

令和元年5月20日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11023

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌に対する新規LSD1阻害剤とオートファジー制御による治療の開発

研究課題名(英文) A basic research for novel treatment for castration resistant prostate cancer via LSD1 and autophagy

研究代表者

恵谷 俊紀 (ETANI, TOSHIKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30600754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌細胞株を用いて、*in vitro*および*in vivo*でLSD1阻害剤およびオートファジー阻害剤の効果の検討を行った。WSTアッセイではNCL1は濃度依存的に細胞増殖抑制効果を認めた。NCL1投与によりオートファジーが誘導されていた。オートファジー阻害剤の併用により、NCL1の抗腫瘍効果は増強された。

動物モデルでの検討では、NCL1投与群はコントロール群に比較し有意に腫瘍体積が小さく、CD31陽性腫瘍血管数の有意な減少と、アポトーシスの誘導を認めた。臨床検体を用いた検討では前立腺癌の悪性度とLSD1発現は関連があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌は世界で最も多くみられるがんの一つとなり、本邦でもその発生は増加の一途をたどっている。前立腺癌は初期治療に抵抗性となると治療が困難となり、新規治療法の開発が強く望まれている。私たちはエピゲノム酵素のひとつであるLSD1のその治療標的としての意義に着目し、各種の泌尿器癌で研究を進めてきた。本研究は、これまでの去勢感受性前立腺癌へのLSD1阻害剤の効果の研究に引き続き、臨床でももっとも問題となる去勢抵抗性前立腺癌へのLSD1阻害剤の効果を明らかにした報告であり、LSD1阻害剤およびオートファジー阻害剤の前立腺癌新規治療法としての可能性を大きく推進するものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The CRPC cell lines, 22Rv1, PC3, and PCa1CS, were treated with NCL1, and LSD1 expression and cell viability were assessed. CRPC cells showed strong LSD1 expression, and cell viability was decreased by NCL1 in a dose-dependent manner. In western blotting and flow cytometry, NCL1 also dose-dependently induced caspase-dependent apoptosis. In addition, stimulation of autophagy was observed in NCL1-treated 22Rv1 cells by transmission electron microscopy and LysoTracker analysis. In *ex vivo* analysis, castrated nude mice were injected subcutaneously with PCa1 cells and intraperitoneally with NCL1. Tumor volume was found to be reduced with no adverse effects in NCL1-treated mice compared with controls. Finally, immunohistochemical analysis using consecutive human specimens in pre- and post-androgen deprivation therapy demonstrated that LSD1 expression levels in CRPC were very high, and identical to levels observed in previously examined prostate biopsy specimens.

研究分野：泌尿器癌、エピゲノム、緩和医療、感染症

キーワード：LSD1 エピゲノム 前立腺癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ヒストンタンパク質のエピジェネティックな変化であるメチル化は、前立腺発がんに関与していることが解明され、その酵素の一つである LSD1 の修飾薬の臨床応用が期待されている。しかし前立腺癌において、エピジェネティック修飾を標的とした治療薬は、いまだ臨床応用されていない。

また、細胞生存に関わる防御反応として近年研究が進んでいるオートファジーは腫瘍領域においても注目されており、オートファジーを制御することによる、腫瘍の抑制が試みられている。しかしこれまで、LSD1 阻害剤とオートファジーの関係については報告されていなかった。そこで私たちは、LSD1 阻害剤の臨床応用に向けてオートファジーにも着目し、オートファジー阻害剤であるクロロキン (CQ) を LSD1 阻害剤に併用することで、LSD1 阻害剤の抗腫瘍効果を増強することを世界に先駆けて報告した^[1]。

LSD1 を代表とするヒストン脱メチル化酵素には、多くのアイソザイムが存在するため、これらの酵素の機能解明や医薬品としての開発のためには、高い選択性を有する阻害剤の創製が必要となる。私たちは、世界初となる細胞系でも作用する新たな高選択的 LSD1 阻害剤である NCL1 を創製した^[2]。そして NCL1 の前立腺癌に対する効果を *in vitro* および *in vivo* で検証してきた。

前立腺癌治療の薬剤効果の検証にはモデル動物が必要となる。私たちは、ラットモデルの前立腺癌組織から、ヒトの病態をよく再現する細胞株 PCai1 を樹立し、PCai1 を用いたマウスモデルを確立した。

私たちはこれまで NCL1 およびこれらの細胞株や動物モデルを用いて、去勢感受性前立腺癌への NCL1 の効果およびオートファジー制御との併用効果について世界に先駆けて研究し明らかにした^[1]。

これらの成果を踏まえ本研究では、私たちの樹立した去勢抵抗性前立腺癌動物モデルを用いて、LSD1 やオートファジーを介した去勢抵抗性前立腺癌の増殖メカニズムを検証する。さらに、NCL1 およびさらに新規の高選択的阻害剤である NCD38^[3]を用いた分子標的治療の臨床応用に向けた基礎的研究を行う（図 2）。

【文献】 [1] Etani T. et al. *Oncotarget* 2015 [2] Ueda R. et al. *J Am Chem* 2009

[3] Ogasawara D. et al. *Bioorg Med Chem* 2010

2. 研究の目的

私たちは、これまでの去勢感受性前立腺癌での NCL1 を用いた研究に続き、ヒト去勢抵抗性前立腺癌細胞株 PC3 を用い、*in vitro* で LSD1 阻害剤の効果を検討したところ、NCL1 投与により濃度依存性に増殖抑制効果を認め、NCD38 ではさらに高い効果を示した。そこで今回、私たちが樹立した去勢抵抗性前立腺癌動物モデルを用いて、LSD1 およびオートファジーに着目した去勢抵抗性前立腺癌の増殖・進展のメカニズムの解析を行う。

そのため、本研究は下記の項目から構成した。

- (1) 去勢抵抗性前立腺癌細胞株を用いた LSD1 阻害剤およびオートファジー制御の効果の解析
- (2) LSD1 阻害剤とオートファジー制御の生体内での効果および生体に及ぼす影響の解析
- (3) ヒト検体を用いた LSD1 およびオートファジー関連因子発現と生命予後との関連の解析

3. 研究の方法

本研究では、以下の研究項目を設定した。

- (1) 去勢抵抗性前立腺癌細胞株を用いた LSD1 阻害剤およびオートファジー制御の効果の解析
- (2) LSD1 阻害剤とオートファジー制御の生体内での効果および生体に及ぼす影響の解析
- (3) ヒト検体を用いた LSD1 およびオートファジー関連因子発現と生命予後との関連の解析

上記について、具体的には下記の研究項目で施行した。

研究①：去勢抵抗性前立腺癌細胞株 PC3、22Rv1、および PCai1-CS を用いて、ウェスタンブロットによる LSD1 発現の検討および WST アッセイにより細胞増殖に与える影響を検討した。

研究②：22Rv1 を用いて、クロマチン免疫沈降により、増殖に関与する遺伝子のメチル化状態を検討した。また、PC3、22Rv1、および PCai1-CS を用いて、ウェスタンブロットおよびフローサイトメトリーにより NCL1 の抗腫瘍効果のメカニズムを検討した。

研究③：22Rv1 を用いて、透過型電子顕微鏡、ウェスタンブロット、WST アッセイにより、NCL1 によるオートファジー誘導やクロロキンによるその阻害の及ぼす効果を検討した。

研究④：PCai1 皮下移植モデルを用いて、NCL1 の腫瘍抑制効果および生体に及ぼす影響を検討した。6 週齢ヌードマウスに去勢を行い、背部皮下に PCai1 を移植し、NCL1 の腹腔内投与を施行した。NCL1 1.0mg/kg を週 2 回投与し、5 週間後に sacrifice を行った。

研究⑤：前立腺癌のヒト臨床検体を用いて、前立腺癌における LSD1 の発現プロファイルを免疫染色で検討した。

a) 前立腺針生検の臨床検体を用いて、悪性度の指標である Gleason score 別に LSD1 免疫染色性を定量化し評価した。

b)同一患者においてホルモン治療を施行される前の Castration naïve prostate cancer (CNPC) における LSD1 発現状態と、ホルモン治療に抵抗性になった Castration resistant prostate cancer (CRPC)における LSD1 発現状態を定量化し比較・評価した。

4. 研究成果

研究①: ウェスタンブロットでは LSD1 はすべての前立腺癌細胞株において高い発現を認めた。WST アッセイでは NCL1 は濃度依存的に細胞増殖抑制効果を認めた[図 1]。

研究②: クロマチン免疫沈降では、22Rv1 において NCL1 投与によって CDKN1A のプロモーター領域の H3K4 のメチル化亢進を認めた。ウェスタンブロットでは、22Rv1 において、NCL1 投与により p21 の発現が増加していた。また、22Rv1、PC3、PSai1-CS において、NCL1 の投与により Cleaved caspase 3 の増加を認めた。Cyclin D1、CDK2、CDK4、CyclinB1 の変化は認めなかった。さらにフローサイトメトリーでは、アポトーシスが誘導されていたが、cell cycle arrest は認めなかった。

研究③: 22Rv1 において、NCL1 投与により透過型電子顕微鏡像でオートファゴソームが認められ、ウェスタンブロットではオートファジーのマーカである LC3-II の誘導が認められ、LSD1 阻害剤投与によるオートファジーの誘導が示された。さらに、クロロキンを投与し透過型電子顕微鏡像で確認したところ、オートファゴソーム内の物質の分解が阻害されている様子が観察された。PC3 や PCai1-CS においてもウェスタンブロットで LC3-II の誘導が認められた。また、22Rv1 において、オートファジー阻害物質であるクロロキンと NCL1 の併用により、抗腫瘍効果が増強され、Combination index による検討からは、その抗腫瘍効果は相乗的と考えられた。さらに、フローサイトメトリーにおいても、クロロキンの併用でアポトーシスが增強された。

研究④: NCL1 1.0mg/kg 投与群はコントロール群に比較し有意に腫瘍体積が小さく、CD31 陽性腫瘍血管数の有意な減少と、アポトーシスの誘導を認めた[図 2]。さらに、生体に対する NCL1 による有害事象は認めなかった。

研究⑤:

a) Gleason score が高い前立腺癌検体ほど LSD1 発現が有意に高く、前立腺癌の悪性と LSD1 発現は関連があると考えられた[図 3]。

b) 同一患者においては、ホルモン療法に抵抗性を獲得する前後の LSD1 発現については有意な変化を認めなかった[図 4]。

図1 *in vitro*におけるNCL1の増殖抑制効果

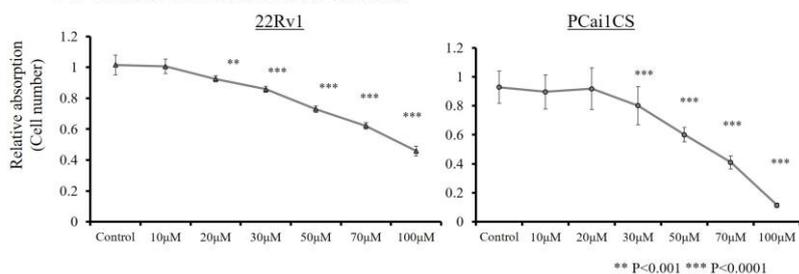


図2 *in vivo*におけるLSD1阻害剤の効果

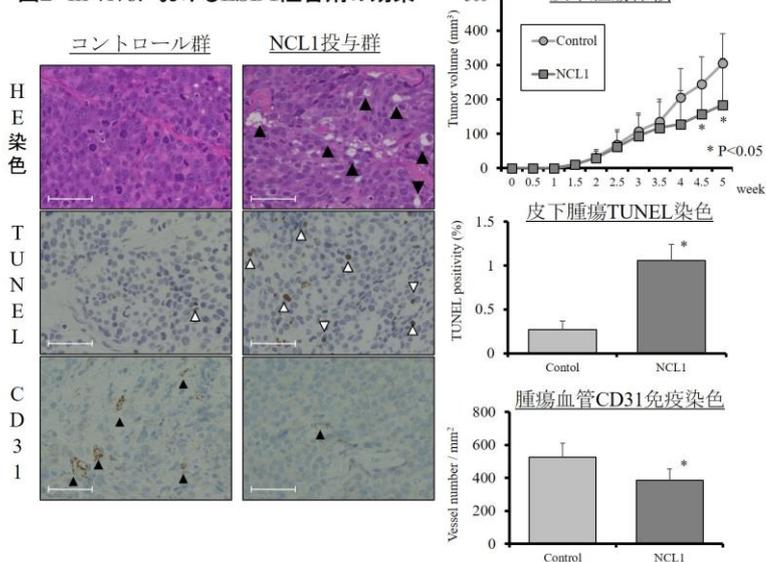


図3 前立腺癌の悪性とLSD1発現

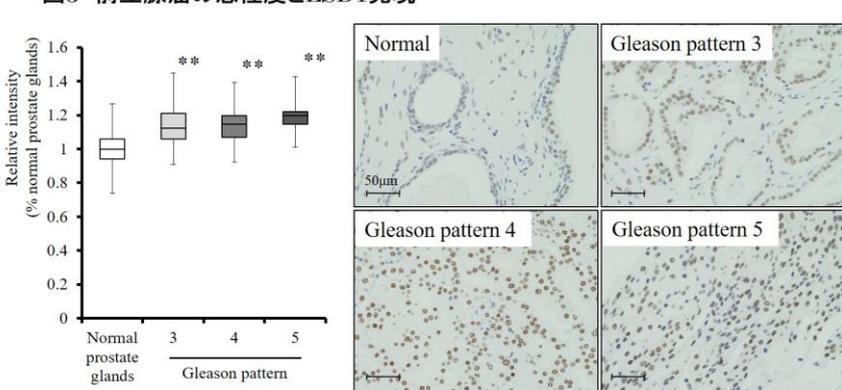
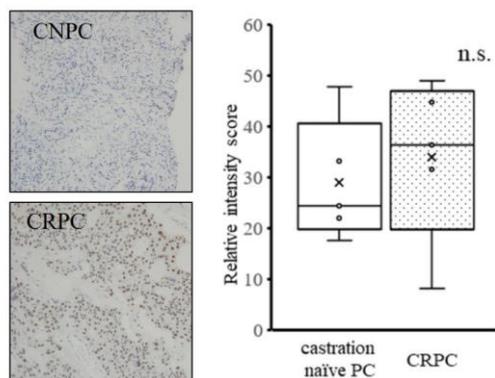


図4 去勢抵抗性の獲得とLSD1発現



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2 件）

1. Etani Toshiki, Naiki Taku, Nagai Takashi, Nozaki Satoshi, Iida Keitaro, Ando Ryosuke, Kawai Noriyasu, Tozawa Keiichi, Suzuki Takayoshi, Yasui Takahiro: NCL1, A Highly Selective Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitor, Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Growth via Regulation of Apoptosis and Autophagy, J Clin Med. 2019, 8, 442; doi:10.3390/jcm8040442.
2. Etani T, Naiki T, Iida K, Ando R, Yasui T et al.: NCL1, a novel selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, suppresses prostate cancer without adverse event. Nagoya Medical Journal. 2017, 55,169-174.

〔学会発表〕（計 6 件）

3. Etani Toshiki, Naiki Taku, Nagai Takashi, Nozaki Satoshi, Iida Keitaro, Ando Ryosuke, Kawai Noriyasu, Tozawa Keiichi, Suzuki Takayoshi, Yasui Takahiro: Novel selective lysine specific demethylase 1 inhibitors effectively impair castration resistant prostate cancer growth. 34th Annual EAU Congress, 2019.3.15-19, Barcelona, Spain
4. （第 11 回ヤングリサーチグラント受賞者記念講演）恵谷 俊紀、内木 拓、内木 綾、飯田 啓太郎、安藤 亮介、河合 憲康、高橋 智、鈴木 孝禎、安井 孝周：エピゲノム変化を介した去勢抵抗性前立腺癌におけるオートファジー制御メカニズムの解明と新規治療法の開発。第 106 回日本泌尿器科学会総会、2018.4.19-22、京都市
5. 恵谷 俊紀、内木 拓、永井 隆、飯田 啓太郎、安藤 亮介、河合 憲康、戸澤 啓一、最上 徹、郡 健二郎、鈴木 孝禎、安井 孝周：去勢抵抗性前立腺癌に対するヒストン脱メチル化酵素阻害剤の治療効果。第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017.4.21-24、鹿児島市
6. Toshiki Etani, Taku Naiki, Keitaro Iida, Ryosuke Ando, Noriyasu Kawai, Keiichi Tozawa, Takayoshi Suzuki, Satoru Takahashi, Takahiro Yasui. Lysine specific demethylase 1 inhibitors and autophagy inhibitor suppresses castration resistant prostate cancer growth. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017.9.28-9.30、横浜市
7. Toshiki Etani, Taku Naiki, Takayoshi Suzuki, Takashi Nagai, Iida Keitaro, Ryosuke Ando, Noriyasu Kawai, Keiichi Tozawa, Tohru Mogami, Kenjiro Kohri, Takahiro Yasui. Novel selective lysine - specific demethylase 1 inhibitors and autophagy inhibitors effectively impair castration - resistant prostate cancer growth. American Urological Association Annual Meeting 2016, 2016.5.6-10, San Diego (USA)
8. 恵谷 俊紀、内木 拓、永井 隆、飯田 啓太郎、安藤 亮介、河合 憲康、戸澤 啓一、最上 徹、郡 健二郎、鈴木 孝禎、安井 孝周：去勢抵抗性前立腺癌に対するヒストン脱メチル化酵素阻害剤の治療効果。第 104 回日本泌尿器科学会総会、2016.4.23-25、仙台市

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：安井 孝周
ローマ字氏名：(YASUI takahiro)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：教授
研究者番号：40326153

研究分担者氏名：河合 憲康
ローマ字氏名：(KAWAI noriyasu)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：准教授
研究者番号：20254279

研究分担者氏名：安藤 亮介
ローマ字氏名：(ANDO ryosuke)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：講師
研究者番号：30381867

研究分担者氏名：内木 拓
ローマ字氏名：(NAIKI taku)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：講師
研究者番号：50551272

研究分担者氏名：内木 綾
ローマ字氏名：(NAIKI aya)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：講師

研究者番号：20509236

研究分担者氏名：飯田 啓太郎

ローマ字氏名：(IIDA keitaro)

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：研究員

研究者番号：30713945

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高橋 智

ローマ字氏名：(TAKAHASHI satoru)

研究協力者氏名：鈴木 孝禎

ローマ字氏名：(SUZUKI takayoshi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。