

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 高階 太一

学位論文題名

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)

【背景・目的】ポリコム (PcG) 遺伝子群はショウジョウバエの発生に必要な homeobox 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。PcG 蛋白質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おり、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。EZH2 (enhancer of zeste homologue 2) は PcG 蛋白複合体 PRC2 中のメチルトランスフェラーゼ活性を担う蛋白質であり、ヒストンコア蛋白 H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) を介して様々な腫瘍抑制遺伝子の転写を抑制している。EZH2 は正常組織にはほとんど発現しておらず、様々な癌腫で過剰発現し、その高発現が予後不良と関係していることが報告されている。また、最近では B 細胞性リンパ腫のサブセットにおいて EZH2 の活性化遺伝子変異も同定された。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非小細胞肺癌を含む様々な癌腫で報告された。これらの知見から EZH2 は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。

1986 年にアデノシルホモシステインヒドラーゼ阻害剤として発見された小分子化合物 3-Deazaneplanocin A (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 2007 年に報告された。また、EZH2 が効果を発現するには histone deacetylase (HDAC) の活性が必要との報告がなされ、急性骨髄性白血病では DZNep と HDAC 阻害剤の併用療法は相乗的にアポトーシスを誘導したことが示された。しかし、これまで非小細胞肺癌における DZNep の作用やこれらの薬剤との併用効果は明らかではない。そのため、今回我々は非小細胞肺癌細胞株に対する DZNep の抗腫瘍効果ならびに HDAC 阻害剤との併用効果について検討をした。

【材料と方法】非小細胞肺癌細胞株 H1299、A549、PC-3、H1975 を用いて、細胞増殖やアポトーシスへの影響を、MTT 法、ウェスタンブロット法、標識 Annexin V を用いた FACS 法で解析した。また H1975 マウスゼノグラフトモデルで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、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 ~ 1.0 μ 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 H1975 と PC-3 においてその効果は顕著であった。Western blot 法による解析では、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。

次に 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を認めた。また、併用療法は相加・相乗的にアポトーシスを誘導し、その機序には Bim の発現が関与していると考えられた。特に EGFR 変異陽性を有する H1975 と PC-3 においてその効果は顕著であり、EGFR の発現とリン酸化、及び下流の AKT と ERK1/2 のリン酸化を強く抑制した。また、Wnt/ β -カテニン経路に拮抗作用を示す NKD1 の発現を誘導し、 β -カテニンやその下流の EGFR、cyclin D1 の発現を抑制した。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形成を抑制した。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】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。一方、HDAC 阻害剤である SAHA はすでに進行期非小細胞肺癌細胞の患者に対するいくつかの臨床試験も実施されている。

本研究は EZH2 と HDAC の同時阻害が非小細胞肺癌に対して相乗効果を示した初めての報告である。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に関連していた。

これまでの知見と本研究結果と合わせて、BIM が非小細胞肺癌細胞株における DZNep と SAHA は EGFR によって誘導されるアポトーシスのエフェクターであることが示唆された。また、EGFR 遺伝子変異陽性株においても、併用療法は主に 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と考えられた。併用療法は EGFR-TKI 抵抗性の H1975 ゼノグラフトマウスモデルの腫瘍の増大も抑制し、EGFR-TKI 抵抗性の細胞株を含む非小細胞肺癌に対する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。

【結論】今回の検討で DZNep 単剤は G1 期細胞停止やアポトーシスを誘導することにより非小細胞肺癌細胞の増殖を抑制した。また、HDAC 阻害剤である SAHA との併用療法では相乗的に非小細胞肺癌細胞の増殖を抑制した。EZH2 と HDAC を標的とした併用療法は、非小細胞肺癌細胞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。