

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20154

研究課題名(和文)膀胱癌におけるエピゲノムを介した増殖機構の解明と新規阻害剤による治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of epigenome-mediated proliferation mechanism in bladder cancer and development of therapy with novel inhibitors

研究代表者

飯田 啓太郎(Iida, Keitaro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医

研究者番号：30713945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膀胱癌細胞株を用いて新規ヒストン脱メチル化酵素LSD1の新規阻害剤であるNCL1の抗腫瘍効果を検討し、NCL1が効率よく膀胱癌の増殖を抑制し、ヒストンのリジン残基のメチル化を促進することを見い出した。また、NCL1の投与によりオートファジーが誘導され、オートファジー阻害剤の投与によりNCL1の抗腫瘍効果が増強されることが示された。そして、ヒト臨床検体やデータベースをもちいて、LSD1の発現と予後との関連について検討した。そして、膀胱癌皮下移植モデルや、膀胱癌がんモデルの作成を行い、NCL1の投与プロトコールについて検討した。

研究成果の概要(英文)：We investigated therapeutic potential of a novel histone lysine demethylase 1 (LSD1) inhibitor, NCL1, in bladder cancer. Bladder cancer cell lines were treated with NCL1, and LSD1 and cell viability were assessed. Bladder cancer cells showed strong LSD1 expression, and cell viability was decreased by NCL1. In addition, autophagy was induced by NCL1 treatment. Autophagy inhibitor, chloroquine, demonstrated synergic anti-tumor effect with NCL1. In TCGA database, LSD1 RNA expression in bladder cancer was significant higher than that in normal bladder tissues. We suggest that NCL1 and autophagy inhibitor is a potential therapeutic agent for bladder cancer.

研究分野：医学

キーワード：エピジェネティクス ヒストン修飾 LSD1 膀胱癌 オートファジー

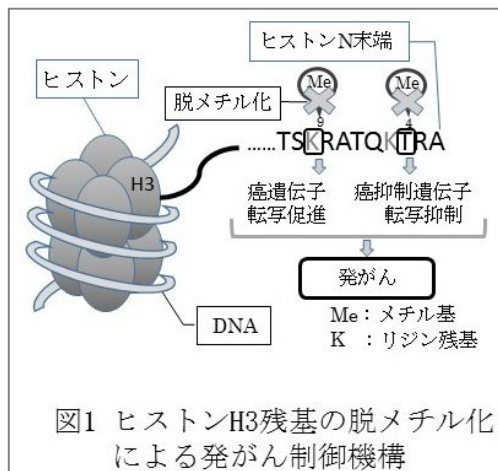
### 1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い膀胱癌死亡者は増加傾向であり、国内では年間約 8000 人が膀胱癌で死亡している。進行性膀胱癌に対しては、シスプラチンを主体とした化学療法が確立されているが、5 年生存率は 13~15% 程度であり極めて予後が悪い。他癌種では多くの新規分子標的薬が登場し生存率が飛躍的に伸びている。これに対し、膀胱癌では新たな薬剤の登場は少なく、生存率は 10 年前とほぼ変わっていない。そのため、進行性膀胱癌に対する新規治療薬の確立は急務である。

ヒトゲノム情報を用いた遺伝子治療の分野は目覚ましい進歩を遂げている。その中で、特定の遺伝子をターゲットとした分子標的治療は、癌に特異的な遺伝子変異を標的にすることが多い。しかし膀胱癌では、高率に変異を有する特定の遺伝子がなく、数多くの遺伝子変異が混在しているため、特定の遺伝子を標的とした治療の確立は困難である。

近年、変異のない遺伝子の発現に異常を認めるエピジェネティックな変化が解明されつつある。その中でも、ヒストンタンパク質のメチル化は、発がん、細胞変性、老化などの病態発現に大きく関与していることから、これらの酵素を阻害する薬剤の臨床応用が望まれている。これらの薬剤は従来の抗がん剤と異なった作用機序であるため、化学療法抵抗性を獲得した癌に対する効果が期待されている。しかし、膀胱癌においてエピジェネティックな遺伝子変化を標的とした治療薬は、まだ臨床応用されていないのが現状である。

ヒストン脱メチル化酵素は、ヒストン N 末端のメチル化リジン残基を脱メチル化する反応を触媒する酵素である。Lysine Specific Demethylase 1(LSD1)(図 1)は、



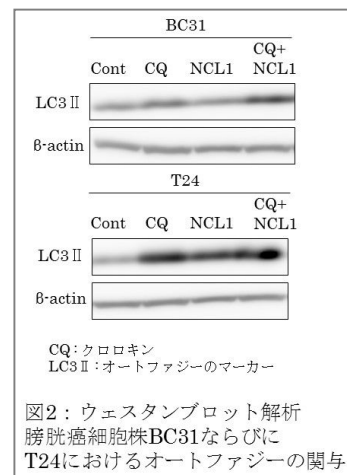
そのヒストン脱メチル化酵素の一種であり、エピジェネティックな遺伝子変化に深く関与している。本学では既存の Lysine Specific Demethylase 1(LSD1)阻害剤と比べて 400 倍以上の受容体選択性をもつ、NCL1 を創製した。私たちは、NCL-1 が去勢抵抗性前立腺癌のモデルラットに対して抗腫瘍効果を発揮することを報告してきた。さらにそのメカニズムとして、G1 期における細胞周期の停止ならびにアポトーシスを引き起こすだけでなく、オートファジーを誘導することを世界で初めて証明した。

私たちは、前立腺癌と同様に膀胱癌細胞株が、オートファジーのマーカーである LC3- を発現しているという結果を得ており(図 2)、NCL1 が膀胱癌の新たな選択肢となりうるのではないかとこの着想に至った。これらの成果を踏まえ本研究では、LSD1 を介した膀胱癌の増殖メカニズムを検証することで、新規治療薬 NCL1 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。

### 2. 研究の目的

肺癌や肉腫に対する LSD1 阻害剤の効果はこれまでに報告されているが、膀胱癌に有効性を示した報告は少ない。私たちは、前立腺癌と同様にラット膀胱癌細胞 BC31、ヒト膀胱癌細胞株 T24 においても LSD1 を発現しているということを確認した。さらに NCL1 にオートファジーの阻害剤であるクロロキンを添加した膀胱癌細胞株は、NCL1 単独のものとは比べて LC3- の発現が高く(図 2)、NCL1 がオートファジーを誘導していることを証明した。

これらの成果を踏まえ本研究では、LSD1 を介した膀胱癌の増殖メカニズムを解明することで、新規治療薬 NCL1 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。



### 3. 研究の方法

本研究では、膀胱癌における LSD1 の癌制御機序を解明し、LSD1 の選択的阻害剤である NCL1 を治療法として確立することを目的としている。*in vivo*での NCL1 の有効性と安全性を検証し、その作用メカニズムの解明を目指す。そのため本研究では、以下の研究内容を予定した。

- (1) 膀胱癌モデルラットにおける LSD1 発現の検証
- (2) 膀胱癌細胞株を用いた NCL1 の細胞増殖抑制効果の検証とメカニズム解析
- (3) NCL1 を用いた LSD1 阻害による制癌作用ならびに生体に及ぼす影響を検証
- (4) ヒト検体を用いた、膀胱癌における LSD1 タンパク発現と生命予後との関連の解析

そして、実際の研究計画においては、下記の流れに沿って実験を進めた。

**研究** : TCGA データベース等を用いた LSD1 発現と膀胱癌の予後等の関連の解析 : TCGA データベースや Protein Atlas などの既存のデータベースを用い、LSD1 の RNA 発現や蛋白発現、また予後との関連について検討した。

**研究** : 当科での膀胱癌臨床検体を用いた LSD1 と関連因子の解析 : 当科における膀胱癌 169 例の臨床検体について、LSD1 を免疫染色し、予後などのパラメータとの関連を検討した。

**研究** : 膀胱癌細胞株を用いた LSD1 阻害剤とオートファジー阻害剤の細胞増殖抑制効果の検証とメカニズム解析 : 膀胱癌細胞株を用いて、NCL1 を投与し、細胞増殖抑制効果やその効果のメカニズムを WST-8 アッセイやウェスタンブロットで検討した。また、オートファジー阻害剤クロロキン (CQ) との併用による細胞増殖抑制効果についても検討した。

**研究** : 膀胱癌モデルラットおよび膀胱癌モデルマウスにおける検討 : 膀胱癌皮下移植モデルマウスの作成を T24 や BC31 の細胞株を用いて行った。また、これらのマウスに NCL1 を投与し、有害事象の有無を検索し、適正な投与量の設定を試みた。また、ラットやマウスに BBN ( N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine ) を自由飲水投与し、膀胱癌や異形成の発生について検討した。

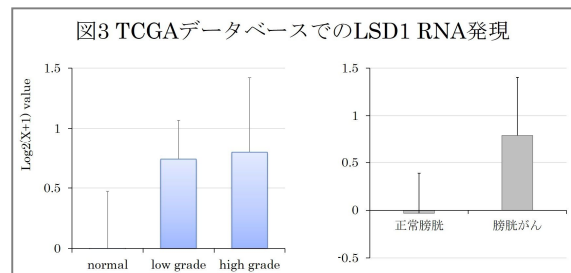
#### 4 . 研究成果

**研究** : TCGA データベースを用いて検討したところ、LSD1 の RNA 発現は、正常膀胱組織に比べて膀胱がん組織においてより高度であった。また、膀胱癌を low grade と high grade に分けて検討したところ、正常膀胱組織、low

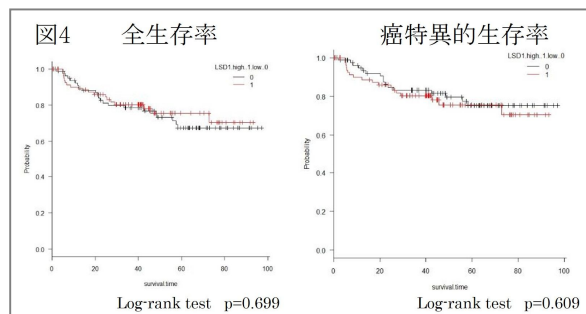
grade 尿路上皮癌、high grade 尿路上皮癌、の順に LSD1 発現が高くなっていった ( 図 3 )。引き続きこれらの結果より、LSD1 発現が高度であることが OS ( 全生存率 ) や PFS ( 無再発生存率 ) を低下させると考え解析を行ったが、これを示唆する結果は得られなかった。

上記の結果は蛋白発現を検討する Protein Atlas でも同様であった。

**研究** : 当科において経尿道的膀胱腫瘍切除術を施行した 169 例の臨床検体について LSD1

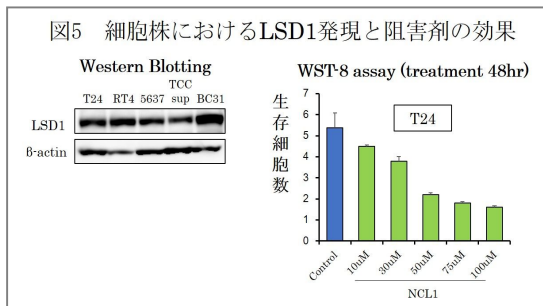


を免疫染色し、定量用にキーエンス社顕微鏡システムをもちいて定量し、OS ( 全生存率 ) や癌特異的生存率、PFS ( 無再発生存率 ) などの予後パラメータとの関連を検討したが、LSD1 発現との明らかな関連は認めなかった ( 図 4 )。

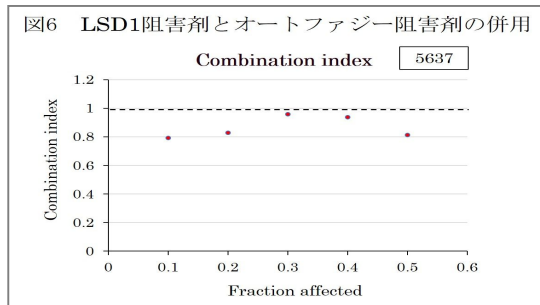


**研究** : T24、RT4、5637、TCC sup、BC31 の膀胱癌細胞株を用いて LSD1 発現を検討したところ、いずれの細胞株にも LSD1 の発現が確認された ( 図 5 左 )。また、NCL1 をこれらの細胞株に投与したところ、濃度依存的な細胞増殖抑制効果を確認した ( 図 5 右 )。さらに、LSD1 阻害剤とオートファジー阻害剤クロロキン (CQ) の併用効果を Combination index 法で検討したところ、相乗的な抗腫瘍効果を確認した ( 図 6 )。

また、ウェスタンブロットで LSD1 のターゲットとなる H3K4 および H3K9 のメチル化状態の変化を検討したところ、NCL1 の投与により H3K4me2 および H3K9me2 の発現が増加していた。



研究 : 膀胱癌皮下移植モデルとしては、BC31 皮下移植が安定的に腫瘍の生着および



増殖を得られることを見出した。また、このモデルに対して NCL1 を投与したところ、今回投与した範囲内では明らかな有害事象を認めなかった。BBN 投与モデルマウスにおいては、高率に過形成を誘導することができたものの、膀胱癌の発生数は少ない結果であった。そのため、現在、BBN 投与期間を延長したプロトコルでラットに対する実験を施行中である。

今後は、in vitro での LSD1 のメカニズムに関する解析をフローサイトメトリー、RT-PCR、ChIP アッセイ、マイクロアレイ解析透過型電子顕微鏡などを用いてさらに進めていく。そして、その結果を臨床検体の解析に還元し、検討を進める。LSD1 は前立腺癌においてアンドロゲン受容体と関係が深い酵素であるが、近年、膀胱癌においてもアンドロゲン受容体との関連が報告されている [Izumi K et al, Oncotarget 2016]。当教室においては前立腺癌と LSD1 の関連についても研究を施行中であり、緊密な連携をとって研究を進めていく。そして、膀胱癌皮下移植モデルや、BBN 投与膀胱癌モデルについても投与実験を意欲的に推進していく予定である。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

1. Naiki Taku, Etani Toshiki, Naiki-Ito Aya, Fujii Kana, Ando Ryosuke, Iida Keitaro, Nagai Takashi, Sugiyama Yosuke, Nakagawa Motoo, Kawai Noriyasu, Yasui Takahiro: Metastatic

urothelial carcinoma with glandular differentiation that confirmed the response by autopsy specimen to second-line mFOLFOX6 (Fluorouracil, Oxaliplatin, and Leucovorin) plus bevacizumab chemotherapy. Case Reports in Oncology, 10:1057-1064, 2017(doi: 10.1159/000484597)

2. Nozaki Satoshi, Naiki Taku, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Iida Keitaro, Kawai Noriyasu, Mizuno Kentaro, Okada Atsushi, Umemoto Yukihiro, Yasui Takahiro: A case of delayed radiation myelopathy of the thoracic vertebrae following low dose radiation therapy for metastatic renal cell carcinoma. Urology Case Reports, 11:66-68, 2017(doi: 10.1016/j.eucr.2017.01.005.)
3. Sugiyama Yosuke, Naiki Taku, Kondo Masahiko, Iida Keitaro, Kondo Yuki, Tasaki Yoshihiko, Kataoka Tomoya, Hotta Asami, Yasui Takahiro, Kimura Kazunori: Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone caused by carboplatin after switching from cisplatin in a metastatic urethral cancer patient. Urology Case Reports, 12:17-19, 2017
4. Etani Toshiki, Naiki Taku, Nagai Takashi, Iida Keitaro, Ando Ryosuke, Naiki-Ito Aya, Kawai Noriyasu, Tozawa Keiichi, Mizuno Kentaro, Okada Atsushi, Mogami Tohru, Yasui Takahiro: Inflammatory myofibroblastic tumor of the urinary bladder: a case report. Case Reports in Oncology, 9(2):464-469, 2016 (doi: 10.1159/000448550)
5. Nagai Takashi, Naiki Taku, Kawai Noriyasu, Iida Keitaro, Etani Toshiki, Ando Ryosuke, Hamamoto Shuzo, Sugiyama Yosuke, Okada Atsushi, Mizuno Kentaro, Umemoto Yukihiro, Yasui Takahiro: Pure lymphoepithelioma-like carcinoma originating from the urinary bladder. Case Reports in Oncology, 9: 188-194, 2016(doi: 10.1159/000445049)
6. Iida Keitaro, Naiki Taku, Kawai Noriyasu, Etani Toshiki, Ando Ryosuke, Ikegami Yosuke, Okamura Takehiko, Kubota Hiroki, Okada Atsushi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Bacillus Calmette-Guerin

therapy after the second transurethral resection significantly decreases recurrence in patients with new onset high-grade T1 bladder cancer. BMC Urology, 16:8, 2016 (doi: 10.1186/s12894-016-0126-x)

〔学会発表〕(計 7件)

1. 飯田 啓太郎: 2ndTUR 時代における BCG failure 症例に関する後方視的解析。第 55 回日本癌治療学会学術集会、2017.10.20-22、横浜市
2. 飯田 啓太郎: 2ndTUR 時代における BCG failure 症例の検討。第 275 回日本泌尿器科学会東海地方会、2017.6.10、名古屋市
3. 飯田 啓太郎: 膀胱癌における MRI 拡散係数と予後の臨床的検討。第 66 回日本泌尿器科学会中部総会、2016.10.27-30、四日市市
4. 飯田 啓太郎: 膀胱癌における MRI の拡散係数と予後の臨床的検討。第 54 回日本癌治療学会学術集会、2016.10.20-22、横浜市
5. 飯田 啓太郎: 陰茎海面体膿瘍を初期症状とした陰茎潰瘍性膿皮症の 1 例。第 33 回稲田賞表彰式および受賞講演会、2016.7.30、京都市
6. 飯田 啓太郎: 膀胱癌における MRI の拡散係数と予後の臨床的検討。第 104 回日本泌尿器科学会総会、2016.4.23-25、仙台市
7. 飯田 啓太郎: 4 次救済化学療法として Gemcitabine + Oxaliplatin が奏功した難治性精巣腫瘍の 1 例。第 271 回日本泌尿器科学会東海地方会、2016.3.19、名古屋市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

飯田 啓太郎 (Iida Keitaro)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医

研究者番号: 30713945

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

### (4)研究協力者

安井 孝周 (Yasui Takahiro)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 40326153

鈴木 孝禎 (Suzuki Takayoshi)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 90372838

河合 憲康 (Kawai Noriyasu)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 20254279

安藤 亮介 (Ando Ryosuke)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 30381867

内木 拓 (Naiki Taku)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 50551272

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