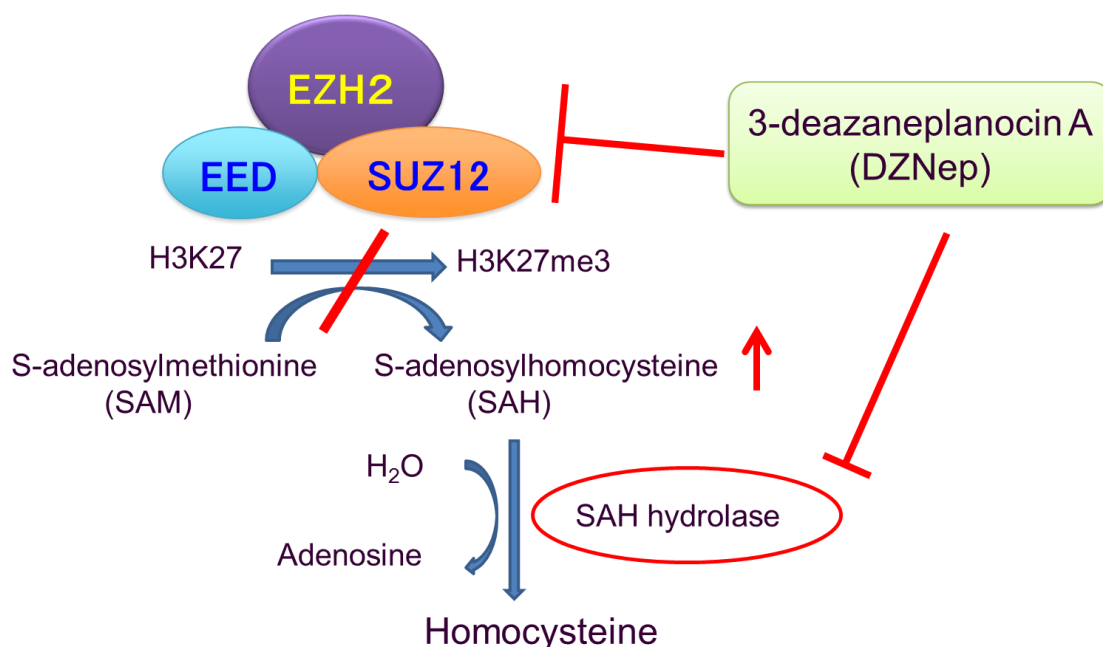
図 4 非小細胞肺癌における EZH2 発現の免疫組織学的検討、および完全切除後の pStage I 非小細胞肺癌患者の EZH2 発現別の全生存期間

5) the cyclopentenyl analog of 3-deazaadenosine, 3-Deazaneplanocin A (DZNep) について

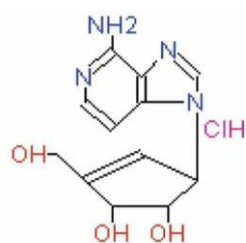
the cyclopentenyl analog of 3-deazaadenosine (DZNep) は S-adenosylhomocysteine hydrolase 阻害剤として発見され、1986 年 Glazer

らによって報告された³¹。DZNep は adenosylhomocysteine hydrolase を阻害すること、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（図5）。

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³²。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³³⁻³⁹。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おらず、非小細胞肺癌に対する抗腫瘍効果の検討が必要である。



参考文献 31 : Glazer. *et al.* Biochem Biophys Res Commun (1986) を改編。



3-Deazaneplanocin A

参考文献 32 : Tan J. *et al.* Genes Dev (2007)

図5 DZNep のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性抑制の機序、および DZNep の化学構造式

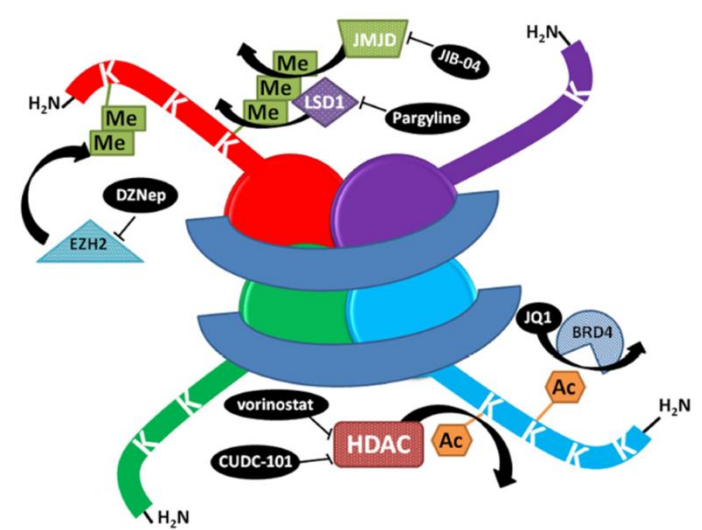
5) histone deacetylase (HDAC) 阻害剤 : suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) について

DNA はヒストンに巻き付いてヌクレオソーム構造を構成して保管されているが、ヒストン蛋白がアセチル化されると、このヌクレオソーム構造が緩み転写が促進される。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。HDAC 阻害剤にも多数の化合物があり、それぞれに対して様々な臨床試験が行われているが、この中で最も臨床試験が進んでいるのが SAHA (vorinostat) である (図 6)。

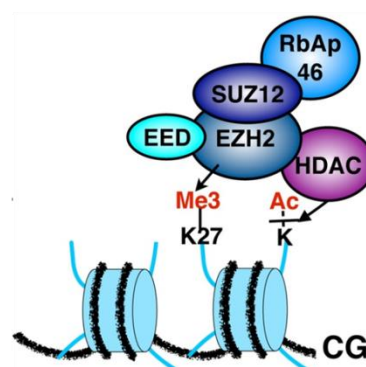
SAHA は現在急性白血病や膀胱癌、乳癌、悪性胸膜中皮腫、非小細胞肺癌で単剤で治療効果が得られるという報告があり⁴⁰⁻⁴³、現在、再発性皮膚 T 細胞リンパ腫に対する治療薬として FDA より認可を受けている。

前述したように、PRC2 蛋白がその効果を発現するためには HDAC 活性を必要としていることも報告されている¹⁸。前立腺癌においては β -2 アドレナリン受容体である ADRB2 が EZH2 によってその発現が抑制されることで、細胞増殖や遊走、浸潤が促進され、その転移能が増強するが、SAHA が PRC2 蛋白の ADRB2 のプロモーターへの結合を阻害することで、PRC2 が標的とする遺伝子の転写を誘導したことが報告されている⁴⁴。また、乳癌細胞株において SAHA が EZH2 に誘導される細胞浸潤を抑制した²⁰ こと、前立腺癌細胞株において EZH2 が E-cadherin のプロモーターに結合してその発現を抑制していたが、SAHA の投与によって PRC2 蛋白の E-cadherin への結合を抑制し、E-cadherin の発現が亢進したこと⁴⁵ も報告されている。

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う。



Front Oncol. 2013;3:235



Chromatin Remodelling:
ISBN 978-953-51-1087-3

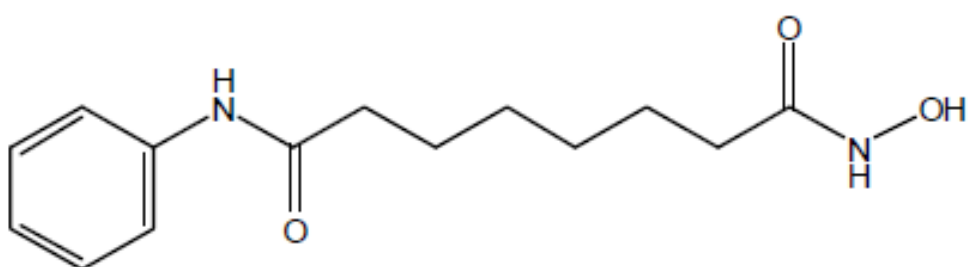


図6 PRC2 蛋白と HDACs の遺伝子サイレンシングにおける関係、および Vorinostat の化学構造式

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

DZNep	3-Deazaneplanocin A
EED	embryonic ectoderm development
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGFR-TKI	epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor
EZH2	enhancer of zeste 2
H3K27me3	histone H3 tri methyl K27
HDAC	histone deacetylase
IC ₅₀	half maximal (50%) inhibitory concentration
PcG	polycomb group
PRC2	polycomb repressive complexe 2
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid
siRNA	small interfering RNA
SUZ12	suppressor of zeste 12 homolog

実験方法

細胞株と薬剤

細胞株は以下の4種類の非小細胞肺癌細胞株と3種類の不死化気管支上皮細胞、線維芽細胞株を用いた。

NCI-H1299：非小細胞肺癌細胞株、p53、p16 が失活している。

NCI-H1975：肺腺癌細胞株、exon20(T790M)+exon21(L858R)のEGFR 遺伝子変異を有している。EGFR-TKI に抵抗性を示す。

A549：肺腺癌細胞株。

PC-3:肺腺癌細胞株。本研究で使用した PC-3 は前立腺癌細胞株ではなく、exon19 が欠失した EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌株⁴⁶である。

上記の細胞株は 5% CO₂ 下の 37℃湿潤環境にて 10%の牛胎仔血清と 0.03%のグルタミンを添加した RPMI で培養した。A549 は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)、PC-3 は Japan Cancer Research Resources Bank (Tokyo, Japan) からそれぞれ購入した。

HBEC3 KT：ヒト気管支上皮細胞を CDK4 と hTERT で不死化した細胞株⁴⁷。Dr. John D Minna (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA) より供与を受けた。5% CO₂ 下の 37℃湿潤環境にて 5ng/ml の上皮成長因子と 50 μg/ml の脳下垂体抽出物 (Invitrogen Life Technologies) を添加した Keratinocyte-SFM media (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で培養した。

16HBE14o-：ヒト気管支上皮細胞を SV40 large T antigen で不死化した細胞株⁴⁸。Dr. Dieter C. Gruenert (University of California, San Francisco, CA, USA) より供与を受けた。5% CO₂ 下の 37℃湿潤環境にて 10%の牛胎仔血清を添加した EMEM (Invitrogen Life Technologies) を用いてコラーゲンコートディッシュで培養した。

WI-38 VA-13 2RA：ヒト肺線維芽細胞である WI38 を SV40 ウイルスで不死化した細胞株。American Type Culture Collection より購入した。5% CO₂ 下の 37℃湿潤環境にて 10%の牛胎仔血清を添加した EMEM を用いて培養した。

In vitro の検討には NCI-H1299、NCI-H1975、A549、PC-3、HBEC3 KT、16HBE14o-、WI-38 VA-13 2RA を使用し、*in vivo* の検討においては NCI-H1975 を用いた。DZNep は単剤の検討の際は Dr. Marquez, V.E (National Cancer Institute) より供与を受けた物を使用し、併用療法の検討の際は Funakoshi Co., Ltd (Tokyo, Japan) より購入した物を使用した。HDAC 阻害剤である SAHA は Cayman Chemical Company (Michigan, USA) より購入した。

Small interfering RNA (siRNA)

6well プレートに H1299 (1×10^5 cells/well)、H1975 (1×10^5 cells/well)、A549 (1×10^5 cells/well)、PC-3 (3×10^5 cells/well) を培養液にて一晩培養を行った。培養後 3-5 割程度のコンフルエントの状態を確認後、11nM の 21bp の EZH2 siRNA duplexes (2-deoxynucleotide overhang を含む) (s4916, Ambion Inc. Austin, TX, USA) と Lipofectamin 2000 (invitrogen) を混合し、72 時間細胞へ添加し蛋白回収及び測定を行った。siRNA の導入確認はウエスタンブロット法を使用した。Scrambled siRNA には ON-TARGET plus Non-targeting pool (Thermo Fisher Scientific) を用いてコントロールとした。

抗体、ウエスタンブロット法

各種蛋白の発現はウエスタンブロット法を用いて検討した。ウエスタンブロット法は NuPAGE プロトコールに従い施行した。

注入タンパク量を決定し蛋白濃度より loading sample 量を計算後、メルカプトエタノール、LDS sample buffer と混合し GEL にそれぞれ注入し、泳動した。この際 Running Buffer は目的蛋白の分子量に応じて MOPS もしくは MES を使用した。泳動後 Trans-buffer を用いてメンブレンへ Transfer (60 分) を行い、Transfer 後にボンソ S で染色し蛋白のローディングが均一であることを確認した。確認後 TBST で 5 分×3 回の洗浄施行後、5%スキムミルクを用いて blocking を行った後、再度 TBST で 5 分×3 回洗浄し、1 次抗体を添加して 4℃下で一晩振とうした。

翌日に TBST で 5 分×6 回の洗浄施行後、2 次抗体を 60 分添加。再度 TBST で 5 分×6 回洗浄して撮影を行った。感光液は ECL TM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いた。1 次抗体に関しては抗 EZH2 抗体 (500 倍 ; 11/EZH2 ; BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA) ・抗 SUZ12 抗体 (500 倍 ; clone 3C1.2, Millipore, Billerica, MA, USA) ・抗 p27^{Kip1} 抗体 (200 倍 ; clone 57, BD Transduction Laboratories) ・抗 β -catenin 抗体 (500 倍 ; 14/ β -catenin, BD Transduction Laboratories) ・抗 Actin 抗体 (1000 倍 ; A-2066, Sigma-Aldrich Co.) はマウスポリクローナル抗体を、抗 EED 抗体 (500 倍 ; 09-774, Millipore) ・抗 cyclin A 抗体 (500 倍 ; H-432, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA) ・抗 cleaved PARP 抗体 (500 倍 ; Asp214, Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA) ・抗 cleaved caspase-3 抗体 (1000 倍 ; Asp175, Cell Signaling Technology) ・抗 Bim 抗体 (500 倍 ; Asp175, Cell Signaling Technology) ・

抗 EGFR 抗体(1000 倍; D38B1, Cell Signaling Technology)・抗 phospho-EGFR 抗体 (Tyr1068) (1000 倍 ; D38B1, Cell Signaling Technology) ・ 抗 AKT 抗体 (1000 倍 ; C67E7, Cell Signaling Technology) ・ 抗 phospho-AKT 抗体 (Ser473) (1000 倍; D9E, Cell Signaling Technology) ・ 抗 ERK1/2 抗体 (1000 倍 ; 137F5, Cell Signaling Technology) ・ 抗 phospho-ERK1/2 抗体 (Thr202/Thr204) (1000 倍 ; D13.14.4E, Cell Signaling Technology) ・ 抗 NKD-1 抗体 (200 倍; A-21, Santa Cruz Biotechnology) ・ 抗 PPP2R2B 抗体 (200 倍 ; Aviva Systems Biology Corp. San Diego, CA, USA) ・ 抗 cyclin D1 抗体 (200 倍 ; C-20, Santa Cruz Biotechnology) ・ acetyl-lysine histone H3 antibody sampler kit (1000 倍 ; Histone H3, Lys 9, 14, 18, 27 and 56; Cell Signaling Technology) はラビットモノクローナル抗体をそれぞれ使用した。

Soft-agar coloney formation assay

6well プレーットの底に 0.4%の soft agarose (Seaplaque, FMC Corp., Rockland, ME, USA) を注ぎ、その後 H1299 (control 群 : 500 cells/well、DZNep 群 : 1000 cells/well)、H1975 (control 群 : 100 cells/well、DZNep 群 : 500 cells/well)、A549 (control 群 : 500 cells/well、DZNep 群 : 1000 cells/well)、PC-3 (control 群 : 500 cells/well、DZNep 群 : 1000 cells/well) をコントロール群と DZNep 投与群と分けて培養した。2 週間後にコロニーを p-ヨードニトロテトラゾリウムバイオレット (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) で染色し、NIH Image version 1.62 software (NIH, Bethesda, MD, USA) で測定をした。

MTT proliferation assay and determination of combination index

96well プレーットに H1299 (1000 cells/well)、H1975 (2000 cells/well)、A549 (1000 cells/well)、PC-3 (2000 cells/well) を各々一晩培養後、DZNep および SAHA を添加し、72 時間後に測定を実施した。細胞増殖活性の検討のために Dye solution を各 well に 10 μ l 注入し、その 4 時間後に stop solution 90 μ l を注入しさらにその 1 時間後に MTT proliferation assay を施行した。MTT proliferation assay においては Thermo Fisher Scientific 社のマイクロプレートリーダー (Varioskan Flash) を使用して解析した。

DZNep と SAHA の併用効果に関しては、2 剤併用時の薬剤濃度を各々の IC₅₀ の濃度に従って、濃度比率を 1:10 として濃度勾配をつけて同時に投与を行い、72 時間後に測定を実施した。薬剤の相互作用は Chou と Talalay による

median-effect plot⁴⁹を用いて combination index (CI)を算出した (CI<0.90: 相乗作用、0.90<CI<1.10: 相加作用、CI>1.10: 拮抗作用)。解析には software Compusyn (Biosoft, Cambridge, UK) を用いた⁵⁰。

細胞周期測定法

H1299 (1×10^5 cells/well)、H1975 (1×10^5 cells/well)、A549 (1×10^5 cells/well)、PC-3 (3×10^5 cells/well) を 100-mm ディッシュで培養し、一晩培養を行った。培養後 3-5 割程度のコンフルエントの状態を確認後、11nM の EZH2 siRNA duplexes を導入した。72 時間後に細胞をトリプシンで処理し、PBS で 2 回洗浄後に 70%エタノールで -20°C 下で固定した。固定した細胞を遠心し、 $250 \mu\text{g/ml}$ の RNase と $50 \mu\text{g/ml}$ の propidium iodide (Sigma) で再懸濁し、DNA を標識した。DNA の測定は FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) と 2 種類のソフトウェア CellQuest 3.1 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) と ModFit LT 2.0 (Verity Software House, Topsham, ME, USA) を用いて施行した。

アポトーシスの解析

本実験の解析には Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (Calbiochem, Darmstadt, Germany) を用いた。6well プレートで H1299、H1975、A549、PC-3 を各々一晩培養後、DZNep ($0.2 \mu\text{M}$) および SAHA ($0.2 \mu\text{M}$) を添加し、72 時間後に測定を実施した。トリプシンで細胞を処理し、 $1000 \times g$ で 5 分間遠心し、PBS で一度洗浄して、 $500 \mu\text{l}$ の binding buffer で調整した。その後、その細胞液に $1.1 \mu\text{l}$ の FITC で標識した annexin V と $10 \mu\text{l}$ の Propidium Iodide (PI) を添加し、15 分間暗所で静置した後に測定した。アポトーシス細胞の測定には FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) を使用した。またデータの解析には CellQuest 3.1 (BD Pharmingen) を用いた。

ゼノグラフトマウスモデル

動物実験は北海道大学動物実験に関する規定に基づき施行した。6 週齢の雌のヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu) を異種移植モデルに使用した。H1975 (5×10^6 cells) を $100 \mu\text{l}$ の PBS で希釈し、ヌードマウスの右後ろ脚に皮下注射で移植した。腫瘍体積が $50 \sim 100 \text{mm}^3$ に達した時点で治療を開始した。対照群 (5% DMSO)、DZNep 投与群 (DZNep: 4mg/kg)、SAHA 投与群 (SAHA: 40mg/kg)、DZNep+SAHA 併用群 (DZNep: 4mg/kg + SAHA: 40mg/kg) の 4 群に分けて、各群 5 匹ずつ用いて検討した。薬剤は $200 \mu\text{l}$ で調整し、週 2 回、6 週間にかけて

腹腔内投与した。治療日に腫瘍径と体重を測定した。腫瘍体積 (Tumor Volume: TV) の計算式は $TV = (\text{Length}) \times (\text{Width})^2 / 2$ を用いた⁵¹。体重が20%以上減少、または腫瘍の潰瘍化、壊死、マウスの歩行障害などを認めた場合は安楽死とした。6週間投与後にマウスを安楽死させ、その後すぐに腫瘍組織から蛋白を抽出してウェスタンブロット法にて解析をした。

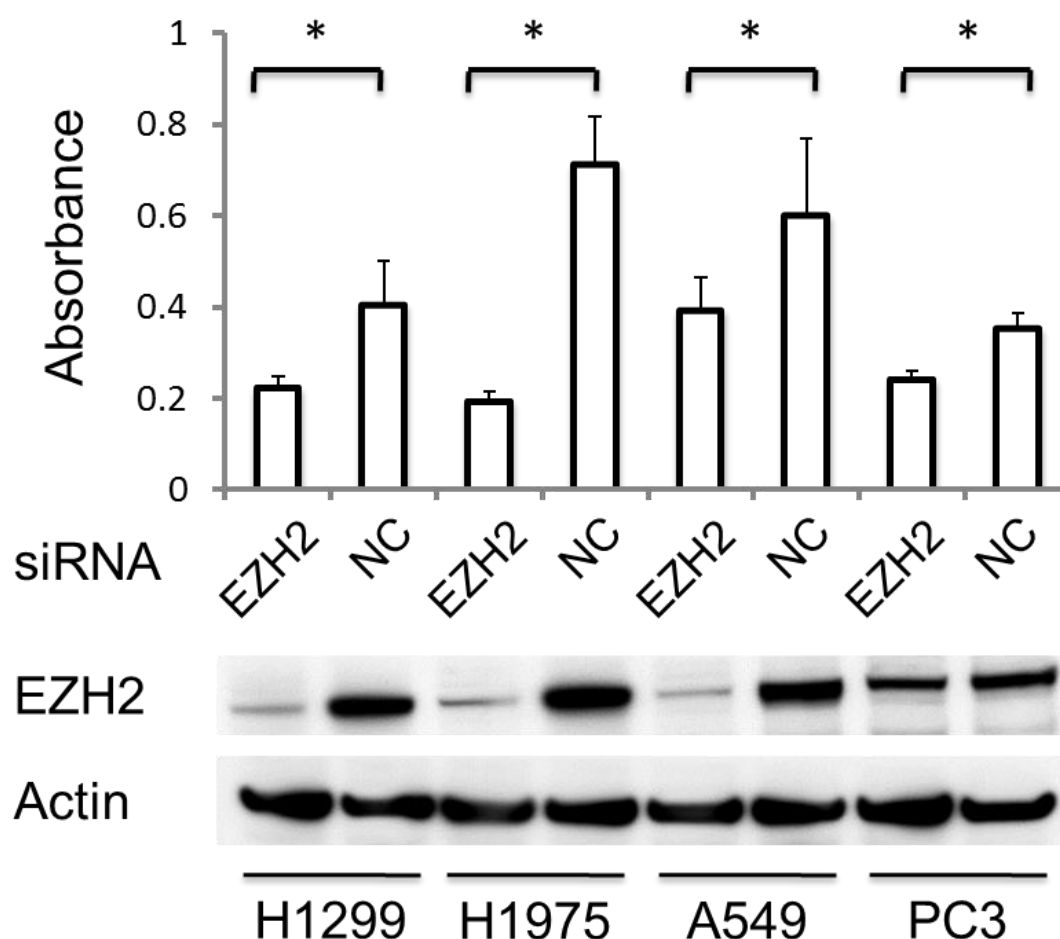
統計解析

統計解析は2群間の解析には Student T test を用いた。3群以上の検討には one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison test を用いた。統計学的有意差は P value < 0.05 とした。ソフトウェアは Microsoft Excell と SPSS software (version 18.0; IBM SPSS, Chicago, IL, USA) を使用した。

実験結果

1) 非小細胞肺癌細胞株における siRNA による EZH2 ノックダウンの影響の検討

はじめに siRNA を用いて EZH2 をノックダウンした場合の 4 種類の非小細胞肺癌細胞株 (H1299、H1975、A549、PC-3) への影響を検討した。各細胞株を一晩培養後に EZH2 siRNA および negative control siRNA を導入して 72 時間後に測定を実施した。EZH2 siRNA を導入した結果、全ての細胞株で EZH2 の発現が低下していることをウエスタンブロット法で確認をした (Fig.1)。EZH2 siRNA を導入した細胞株では対照群と比し、いずれの細胞株でも細胞増殖が有意に抑制された ($P < 0.05$)。特に H1975 では細胞増殖の抑制効果が強かった。実験結果は独立した 3 回の実験の平均値と標準偏差を用いて提示した。



* $P < 0.05$

NC: negative control

Figure 1 EZH2 ノックダウンの非小細胞肺癌細胞株に対する増殖抑制効果

2) 非小細胞肺癌細胞株における DZNep の細胞増殖に対する影響の検討

続いて DZNep の非小細胞肺癌細胞株に対する影響を検討した。各細胞株を一晩培養後に DZNep を投与して 72 時間後に測定を実施した。DZNep は 4 種類の非小細胞肺癌細胞株全てにおいて濃度依存性に細胞増殖を抑制した

(Fig. 2)。各細胞株の IC_{50} は $0.08 \sim 0.24 \mu M$ の範囲にあり、H1975 において最小であった (Table 1)。同様に 3 種類の不死化気管支上皮細胞株、線維芽細胞株に対しても同様の検討を行った (HBEC3 KT と 16HBE14o は気管支上皮細胞株、WI-38 VA-13 2RA は線維芽細胞株である)。これらの細胞株でも DZNep によって用量依存的に細胞増殖は抑制されたが、各々の IC_{50} は $0.54 \sim 1.03 \mu M$ であり、非小細胞肺癌細胞株と比し、有意にその値は高かった。

続いて、Soft-agar coloney formation assay を用いて、足場非依存性の細胞増殖に対する DZNep の影響について検討をした。PC-3 に関しては 4 週間を経過してもコロニーが形成されなかったため検討が出来なかったが、他の検討可能な 3 種類の非小細胞肺癌細胞株においては全て濃度依存性に細胞増殖を抑制した (Fig. 3)。

これらの結果から DZNep は癌細胞に対して濃度依存的に足場依存性、非依存性の細胞増殖を抑制し、非癌細胞より有意に感受性の亢進を認めた。

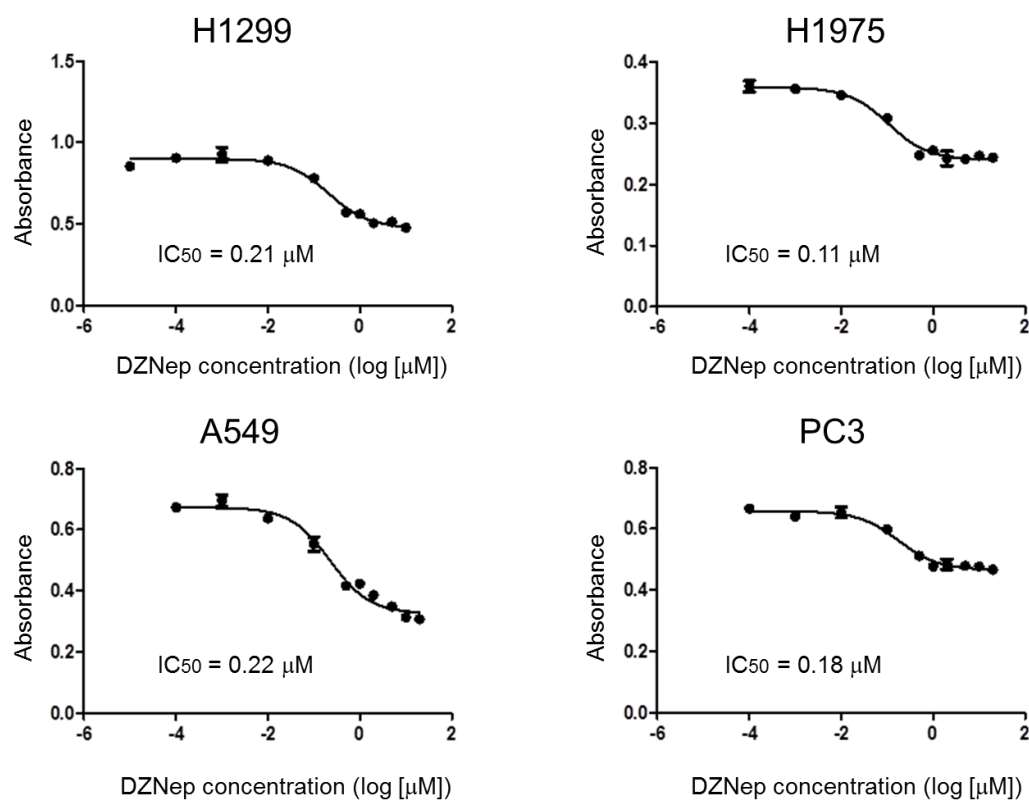


Figure 2 DZNep の非小細胞肺癌細胞株に対する増殖抑制効果

Cell type	Cell line	IC ₅₀ of DZNep (μM)*
NSCLC cells	H1299	0.21 ± 0.01
	H1975	0.08 ± 0.02
	A549	0.24 ± 0.01
	PC-3	0.19 ± 0.01
Non-cancerous cells	HBEC3 KT	0.58 ± 0.09**
	16HBE14o-	1.03 ± 0.11**
	WI-38 VA-13 2RA	0.63 ± 0.07**

* Data are presented as mean ± SD of three independent experiments.

** $p < 0.001$ compared with each NSCLC cell line by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

Table 1 非小細胞肺癌細胞株および非癌細胞における DZNep の IC₅₀

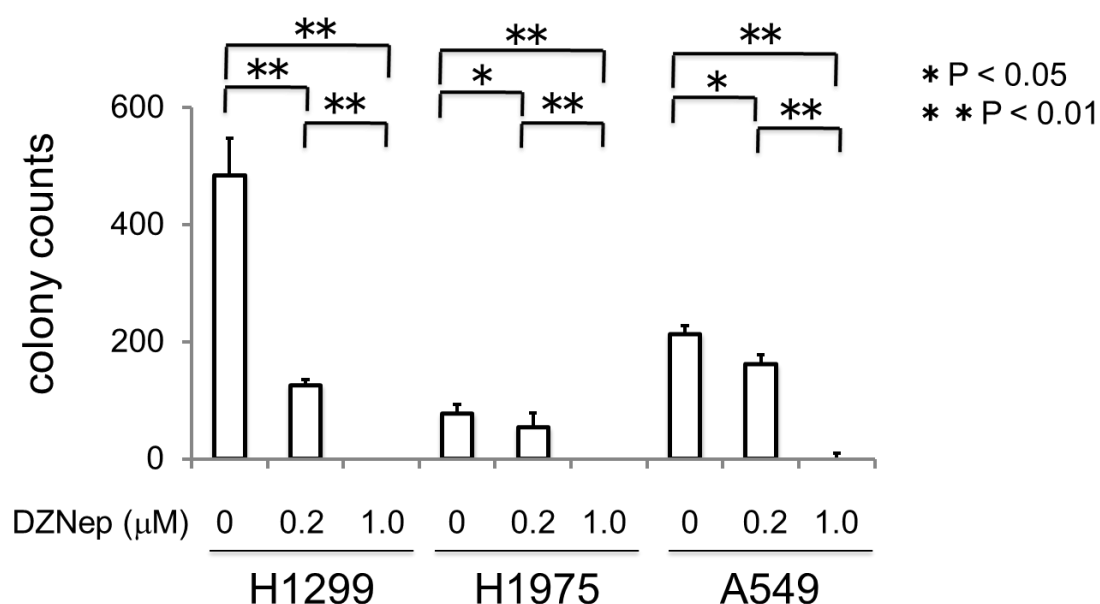


Figure 3 DZNep の足場非依存性の細胞増殖に対する効果

3) DZNep の非小細胞肺癌細胞株に対する細胞周期とアポトーシスの検討

次に我々はフローサイトメトリーを用いて、細胞増殖の抑制の機序について検討をした。まず細胞周期に対する影響について検討をした。4種類の非小細胞肺癌細胞株を 100-mm ディッシュで一晩培養し、対照群と 0.2 μ M、1.0 μ M の DZNep を投与した計 3 群で検証した。測定は DZNep 投与 72 時間後に施行した。その結果、G1 期にある細胞が蓄積し、同時に S 期にある細胞が減少した。また、DZNep の投与により sub-G1 fraction がやや上昇した (Fig. 4)。この実験結果は独立した 3 回の実験のうち 1 回分を提示しており、その 3 回の実験からはほぼ同一の結果が得られた。

続いて、非小細胞肺癌細胞株のアポトーシスに対する DZNep の影響の検討をした。6well プレートで H1299、H1975、A549、PC-3 を各々一晩培養後、DZNep を添加し、72 時間後に Annexin V と PI で染色しフローサイトメトリーを用いて測定を実施した。その結果、DZNep は 4 株全てにおいて濃度依存性にアポトーシスを誘導した。EGFR 野生株である H1299 では有意差はなかったが、EGFR 遺伝子変異陽性株である H1975 と PC-3 では、その効果は顕著であり、有意にアポトーシスを誘導した (Fig. 5)。

これらの結果から DZNep により 4 株ともに G1 期細胞周期停止と sub G1 fraction の増加を認めた。また 4 株ともに濃度依存性にアポトーシスを誘導し、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。

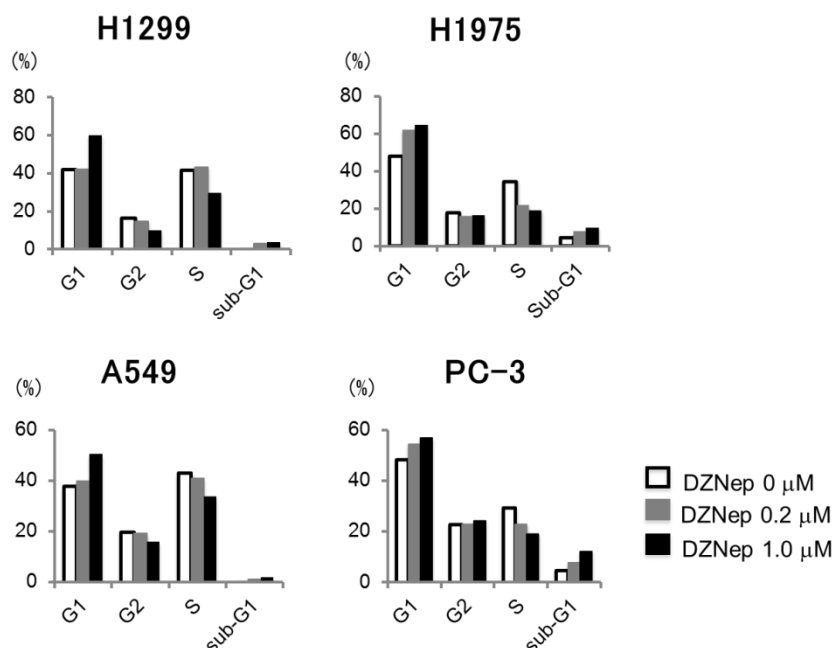


Figure 4 DZNep の非小細胞肺癌細胞株の細胞周期に対する効果

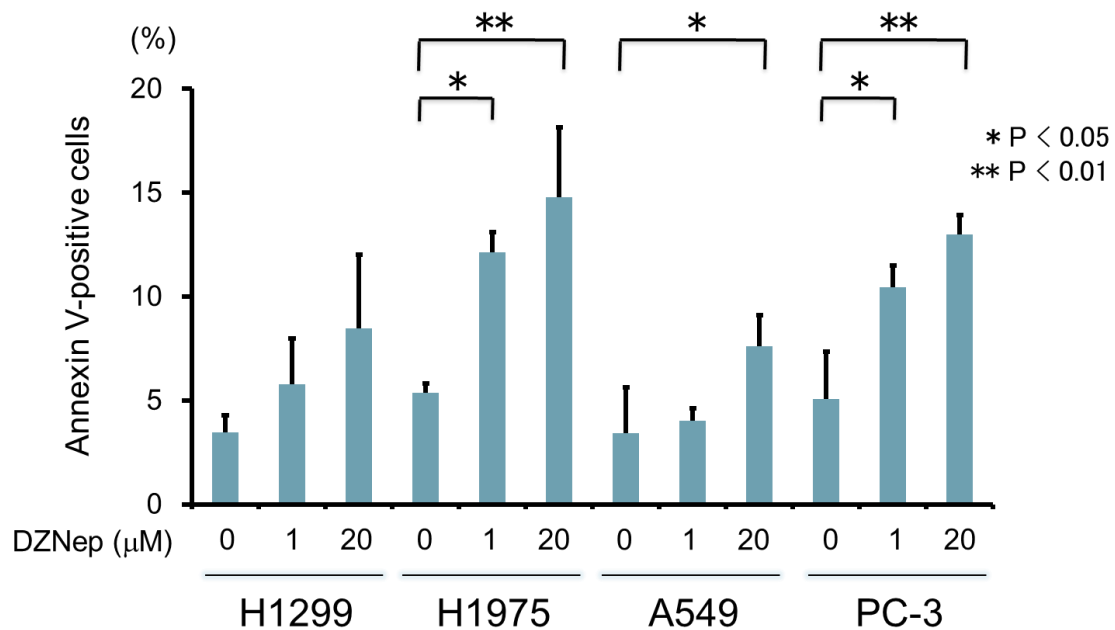


Figure 5 DZNep の非小細胞肺癌細胞株のアポトーシスに対する効果

4) DZNep の非小細胞肺癌細胞株の蛋白発現に対する影響の検討

次に DZNep が非小細胞肺癌細胞株の蛋白発現にどのような影響を与えるかをウェスタンブロット法を用いて検討をした。6well プレートで H1299、H1975、A549、PC-3 を各々一晩培養後、DZNep を添加 ($0.1 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$) し、72 時間後に回収した蛋白を用いた。以前、乳癌細胞株や大腸癌細胞株において、DZNep の投与により PRC2 蛋白群 (EZH2、SUZ12、EED) の発現が低下したと報告がなされていた³²が、その結果と一致して、今回検討した 4 種類の非小細胞肺癌細胞株においても DZNep によって PRC2 構成蛋白質である EZH2、SUZ12、EED の発現が低下した (Fig. 6)。また、ヒストンコアタンパク H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) の発現も低下していた。また、特に H1975 と PC-3 において、p27^{Kip1} の発現の亢進と cyclin A の発現の低下を認めた。その効果は H1299 と A549 においては軽微であった。

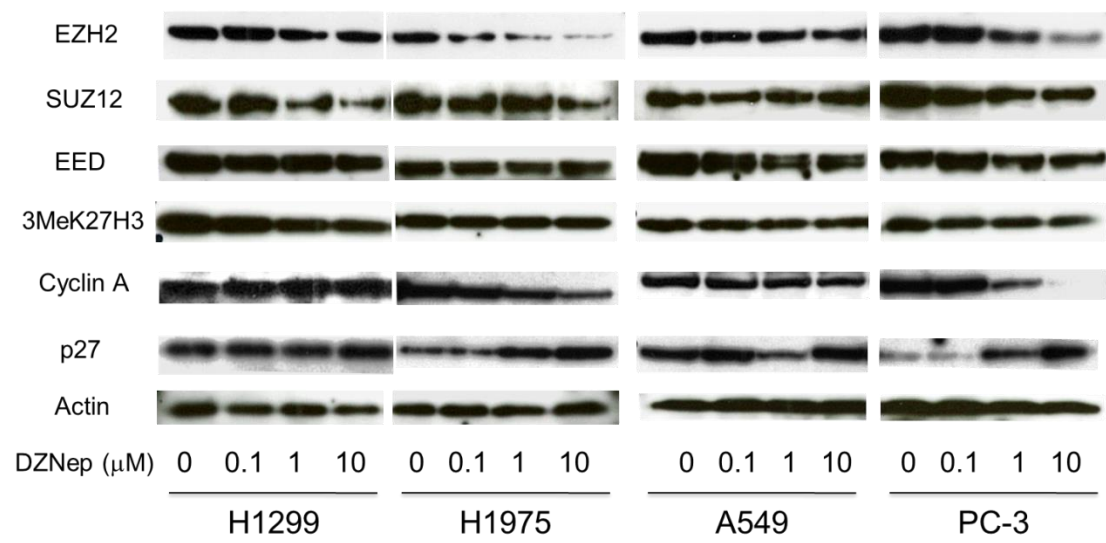


Figure 6 DZNep の非小細胞肺癌細胞株の各蛋白への効果

小括

DZNep の非小細胞肺癌細胞株に対する抗腫瘍効果

EZH2 の過剰発現は腫瘍の進展や予後不良であることと関連していることは、前立腺癌、乳癌、子宮癌、胃癌等の種々な癌腫で報告されている^{14, 20-22}。最近、我々を含めて、EZH2 は非小細胞肺癌においてもしばしば過剰発現しており、EZH2 の高発現は腫瘍の進展や予後不良と関連していたと報告されている^{29, 52}。過去の報告でも使用されていた H1299 や A549 を含む非小細胞肺癌細胞株において、本実験でも、siRNA による EZH2 のノックダウンで細胞の増殖が抑制されたことが示された。さらにヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害する DZNep を用いて EZH2 を薬物動態的に阻害したところ、非癌細胞より癌細胞に対して有意に高い感受性で、非小細胞肺癌細胞株の増殖が抑制された。これらの結果は他の癌腫における過去の報告と一致するものである³⁵⁻³⁹。また、DZNep によって PRC2 蛋白群 (EZH2、SUZ12、EED) や H3K27me3 の発現が低下することも過去の報告と一致している^{32, 34}。

一方、DZNep は元々 adenosylhomocysteine hydrolase 阻害薬として報告され³¹、S-adenosyl-L-methionine 依存性の様々なメチル化反応を間接的に阻害している。最近の報告では DZNep は H3K27me3 や H3K4me3、H4K20me3 等のヒストンメチル化も広く阻害しており、EZH2 以外のヒストンメチルトランスフェラーゼも DZNep によって抑制されている可能性が考えられている³⁵。しかしながら、本実験では EZH2 のノックダウンのみで非小細胞肺癌細胞の増殖を有意に抑制しており、少なくとも部分的には DZNep が EZH2 を含む PRC2 構成蛋白質や H3K27me3 の発現の抑制を介して、腫瘍細胞の増殖を抑制していると考えられる。

DZNep に関しては、肺癌細胞中のデオキシアザシチジン調節性のがん精巢抗原の発現を高め、癌細胞に対して T 細胞特異的な癌細胞の認識や溶解を増強するという報告はある⁵³が、我々の知る限り、DZNep が肺癌細胞の増殖に抑制的に働くという報告は初めてである。本実験の細胞周期に関する検討の結果により、非小細胞肺癌細胞株における DZNep の細胞増殖抑制効果は G1 細胞周期停止と関連すると考えられる。この結果は、DZNep を投与した急性骨髄性白血病細胞株においても同様の結果が報告されている³⁴。また、siRNA で EZH2 をノックダウンすると、同様に G1 細胞周期停止を誘導することは Ras 形質転換気管支上皮細胞⁵⁴ や A549³⁰、大腸癌細胞株⁵⁵ でも報告されている。DZNep は H1975 と PC-3 において cyclin A の発現を低下させ、p27^{Kip1} の発現を誘導したが、他の 2 つの細胞株ではこれらの蛋白に対する影響は少なかった。EZH2 は cyclin A の pRB2/p130-HDAC1 調節性の転写抑制を解除することが示されており⁵⁶、また、膀胱癌で EZH2 をノックダウンすると p27^{Kip1} の遺伝子が再活性化することも報告され

ている²⁵。cyclin A の減少もしくは p27^{Kip1} の上昇と G1 細胞周期停止との関係は様々な癌腫でも示されている^{57,58}。また一方、Fiskus らは DZNep は AML 細胞株において p16、p21、p27^{Kip1}、FBX032 の発現を誘導し、cyclin E や H0XA9 の発現を低下させたと報告している³⁴。これらの知見を勘案すると、DZNep の細胞増殖抑制効果は G1 細胞周期停止と関連しており、部分的に cyclin A の減少と p27^{Kip1} の上昇を介していることが示唆されるが、細胞株によっては異なる細胞プログラムが発動している可能性があると考えられる。

DZNep によって誘導されるアポトーシスは乳癌や肝細胞癌、急性骨髄性白血病細胞等の様々な癌種で報告されている^{32,34,38}。最近、Wu らは非小細胞肺癌細胞株の H1299 と A549 において、EZH2 は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を報告した⁵⁹。この知見は今回の結果と一致するものである。特に EGFR 遺伝子変異陽性で、EGFR-TKI 感受性の PC-3 (exon19 deletion) と EGFR-TKI 抵抗性の H1975 (L858R+T790M) において、その効果は顕著であった。この結果から、DZNep は EGFR-TKI 抵抗性の変異を含む EGFR 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌の治療に有用である可能性が考えられる。最近の知見で、発癌性の RAS が MEK/ERK 系シグナルを介して EZH2 の発現を誘導することが示された⁶⁰。このことも勘案すると、本実験の結果は非小細胞肺癌でしばしば認める活性型 EGFR 遺伝子変異が RAS/MEK/ERK 系シグナルを介して EZH2 を活性化し、DZNep によるアポトーシスの誘導を調整していることを示していると考えられる。また、PC-3 と H1975 では DZNep 誘導性のアポトーシスが顕著で、DZNep による EZH2 の発現の低下が強かったが、その顕著なアポトーシスは DZNep が細胞内に強く止まったり、分解が抑制されたりすることで引き起こされているのかもしれない。しかしながら、非小細胞肺癌細胞における DZNep によって誘導されるアポトーシスの正確な機序は依然はっきりしていない。

ここまでの小括として、メチルトランスフェラーゼ活性を有する EZH2 阻害剤である DZNep は、非小細胞肺癌細胞株の増殖を G1 細胞周期停止やアポトーシスを介して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。

5) 非小細胞肺癌細胞株における DZNep と SAHA の細胞増殖に対する影響の検討

前述したように DZNep は G1 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したが、最近、AML やマンツル細胞リンパ腫において、エピジェネティクスを制御する 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た^{34,61}。また EZH2 がその効果を発現するためには HDAC 活性が必要であるという報告もある¹⁸。そのため、抗腫瘍効果を高める可能性がある DZNep と HDAC 阻害剤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。本研究において、HDAC 阻害剤は過去の論文で DZNep との併用療法で相乗効果を示した SAHA (vorinostat) を選択した。

まず SAHA 単剤の非小細胞肺癌細胞株に対する効果を検討した。各細胞株を一晩培養後に SAHA を投与して 72 時間後に測定を実施した。結果、SAHA は 4 種類の非小細胞肺癌細胞株全てにおいて濃度依存性に細胞増殖を抑制した (Fig. 7)。各細胞株の IC_{50} は $1.36 \sim 2.43 \mu M$ の範囲であり、H1975 において最小であった。値としては DZNep の IC_{50} と比し、約 10 倍程度であった。

次に DZNep と SAHA の併用療法による非小細胞肺癌細胞株に対する細胞増殖抑制の効果を combination index plot によって解析をした。2 剤併用時の DZNep と SAHA の薬剤濃度は各々の IC_{50} の濃度に従い、濃度比率を 1:10 とし、濃度勾配をつけて投与を行った。DZNep と SAHA の併用療法はいずれの細胞株においても、Fa-CI plot で CI が概ね 0.9 以下を示し、両薬剤の相乗効果が認められた (Fig. 8)。特に H1975 においてその効果は顕著であった。

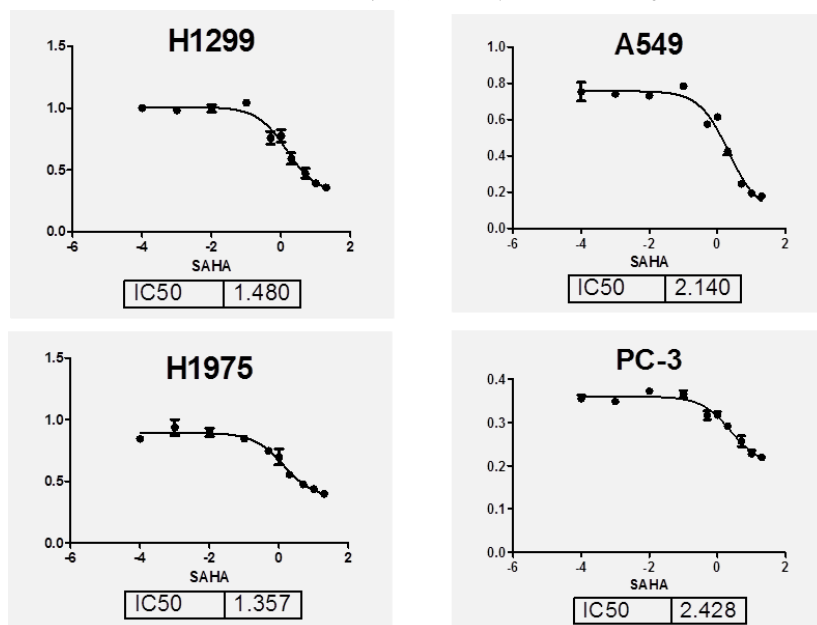


Figure 7 SAHA の非小細胞肺癌細胞株に対する増殖抑制効果

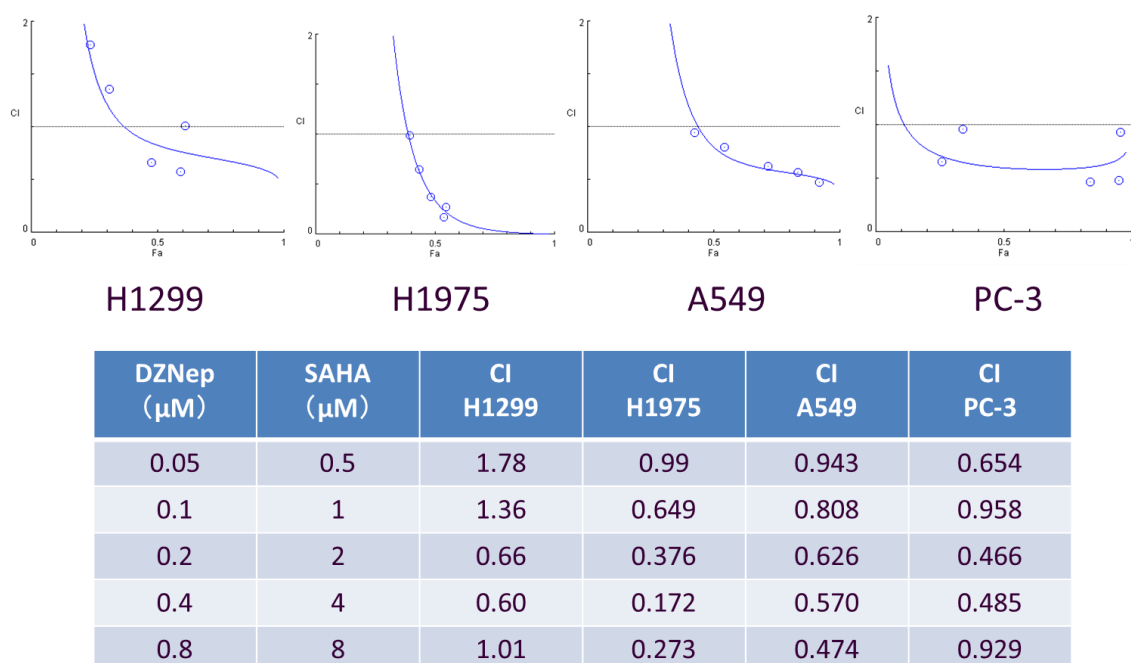


Figure 8 DZNep と SAHA の非小細胞肺癌細胞株に対する相乗効果

6) DZNep と SAHA の併用療法の蛋白発現に対する影響の検討

次に DZNep と SAHA の併用療法が非小細胞肺癌細胞株の蛋白発現にどのような影響を与えるかウエスタンブロット法を用いて検討をした。6well プレートで H1299、H1975、A549、PC-3 を各々一晩培養後、DZNep (0.2μ M) および SAHA (2μ M) を添加し、72 時間後に回収した蛋白を用いた。PRC2 蛋白群に対する DZNep の効果は 4) で前述したが、HDAC 阻害剤に関しても、急性骨髄性白血病細胞株において、HDAC 阻害剤の投与により PRC2 蛋白群 (EZH2、SUZ12、EED) の発現が低下したとの報告がなされた⁶²。その結果と一致して、今回検討した 4 種類の非小細胞肺癌細胞株においても DZNep および SAHA によって PRC2 構成蛋白質である EZH2、SUZ12、EED の発現が低下した (**Fig. 9A**)。また、ヒストンコアタンパク H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) の発現も低下した。cyclin A の発現の低下と p27^{Kip1} の発現の亢進も認めた。蛋白の種類や細胞株により程度の差はあるものの併用療法は各々単剤と比し、より強い効果を認めた。

続いて、ヒストンのアセチル化が細胞増殖の抑制に関与しているかについて、同じくウエスタンブロット法で解析をした。HDAC は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をより凝集して DNA の転写を抑制し、その結果、細胞の分化やアポトーシスを抑制すると考えられている。上記と同様に 6well プレートで H1299、H1975、A549、PC-3 を各々一晩培養後、DZNep

(0.2 μ M) および SAHA (2 μ M) を添加し、72 時間後に回収した蛋白を用いた。結果、細胞株やヒストンの部位により程度に差はあるものの併用療法によりヒストン H3K9、K14、K18、K27、K56 のアセチル化の亢進を認めた (Fig. 9B)。そのため、併用療法によって誘導されたヒストンのアセチル化は、非小細胞肺癌細胞の増殖を抑制する機序の一つである可能性が考えられた。

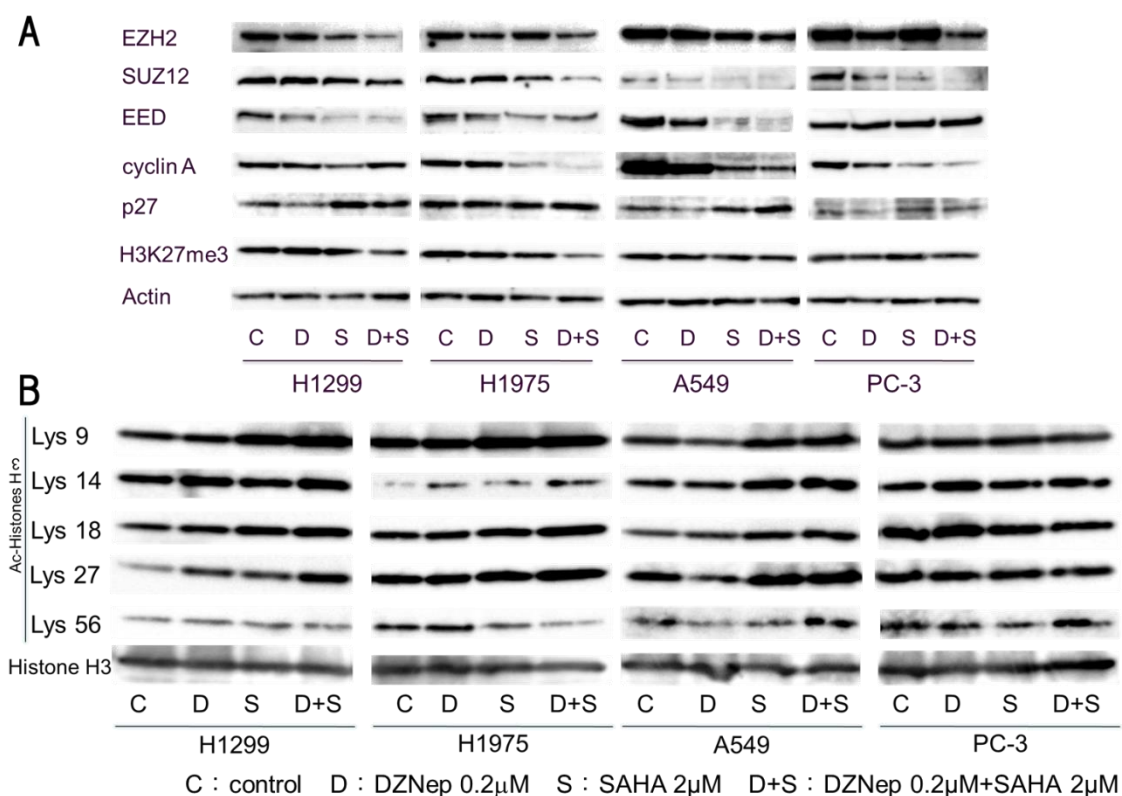


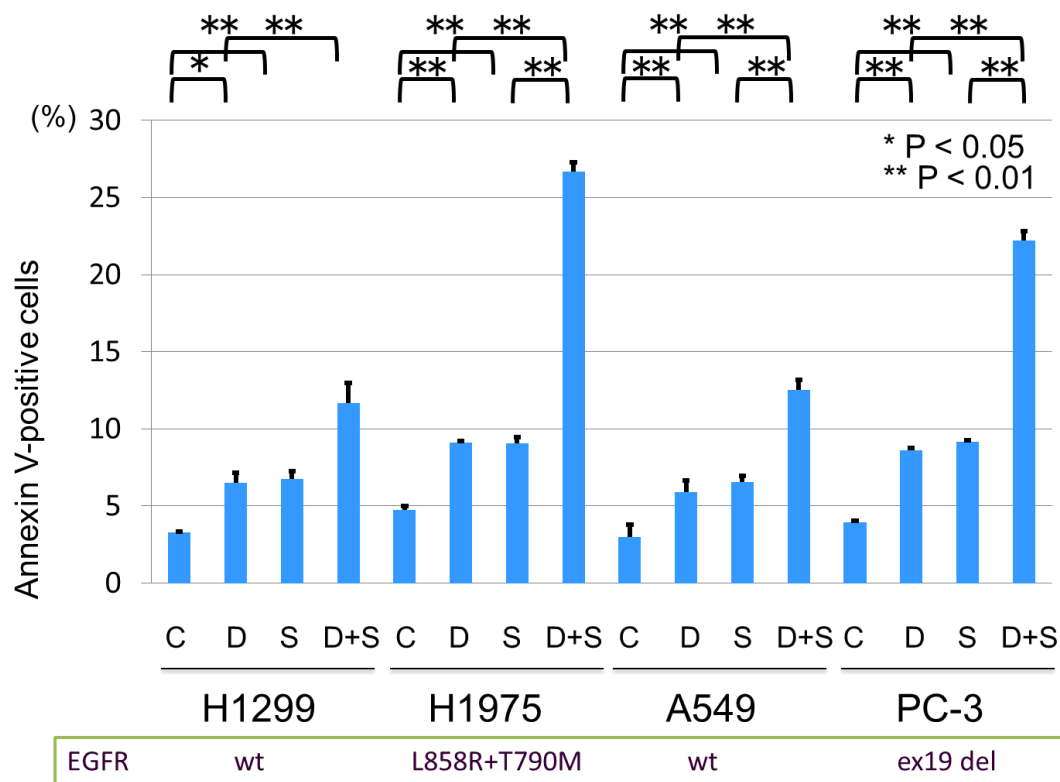
Figure 9 A : DZNep と SAHA の非小細胞肺癌細胞株の各蛋白に対する効果
B : DZNep と SAHA のヒストンアセチル化に対する効果

7) 非小細胞肺癌細胞株における DZNep と SAHA の併用療法のアポトーシスに対する影響の検討

次に我々はフローサイトメトリーを用いて、DZNep と SAHA の併用療法が非小細胞肺癌細胞株のアポトーシスにどのような影響を与えるかを検討した。6well プレートで H1299、H1975、A549、PC-3 を各々一晩培養後、DZNep (0.2 μ M) および SAHA (2 μ M) を添加し、72 時間後に Annexin V と PI で染色しフローサイトメトリーを用いて測定を実施した。その結果、DZNep および SAHA は 4 株全てにおいて対照群と比し有意にアポトーシスを誘導した。さらに、併用療法は各々単剤群と比し、有意にアポトーシスを誘導した。EGFR 遺伝子野

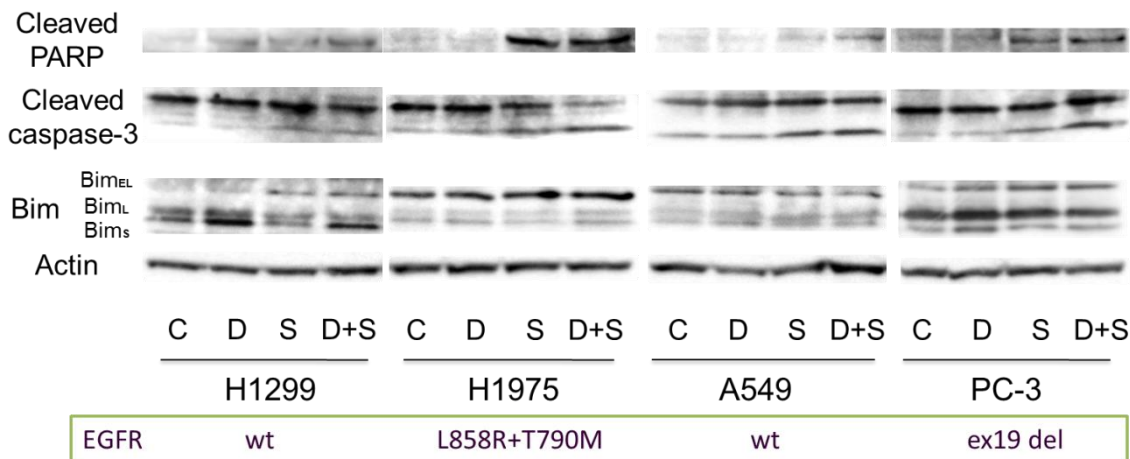
生型である H1299、A549 と比し、EGFR 遺伝子変異を有する H1975 と PC-3 では、その効果はより顕著であった (**Fig. 10**)。

さらに併用療法によって、各細胞株でアポトーシスの指標となる cleaved PARP と cleaved caspase-3 の発現も亢進していた (**Fig. 11**)。以前の報告から、DZNep や HDAC 阻害剤のアポトーシスを誘導する機序として Bim の発現に注目した。Bim は Bcl-2 family に属しており、アポトーシス促進性の蛋白である。特に、BH3 ドメインを含む isoform (BIM_{EL}、BIM_L、BIM_S) は Bim によるアポトーシスに不可欠であり、抗アポトーシス蛋白 (Bcl-2、Bcl-X_L、Mcl-1 等) に拮抗作用を示し、アポトーシス促進性の蛋白 (BAX、BAK 等) を活性化することでアポトーシスを誘導する^{63,64}。Wu らは非小細胞肺癌細胞株の H1299 と A549 において、EZH2 はエピジェネティックに Bim の発現を抑制すること、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 (**Fig. 12A**)。また一方、Nakagawa らは EGFR 遺伝子変異陽性であるものの Bim の 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 (**Fig. 12B**)。本実験においても Bim の発現についてウェスタンブロット法で検討をした結果、H1299 と H1975 において対照群と比し DZNep、SAHA、及び併用群で BH3 ドメインを含む isoform の発現が亢進していた (**Fig. 11**)。以上の結果から、併用療法において Bim の発現が DZNep と SAHA による非小細胞肺癌細胞株のアポトーシスを誘導する機序の一つである可能性が考えられた。



C : control D : DZNep 0.2 μ M S : SAHA 2 μ M D+S : DZNep 0.2 μ M+SAHA 2 μ M

Figure 10 DZNep と SAHA の非小細胞肺癌細胞株のアポトーシスに対する効果



C : control D : DZNep 0.2 μ M S : SAHA 2 μ M D+S : DZNep 0.2 μ M+SAHA 2 μ M

- * Cleaved caspase-3 に関しては分子量の低い方のバンドがアポトーシスを反映するバンドである。
- ** Bim に関しては分子量の高い順から Bim_{EL}、Bim_L、Bim_S を示しており、それぞれアポトーシス促進性である BH3 ドメインを含むアイソフォームである。

Figure 11 DZNep と SAHA のアポトーシス関連蛋白に対する効果

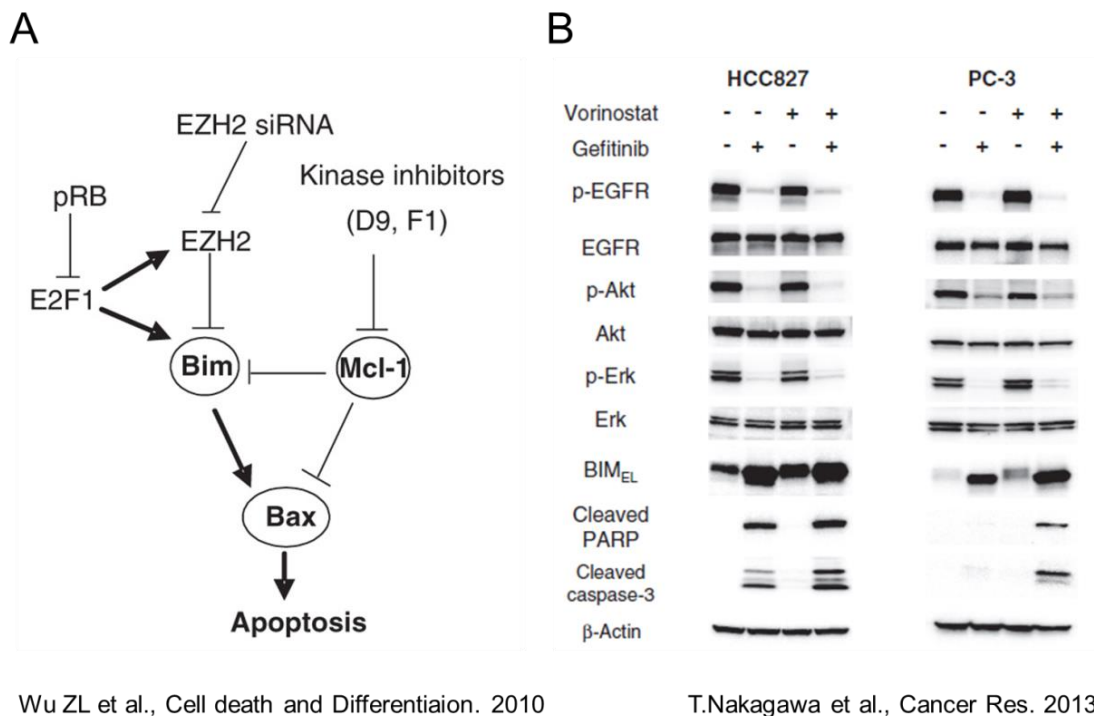


Figure 12 A: EZH2 ノックダウンの Bim の発現およびアポトーシスへの影響
B: SAHA と gefitinib の EGFR 遺伝子変異陽性株の各蛋白に対する効果

8) 非小細胞肺癌細胞株における DZNep と SAHA の併用療法の EGFR 経路および Wnt/ β カテニン経路に対する影響の検討

今までの結果から併用療法は EGFR 野生株である H1299 と A549 より遺伝子変異陽性株である H1975 と PC-3 においてより強くアポトーシスを誘導することが示された。そのため、次に併用療法が EGFR 経路に対してどのような影響を与えるかについてウエスタンブロット法を用いて検討をした。6well プレートで H1299、H1975、A549、PC-3 を各々一晩培養後、DZNep ($0.2 \mu\text{M}$) および SAHA ($2 \mu\text{M}$) を添加し、72 時間後に回収した蛋白を用いた。EGFR 遺伝子変異陽性株である H1975 と PC-3 では、ベースラインの EGFR リン酸化を強く認め、DZNep と SAHA は EGFR の発現を軽度、及びリン酸化、その下流の AKT と ERK1/2 のリン酸化を著明に低下させた (Fig. 13)。特に併用療法では強い効果を認めた。EGFR 野生株である H1299 と A549 に関してはベースラインのリン酸化 EGFR は軽度であり、DZNep と SAHA は EGFR の発現及び EGFR、AKT、ERK1/2 のリン酸化を軽度低下させた。いずれも併用療法で、その効果は高かった。

続いて併用療法が EGFR の発現を低下させる機序について検討をした。Cheng らは肝細胞癌細胞において siRNA を用いて EZH2 をノックダウンし、さらに HDAC

阻害剤である TSA を併用することでより強力に β カテニンの発現を抑制することを示した⁶⁵。Wnt/ β カテニン経路は Wnt が Frizzled/LDL 関連蛋白の共受容体複合体に結合することで細胞内の β カテニンが核内に移行し、EGFR や cyclin D1 等の転写を誘導する。Cheng らは、EZH2 が Wnt/ β カテニン経路に拮抗作用を示す AXIN2、NKD1、PPP2R2B、PBICKLE1、SFRP5 の発現を抑制することで Wnt/ β カテニン経路を促進させることを報告した (Fig. 14)。ChIP array による検討では、EZH2 は特に NKD1、PPP2R2B のプロモーター領域への結合が強かった。そのため、本実験では併用療法が Wnt/ β カテニン経路にどのような影響を与えるかについてウエスタンブロット法を用いて検討した。その結果、いずれの細胞株においても併用療法によって NKD1 の発現が亢進していた。また、H1975 においては PPP2R2B の発現も亢進していた (Fig. 15A)。一方、 β -カテニンの低下は H1975、cyclin D1 の低下は H1975、A549 と PC-3 において認められた。 (Fig. 15B)。

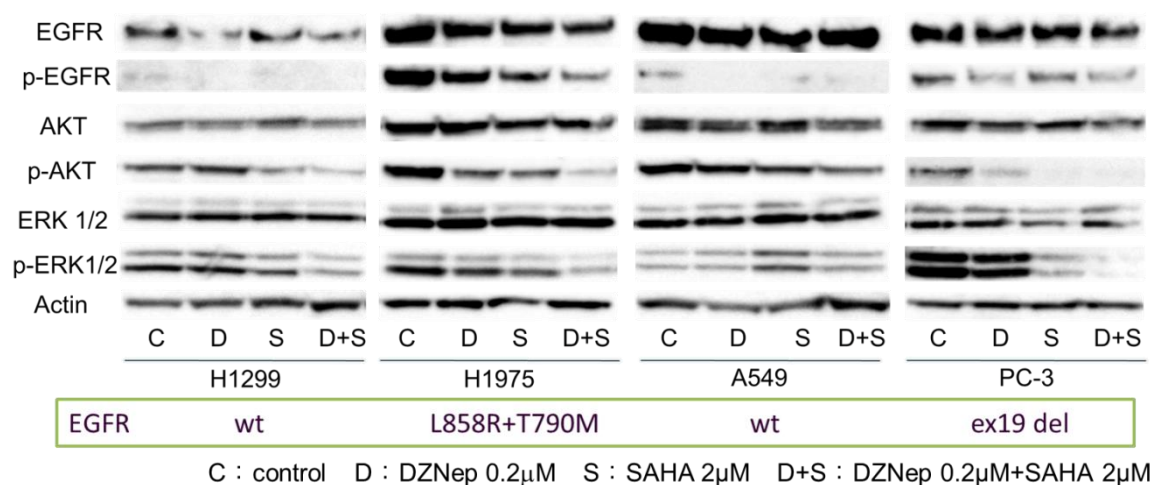


Figure 13 DZNep と SAHA の EGFR シグナル経路への効果

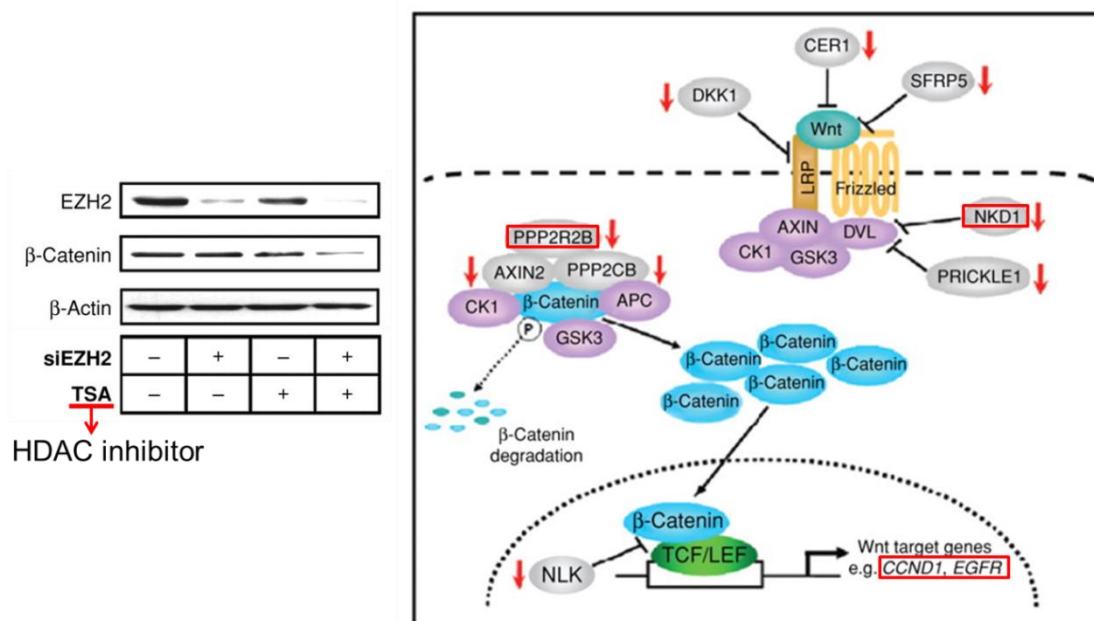


Figure 14 EZH2 と Wnt/β カテニン経路との関係

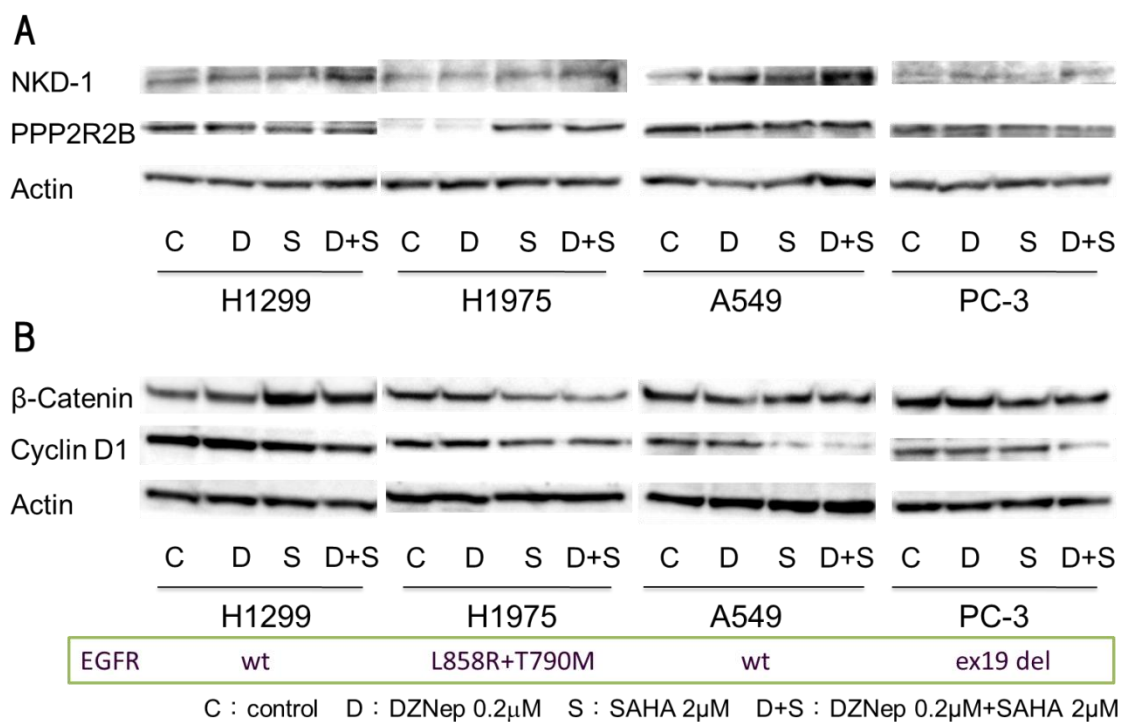


Figure 15 DZNep と SAHA の Wnt/β カテニン経路に関連する蛋白群への効果

9) H1975 ゼノグラフトマウスモデルを用いた DZNep と SAHA の併用療法の抗腫瘍効果の検討

6 週齢の雌のヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu) で H1975 ゼノグラフトマウスモデルを作成した。対照群 (5%DMSO)、DZNep 投与群 (DZNep:4mg/kg)、SAHA 投与群 (SAHA:40mg/kg)、DZNep+SAHA 併用群 (DZNep:4mg/kg+ SAHA:40mg/kg) の 4 群に分けて、各群 5 匹ずつ用いて検討した。薬剤は週 2 回、6 週間にかけて投与した。

結果、DZNep、SAHA 単剤のみでも対照群と比し有意に腫瘍の形成を抑制した。さらに、併用療法群は各々単剤群と比べて有意に腫瘍の形成を抑制した (Fig. 16A)。本実験の治療で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 (Fig. 16B)。

次に上記治療において Day39 にマウスを安楽死させてすぐに腫瘍を切除し、腫瘍組織から蛋白を抽出してウエスタンブロット法で併用療法の EZH2 や H3K27me3 の発現及び EGFR シグナルへの影響を検討した。*in vitro* の結果と同様に、対照群と比し併用療法により EZH2 と H3K27me3 の発現が低下していた (Fig. 16C)。また、EGFR のリン酸化とその下流の AKT、ERK1/2 のリン酸化も抑制されていた。

A

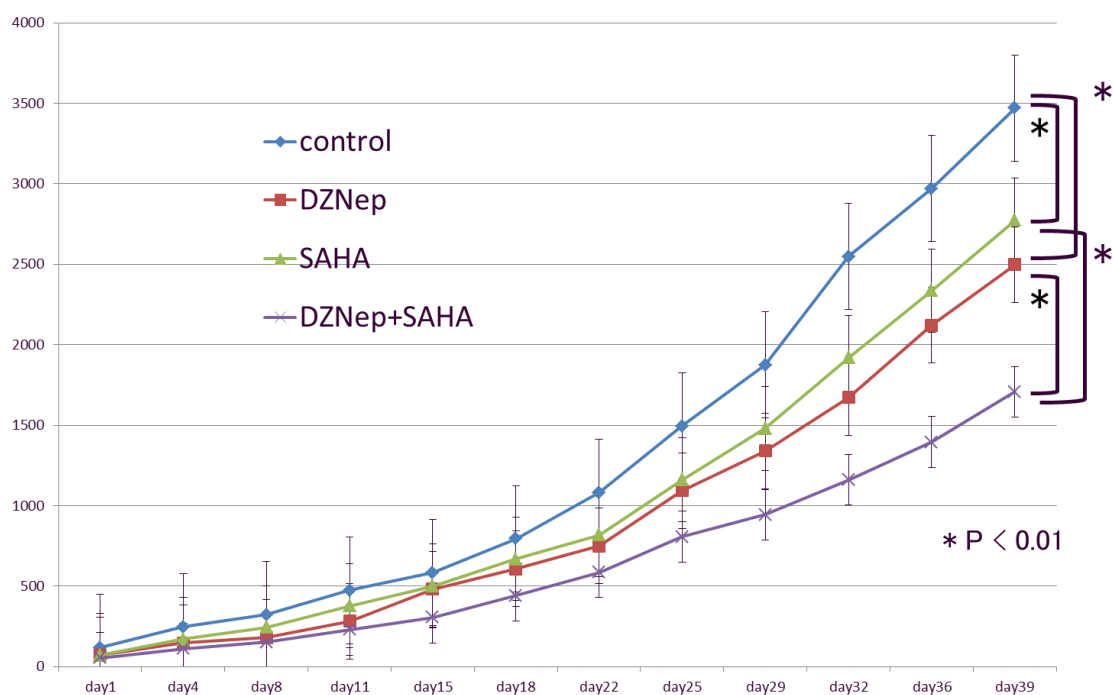
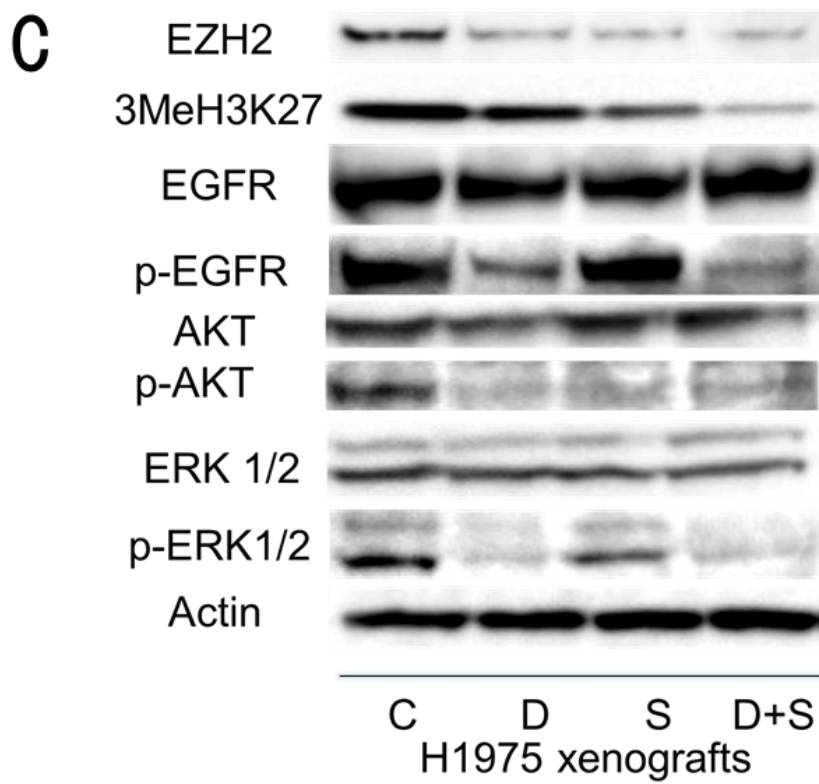
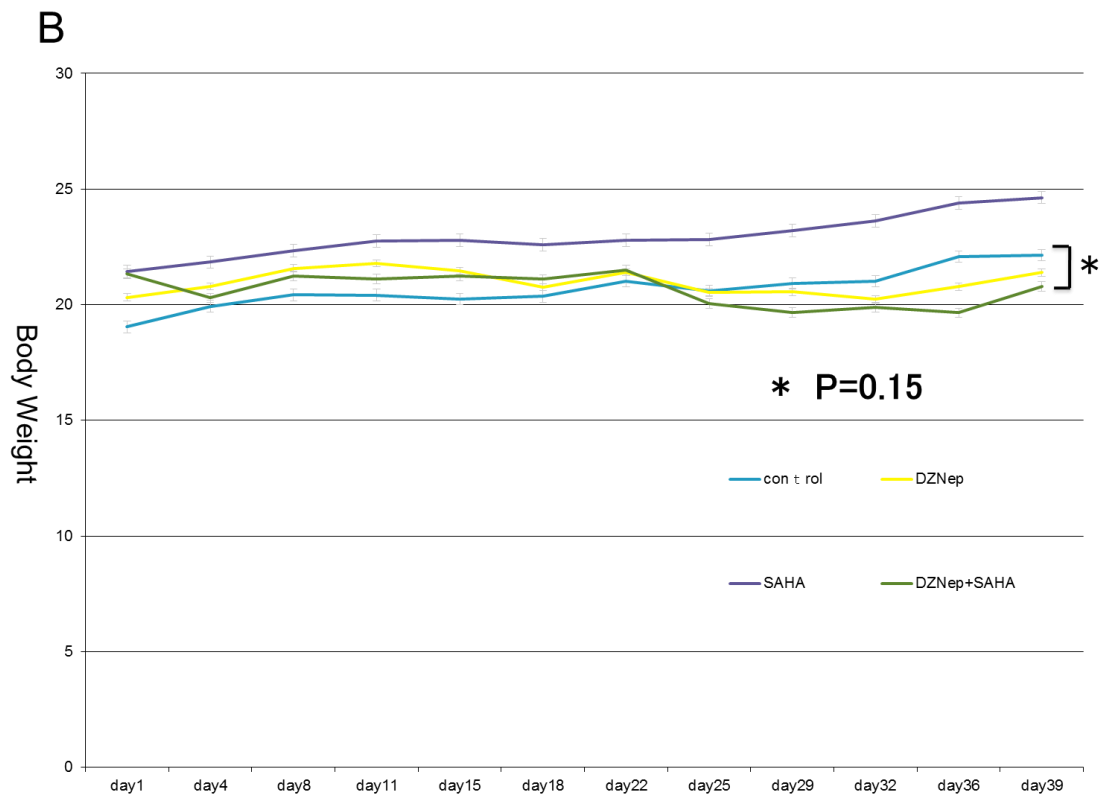


Figure 16 A: DZNep と SAHA の H1975 ゼノグラフトモデルにおける抗腫瘍効果



B: DZNep と SAHA の投与中におけるマウスの体重変化

C: DZNep と SAHA のゼノグラフトマウスにおける各蛋白への効果

考察

前述したように、DZNep は乳癌³²、膠芽細胞腫³⁶、急性骨髄性白血病³⁴、神経芽細胞腫⁶⁶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⁶⁷、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⁶⁸⁻⁷¹。

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、複数の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^{34, 38, 61, 72}。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⁷²。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³²。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^{73, 74}。PRC2 の活性には HDAC との結合が必要であり¹⁸、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^{34, 61}。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。前述したように、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⁵⁹。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⁷⁵。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あると考えられた。

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⁷⁶。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。一方前述したように、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⁶⁵。Wnt/ β カテニン経路は肺癌においても活性化されており^{77,78}、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^{79,80}。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、膀胱癌細胞株に対して DZNep を膀胱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⁸¹。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⁸²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⁸³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⁸⁴。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。

今回の研究結果による結論として、DZNep と SAHA の併用は EGFR-TKI 抵抗性の細胞株を含む非小細胞肺癌細胞株に対し、*in vitro* 及び *in vivo* において EGFR シグナル経路を抑制し、相乗的に細胞増殖の抑制とアポトーシスを誘導することが示唆された。EZH2 と HDAC を標的とした併用療法は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る。

総括及び結論

今回、本研究の後半で得られた新知見として

- DZNep と SAHA の併用療法は、非小細胞肺癌細胞株の増殖を相乗的に抑制し、EZH2 を含めた PRC2 構成蛋白質とヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化の発現を各々単剤より低下させた。
- 併用療法により p27 の上昇と cyclin A の低下を強く認めた。
- 併用療法は単剤より強くアポトーシスを誘導し、その機序には Bim の発現が一部関与していた。
- 併用療法によるアポトーシスの誘導は EGFR 遺伝子変異陽性細胞により強く認められ、EGFR リン酸化と EGFR 下流シグナルの抑制が認められた。
- 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、EGFR の転写誘導因子である b-catenin やその下流の cyclinD1 の発現を一部の細胞株で抑制した。
- EGFR-TKI 抵抗性の H1975 ゼノグラフトマウスモデルにおいて、併用療法による高い抗腫瘍効果を認めた。

が得られた。

今回の新知見の意義は、EZH2 阻害剤である DZNep と HDAC 阻害剤である SAHA の併用療法が、*in vitro* 及び *in vivo* で非小細胞肺癌細胞に対して相乗的な抗腫瘍効果を発揮し、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を示したことである。

現在、DZNep を用いた臨床試験は実施されていないが、SAHA を用いた固形癌の臨床試験は肺癌を含め、悪性黒色腫、膵臓癌、血液系の悪性腫瘍を中心に進行している。ただこれらの併用という観点では臨床試験は行われていない。また DZNep や SAHA 単独では肺癌に対する治療効果には限界があると考えられ、今回の我々の結果からこれら二者を併用することが可能なこと、また既存の治療に併用することで更なる抗腫瘍効果が得られる可能性があることが示唆された。また、SAHA の臨床試験における制限毒性に水様性下痢や皮疹があるが、今回の併用治療ではマウスに重篤な副作用発現は認められず、今後更なる実験データや臨床試験が必要ではあるが、DZNep との併用は実現可能なものと考えられる。それに加えて、EZH2 に対するより選択的な阻害剤が開発された^{85,86}。これらの薬剤の非小細胞肺癌細胞に対する効果についても興味深いため、今後当研究室でも検討を重ねていく予定である。今回の結果から非小細胞肺癌に対する治療選択として EZH2 と HDAC を標的とした治療法は今後重要な戦略となる可能性を秘めていると考えられる。

謝辞

本研究の機会を与えていただいた、北海道大学大学院医学研究科内科学講座呼吸器内科学分野 西村正治教授に深謝致します。ならびに、適切な助言と直接の御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究科内科学講座腫瘍内科学分野 木下一郎准教授、秋田弘俊教授、清水康助教、また北海道大学大学院医学研究科内科学講座呼吸器内科学分野 大泉聡史准教授、榊原純助教、菊地順子医師に感謝の意を表します。University of Texas Southwestern Medical Center の Dr. John D Minna ならびに University of California の Dr. Dieter C. Gruenert からは細胞株を、National Cancer Institute の Marquez 博士からは DZNep を提供していただきました。この場を借りて感謝の意を表します。

引用文献

- 1 Herbst, R. S., Heymach, J. V. & Lippman, S. M. Lung cancer. *N Engl J Med.* **359**, 1367-1380 (2008).
- 2 Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. *BMJ.* **311**, 899-909 (1995).
- 3 Fossella, F. *et al.* Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: the TAX 326 study group. *J Clin Oncol.* **21**, 3016-3024 (2003).
- 4 Kelly, K. *et al.* Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. *J Clin Oncol.* **19**, 3210-3218 (2001).
- 5 Scagliotti, G. V. *et al.* Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* **20**, 4285-4291 (2002).
- 6 Schiller, J. H. *et al.* Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* **346**, 92-98 (2002).
- 7 Ohe, Y. *et al.* Randomized phase III study of cisplatin plus irinotecan versus carboplatin plus paclitaxel, cisplatin plus gemcitabine, and cisplatin plus vinorelbine for advanced non-small-cell lung cancer: Four-Arm Cooperative Study in Japan. *Ann Oncol.* **18**, 317-323 (2007).
- 8 Takano, T. *et al.* Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* **23**, 6829-6837 (2005).
- 9 Maemondo, M. *et al.* Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med.* **362**, 2380-2388 (2010).
- 10 Johnson, D. H. *et al.* Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* **22**, 2184-2191 (2004).

- 11 Kwak, E. L. *et al.* Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* **363**, 1693-1703 (2010).
- 12 Ringrose, L. & Paro, R. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet.* **38**, 413-443 (2004).
- 13 Juergens, R. A. *et al.* Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* **1**, 598-607 (2011).
- 14 Varambally, S. *et al.* The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419**, 624-629 (2002).
- 15 Saito, T. *et al.* E-cadherin mutation and Snail overexpression as alternative mechanisms of E-cadherin inactivation in synovial sarcoma. *Oncogene* **23**, 8629-8638 (2004).
- 16 Takeno, S. *et al.* E-cadherin expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation, Snail overexpression, and clinicopathologic implications. *Am J Clin Pathol.* **122**, 78-84 (2004).
- 17 Sparmann, A. & van Lohuizen, M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer.* **6**, 846-856 (2006).
- 18 van der Vlag, J. & Otte, A. P. Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat Genet.* **23**, 474-478 (1999).
- 19 Cao, R. & Zhang, Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell.* **15**, 57-67 (2004).
- 20 Kleer, C. G. *et al.* EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 11606-11611 (2003).
- 21 Bachmann, I. M. *et al.* EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol.* **24**, 268-273 (2006).
- 22 Matsukawa, Y. *et al.* Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci.* **97**, 484-491 (2006).
- 23 Wagener, N. *et al.* Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is

- an independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. **10**, 524 (2010).
- 24 McCabe, M. T. *et al.* Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**, 2989-2994 (2012).
 - 25 Ougolkov, A. V., Bilim, V. N. & Billadeau, D. D. Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2. *Clin Cancer Res*. **14**, 6790-6796 (2008).
 - 26 Wagener, N. *et al.* The enhancer of zeste homolog 2 gene contributes to cell proliferation and apoptosis resistance in renal cell carcinoma cells. *Int J Cancer*. **123**, 1545-1550 (2008).
 - 27 Breuer, R. H. *et al.* Increased expression of the EZH2 polycomb group gene in BMI-1-positive neoplastic cells during bronchial carcinogenesis. *Neoplasia* **6**, 736-743 (2004).
 - 28 Hussain, M. *et al.* Tobacco smoke induces polycomb-mediated repression of Dickkopf-1 in lung cancer cells. *Cancer Res*. **69**, 3570-3578 (2009).
 - 29 Kikuchi, J. *et al.* Distinctive expression of the polycomb group proteins Bmi1 polycomb ring finger oncogene and enhancer of zeste homolog 2 in nonsmall cell lung cancers and their clinical and clinicopathologic significance. *Cancer* **116**, 3015-3024 (2010).
 - 30 Takawa, M. *et al.* Validation of the histone methyltransferase EZH2 as a therapeutic target for various types of human cancer and as a prognostic marker. *Cancer Sci*. **102**, 1298-1305 (2011).
 - 31 Glazer, R. I. *et al.* 3-Deazaneplanocin: a new and potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and its effects on human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Biochem Biophys Res Commun*. **135**, 688-694 (1986).
 - 32 Tan, J. *et al.* Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev*. **21**, 1050-1063 (2007).
 - 33 Jiang, X. *et al.* DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications. *Cancer Cell*. **13**, 529-541 (2008).

- 34 Fiskus, W. *et al.* Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* **114**, 2733-2743 (2009).
- 35 Miranda, T. B. *et al.* DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther.* **8**, 1579-1588 (2009).
- 36 Suva, M. L. *et al.* EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Res.* **69**, 9211-9218 (2009).
- 37 Crea, F. *et al.* Pharmacologic disruption of Polycomb Repressive Complex 2 inhibits tumorigenicity and tumor progression in prostate cancer. *Mol Cancer.* **10**, 40 (2011).
- 38 Hayden, A., Johnson, P. W., Packham, G. & Crabb, S. J. S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibition by 3-deazaneplanocin A analogues induces anti-cancer effects in breast cancer cell lines and synergy with both histone deacetylase and HER2 inhibition. *Breast Cancer Res Treat.* **127**, 109-119 (2011).
- 39 Kemp, C. D. *et al.* Polycomb repressor complex-2 is a novel target for mesothelioma therapy. *Clin Cancer Res.* **18**, 77-90 (2012).
- 40 Kelly, W. K. *et al.* Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clin Cancer Res.* **9**, 3578-3588 (2003).
- 41 Kelly, W. K. *et al.* Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol.* **23**, 3923-3931 (2005).
- 42 Rubin, E. H. *et al.* A study to determine the effects of food and multiple dosing on the pharmacokinetics of vorinostat given orally to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* **12**, 7039-7045 (2006).
- 43 Duvic, M. *et al.* Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* **109**, 31-39 (2007).
- 44 Yu, J. *et al.* Integrative genomics analysis reveals silencing of beta-adrenergic signaling by polycomb in prostate cancer. *Cancer Cell.* **12**, 419-431 (2007).
- 45 Rhodes, D. R., Sanda, M. G., Otte, A. P., Chinnaiyan, A. M. & Rubin, M. A. Multiplex biomarker approach for determining risk of

- prostate-specific antigen-defined recurrence of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* **95**, 661-668 (2003).
- 46 Nagai, Y. *et al.* Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Cancer Res.* **65**, 7276-7282 (2005).
- 47 Ramirez, R. D. *et al.* Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer Res.* **64**, 9027-9034 (2004).
- 48 Cozens, A. L. *et al.* CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **10**, 38-47 (1994).
- 49 Chou, T. C. & Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* **22**, 27-55 (1984).
- 50 Chou, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* **70**, 440-446 (2010).
- 51 Cao, C., Mu, Y., Hallahan, D. E. & Lu, B. XIAP and survivin as therapeutic targets for radiation sensitization in preclinical models of lung cancer. *Oncogene* **23**, 7047-7052 (2004).
- 52 Huqun *et al.* Enhancer of zeste homolog 2 is a novel prognostic biomarker in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* **118**, 1599-1606 (2012).
- 53 Rao, M. *et al.* Inhibition of histone lysine methylation enhances cancer-testis antigen expression in lung cancer cells: implications for adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res.* **71**, 4192-4204 (2011).
- 54 Watanabe, H. *et al.* Deregulation of histone lysine methyltransferases contributes to oncogenic transformation of human bronchoepithelial cells. *Cancer Cell Int.* **8**, 15 (2008).
- 55 Fussbroich, B. *et al.* EZH2 depletion blocks the proliferation of colon cancer cells. *PLoS One* **6**, e21651 (2011).
- 56 Tonini, T., Bagella, L., D'Andrilli, G., Claudio, P. P. & Giordano, A. Ezh2 reduces the ability of HDAC1-dependent pRb2/p130 transcriptional repression of cyclin A. *Oncogene* **23**, 4930-4937 (2004).
- 57 Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A. & Lamb, N. J. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* **67**, 1169-1179 (1991).

- 58 Resnitzky, D., Hengst, L. & Reed, S. I. Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol.* **15**, 4347-4352 (1995).
- 59 Wu, Z. L. *et al.* Polycomb protein EZH2 regulates E2F1-dependent apoptosis through epigenetically modulating Bim expression. *Cell Death Differ.* **17**, 801-810 (2010).
- 60 Fujii, S. *et al.* RAS oncogenic signal upregulates EZH2 in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* **417**, 1074-1079 (2012).
- 61 Fiskus, W. *et al.* Superior efficacy of a combined epigenetic therapy against human mantle cell lymphoma cells. *Clin Cancer Res.* **18**, 6227-6238 (2012).
- 62 Fiskus, W. *et al.* Histone deacetylase inhibitors deplete enhancer of zeste 2 and associated polycomb repressive complex 2 proteins in human acute leukemia cells. *Mol Cancer Ther.* **5**, 3096-3104 (2006).
- 63 O'Connor, L. *et al.* Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* **17**, 384-395 (1998).
- 64 Chen, L. *et al.* Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell.* **17**, 393-403 (2005).
- 65 Cheng, A. S. *et al.* EZH2-mediated concordant repression of Wnt antagonists promotes beta-catenin-dependent hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* **71**, 4028-4039 (2011).
- 66 Wang, C. *et al.* EZH2 Mediates epigenetic silencing of neuroblastoma suppressor genes CASZ1, CLU, RUNX3, and NGFR. *Cancer Res.* **72**, 315-324 (2012).
- 67 Xargay-Torrent, S. *et al.* Vorinostat-induced apoptosis in mantle cell lymphoma is mediated by acetylation of proapoptotic BH3-only gene promoters. *Clin Cancer Res.* **17**, 3956-3968 (2011).
- 68 Millward, M. *et al.* Phase 1 clinical trial of the novel proteasome inhibitor marizomib with the histone deacetylase inhibitor vorinostat in patients with melanoma, pancreatic and lung cancer based on in vitro assessments of the combination. *Invest New Drugs.* **30**, 2303-2317 (2012).
- 69 Dasari, A. *et al.* A phase I study of sorafenib and vorinostat in patients with advanced solid tumors with expanded cohorts in renal cell carcinoma and non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs.* **31**,

- 115-125 (2013).
- 70 Hoang, T. *et al.* Vorinostat and bortezomib as third-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer: a Wisconsin Oncology Network Phase II study. *Invest New Drugs*. **32**, 195-199, (2014).
 - 71 Reguart, N. *et al.* Phase I/II trial of vorinostat (SAHA) and erlotinib for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations after erlotinib progression. *Lung Cancer* (2014).
 - 72 Yamaguchi, J. *et al.* Histone deacetylase inhibitor (SAHA) and repression of EZH2 synergistically inhibit proliferation of gallbladder carcinoma. *Cancer Sci*. **101**, 355-362 (2010).
 - 73 Montgomery, N. D. *et al.* The murine polycomb group protein Eed is required for global histone H3 lysine-27 methylation. *Curr Biol*. **15**, 942-947 (2005).
 - 74 Pasini, D., Bracken, A. P., Jensen, M. R., Lazzerini Denchi, E. & Helin, K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J*. **23**, 4061-4071 (2004).
 - 75 Nakagawa, T. *et al.* EGFR-TKI resistance due to BIM polymorphism can be circumvented in combination with HDAC inhibition. *Cancer Res*. **73**, 2428-2434 (2013).
 - 76 Chen, M. C. *et al.* The HDAC inhibitor, MPT0E028, enhances erlotinib-induced cell death in EGFR-TKI-resistant NSCLC cells. *Cell Death Dis*. **4**, e810 (2013).
 - 77 Winn, R. A. *et al.* gamma-Catenin expression is reduced or absent in a subset of human lung cancers and re-expression inhibits transformed cell growth. *Oncogene* **21**, 7497-7506 (2002).
 - 78 Lim, J. H., Park, J. W. & Chun, Y. S. Human arrest defective 1 acetylates and activates beta-catenin, promoting lung cancer cell proliferation. *Cancer Res*. **66**, 10677-10682 (2006).
 - 79 You, L. *et al.* Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene* **23**, 6170-6174 (2004).
 - 80 Nguyen, D. X. *et al.* WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis. *Cell* **138**, 51-62 (2009).
 - 81 Avan, A. *et al.* Molecular mechanisms involved in the synergistic

- interaction of the EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A with gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther.* **11**, 1735-1746 (2012).
- 82 Schneider, B. J. *et al.* Phase I study of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, NSC 701852) in combination with docetaxel in patients with advanced and relapsed solid malignancies. *Invest New Drugs.* **30**, 249-257 (2012).
- 83 Gray, J. E. *et al.* A Phase I, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Study of Panobinostat, an HDAC Inhibitor, Combined with Erlotinib in Patients with Advanced Aerodigestive Tract Tumors. *Clin Cancer Res.* **20**, 1644-1655 (2014).
- 84 Witta, S. E. *et al.* Randomized phase II trial of erlotinib with and without entinostat in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed on prior chemotherapy. *J Clin Oncol.* **30**, 2248-2255 (2012).
- 85 Qi, W. *et al.* Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**, 21360-21365 (2012).
- 86 Knutson, S. K. *et al.* Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, 7922-7927 (2013).