

令和 2 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：2017～2019

課題番号：17K11152

研究課題名(和文) 精巣腫瘍のLSD1による増殖機構解明とその阻害剤による治療法開発のための基礎研究

研究課題名(英文) Basic research for elucidation of growth mechanism of testicular tumor by LSD1 and development of therapeutic method by its inhibitor

研究代表者

秋田 英俊 (Akita, Hidetoshi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：10381782

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)：ヒストン脱メチル化酵素Lysine Specific Demethylase 1 (LSD1)は精巣腫瘍における治療標的として注目されている。本学で創製した新規LSD1阻害剤であるNCL1およびNCD38の精巣悪性腫瘍への治療効果について検討した。WST-8アッセイでは、LSD1阻害剤は濃度依存的に生存細胞数を抑制し、アポトーシスを誘導した。マウスモデルにおける検討では、コントロール群に比較し、LSD1阻害剤投与群では腫瘍体積の増加が抑制されていた。血清AFPは、LSD1阻害剤投与群において低かった。上記より、NCL1およびNCD38は精巣腫瘍において、新規治療薬となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精巣腫瘍は化学療法で根治が期待できる腫瘍である。しかし、初回治療に抵抗性となると有効な治療法が少ない。さらに、悪性度の高い非セミノーマは若年者に多く、新規治療法の確立が求められている。ヒストン脱メチル化酵素LSD1は精巣腫瘍におけるエピジェネティックな増殖メカニズムで重要であり、治療標的として注目されている。今回私たちは、LSD1の新規阻害剤であるNCL1およびNCD38は精巣腫瘍において、新規治療薬となる可能性を示唆する基礎的な研究結果を得た。本研究は、精巣腫瘍に対してこれまでの治療法とは全く異なるエピゲノム治療の可能性を示した点で、学術的および社会的に意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：LSD1, the first histone demethylase to be discovered, is a novel target in prostate cancer therapy. NCL1 and NCD38, novel selective cell-active inhibitors of LSD1, were discovered at our university. We analyzed the efficacy of LSD1 inhibitors in germ cell tumors. The WST assay revealed a reduction in the number of viable cells in a dose-dependent manner after NCL1 or NCD38 treatment. In western blotting, NCL1 or NCD38 treatment induced caspase-dependent apoptosis, while Oct4 and SOX2 expression was decreased. In flow cytometry analysis, NCL1 or NCD38 significantly induced apoptosis in a dose-dependent manner. Subcutaneous tumor volumes and serum AFP levels were significantly lower in mice treated with NCL1 or NCD38 than in controls. TUNEL analysis showed that NCL1 and NCD38 treatment induced apoptosis in NTERA2 subcutaneous tumors. Tissue array analysis showed that LSD1 expression in human seminoma specimens was significantly higher than that in noncancerous specimens.

研究分野：腫瘍学

キーワード：LSD1 エピゲノム メチル化 阻害剤 精巣腫瘍

1. 研究開始当初の背景

本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

転移性・再発性精巣腫瘍に対しては、シスプラチンを主体とした化学療法である BEP 療法の有用性が確立されている。しかし BEP 療法に抵抗性となると難治性となり、治癒を得ることが困難である。近年、他癌種では多くの分子標的薬などの新規薬剤が登場し生存率が飛躍的に伸びている。これに対し、精巣腫瘍においては化学療法以外の新たな薬剤は確立されていない。

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。しかし精巣腫瘍では、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。

そこで、エピジェネティックな変化に着目した新規治療標的の探索が近年注目されている。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。これらの薬剤は抗がん剤と異なった作用機序であり、化学療法抵抗性の腫瘍に対する効果が期待されている。しかし、精巣腫瘍においてエピジェネティック治療薬は、臨床応用されていない。

応募者のこれまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

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。LSD1 は、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。私たちはこれまで前立腺癌に対して LSD1 阻害剤の効果を検討し、LSD1 阻害剤が副作用なく前立腺癌の増殖を効果的に抑制することを報告してきた[1]。LSD1 阻害剤は前立腺癌に対して細胞周期停止とアポトーシスの誘導により抗腫瘍効果を発揮していることを見出した。また、精巣腫瘍における研究では、精巣腫瘍細胞が LSD1 を高発現していることを見出し(図 1)、LSD1 阻害剤が精巣腫瘍の新たな治療法となりうるとの着想に至った。

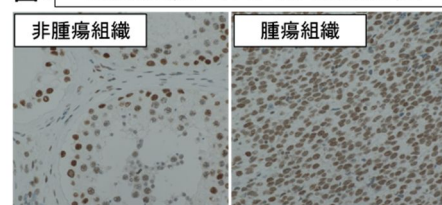
しかし、既存の LSD1 阻害剤は受容体選択性が低いため、効果が低かった。そこで本学では既存の LSD1 阻害剤の 400 倍以上の選択性をもつ、NCL1 および NCD38 を創薬した[2] [3]。前立腺癌におけるこれまでの研究で、これらの薬剤は既存の LSD1 阻害剤より低い濃度で強い抗腫瘍効果を示し、全身投与により腫瘍に効果的に作用することを見出した。

これらの成果を踏まえ本研究では、LSD1 を介した精巣腫瘍の増殖メカニズムを解明すること、および新規 LSD1 阻害剤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。

【参考文献】

- [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

図1 精巣腫瘍におけるLSD1発現



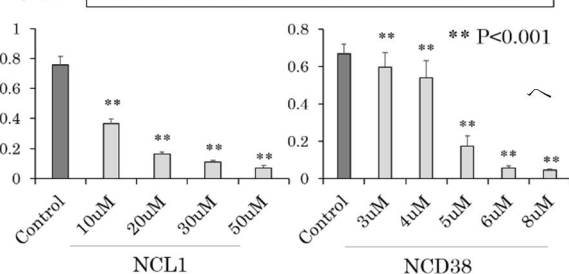
腫瘍におけるLSD1の高発現を見出した

2. 研究の目的

近年、ヒストン脱メチル化酵素 Lysine Specific Demethylase 1(LSD1)が、腫瘍組織において発現が高いことが報告された。私たちは、エピジェネティック修飾薬として高選択的に作用する LSD1 阻害剤である NCL1 と NCD38 を世界で初めて創薬し、これらの薬剤の前立腺癌への効果について報告してきた。これらの薬剤は前立腺癌の増殖を効果的に抑制し、しかも生体への副作用は認めなかった。さらに、これらの薬剤が、精巣腫瘍細胞株の増殖を効率よく抑制することに着目した。

前立腺癌や乳癌に対する選択的 LSD1 阻害剤の効果はすでに報告されているが、精巣腫瘍の報告はない。また、LSD1 が精巣腫瘍の増殖にどのようなメカニズムで関与しているかは解明されていない。私たちは in vitro で精巣腫瘍細胞株に対する 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(図 2)。そこで本研究では、LSD1 に着目した精巣腫瘍の増殖・進展・転移のメカニズムの解析を行い、新たな分子標的治療法開発への足掛かりとする。

図2 精巣腫瘍細胞へのLSD1阻害剤の効果



精巣腫瘍への増殖抑制効果を見出した
(論文作成中)

3. 研究の方法

a) LSD1 阻害剤投与による増殖抑制効果の検討

ヒト由来精巣腫瘍細胞株 NTERA2、ヒト由来精巣腫瘍細胞株 Tera-1 を用いて、LSD1 阻害剤投与に伴う生存細胞数の変化について WST-8 アッセイで検討した。アポトーシス関連タンパク、細胞周期関連タンパク、幹細胞機能関連タンパクについて検討した。

b) LSD1 阻害剤投与によるタンパク発現変化の検討

NTERA2、Tera-1 を用いて、LSD1 阻害剤投与に伴うタンパクの発現変化についてウェスタンブロット法で検討した。アポトーシス関連タンパク、細胞周期関連タンパク、幹細胞機能関連タンパクについて検討した。

c) アポトーシスや細胞周期に与える影響の検討

NTERA2 に対して LSD1 阻害剤を投与し、GUAVA® assay system を用いてフローサイトメトリーを施行し、アポトーシスや細胞周期について検討した。

d) 動物モデルにおける抗腫瘍効果の検討

6 週齢の Balb/c nu/nu ノードマウスに NTERA2 細胞を皮下移植もしくは同所移植し、皮下移植モデルおよび同所移植モデルを作成した。移植の 5 日後より NCL1 1.0 mg/kg もしくは NCD38 1.0mg/kg を週 2 回腹腔内投与し、5 週間投与後にサクリファイスを行い評価した。

評価項目は、腫瘍体積、体重、相対臓器重量、血液生化学検査、腫瘍マーカー、腫瘍の TUNEL 染色、腫瘍の免疫染色である。

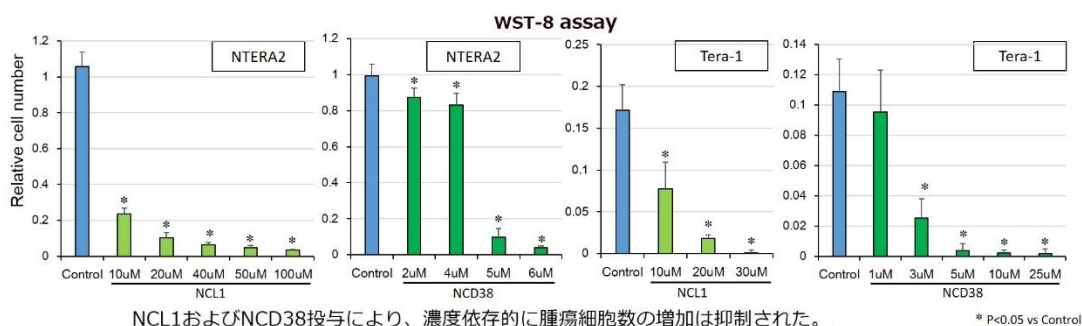
e) 臨床検体における LSD1 発現状態の検討

本学で 2004 年から 2015 年に精巣腫瘍に対して高位精巣摘除術を施行した臨床検体を用いて、LSD1 の発現について免疫染色で検討した。セミノーマ患者のセミノーマ組織および正常組織の LSD1 発現につき免疫染色を行い、BZ-9000 多機能顕微鏡を用いて写真を撮影した。同多機能顕微鏡および分析ソフトウェアを用いて定量化し、比較した。

4. 研究成果

a) LSD1 阻害剤投与による増殖抑制効果の検討

NTERA2 細胞、Tera-1 細胞とも、NCL1 および NCD38 の投与により、濃度依存的に生存細胞数が減少した。



NCL1およびNCD38投与により、濃度依存的に腫瘍細胞数の増加は抑制された。

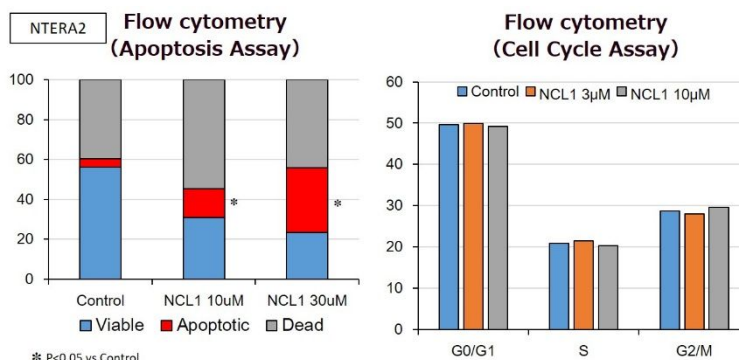
* P<0.05 vs Control

b) LSD1 阻害剤投与によるタンパク発現変化の検討

NTERA2 細胞、Tera-1 細胞とも、LSD1 の発現を認めた。NTERA2 細胞においては、NCD38 の投与により、OCT3/4、SOX2 の発現低下、および cleaved caspase 3 の発現増加を認めた。Tera-1 細胞においては、SOX2 の発現低下、および cleaved caspase 3 の発現増加を認めた。いずれの細胞においても、Cyclin B1、Cyclin D1、CDK2、CDK4、CDK6、p21、p27 等の細胞周期関連タンパクの発現変化は認めなかった。

c) アポトーシスや細胞周期に与える影響の検討

NTERA2 細胞において、NCL1 の投与により、アポトーシスの誘導を認めた。一方、細胞周期への影響は認めなかった。



* P<0.05 vs Control

LSD1阻害剤はアポトーシスを誘導したが、細胞周期への影響は認めなかった。

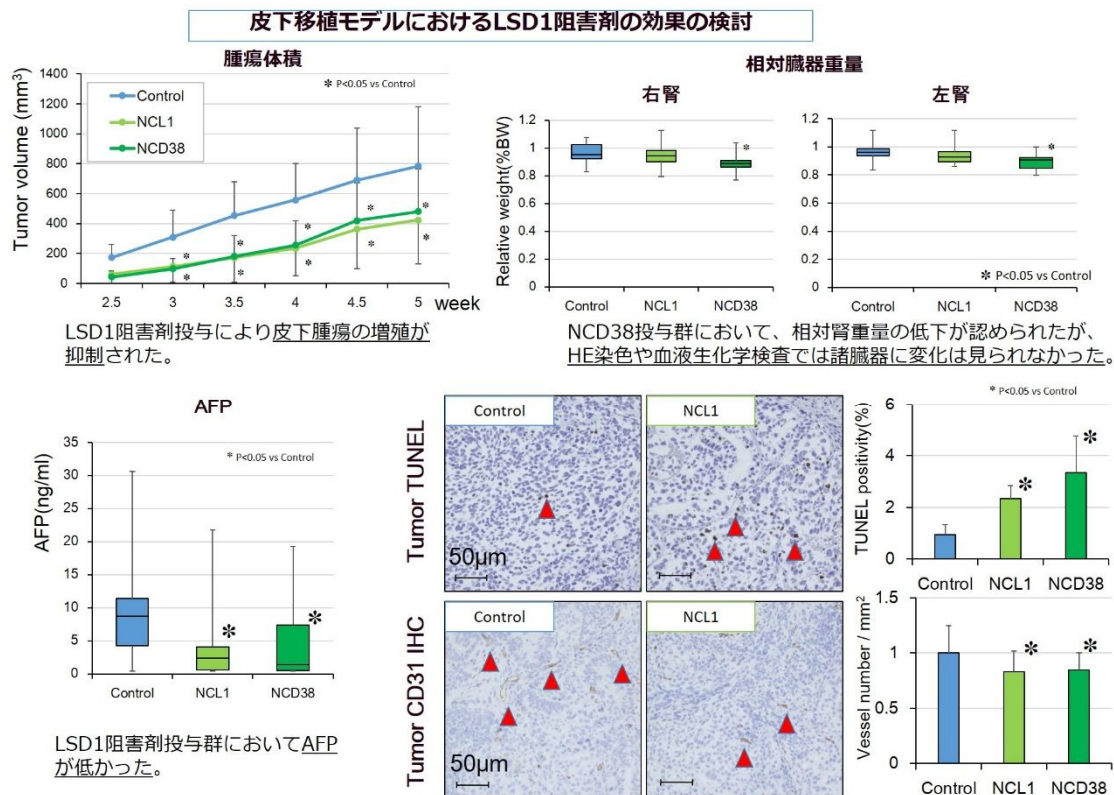
d) 動物モデルにおける抗腫瘍効果の検討

・皮下移植モデル

LSD1 阻害剤の投与により、コントロール群に比較し、皮下腫瘍体積の増加が抑制された。また、腫瘍マーカーとして測定した血清 AFP 値は、コントロール群に比較し、LSD1 阻害剤投与群で低くなっていた。

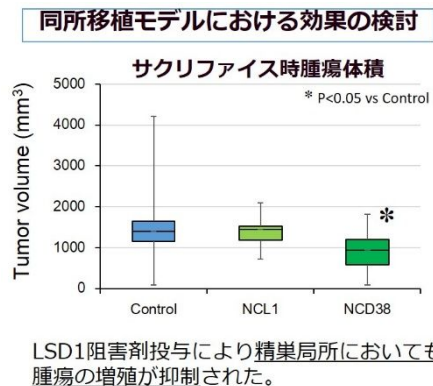
TUNEL 染色および CD31 免疫染色により LSD1 阻害剤の効果のメカニズムについて検討したところ、コントロール群に比較し、LSD1 阻害剤投与群では TUNEL 染色陽性細胞の増加および CD31 免疫染色で同定された腫瘍血管の減少が認められ、LSD1 阻害剤の効果のメカニズムにはアポトーシスの誘導と血管新生阻害が関与していることが示唆された。

LSD1 投与による有害事象について、血液生化学検査、相対臓器重量、体重、諸臓器の HE 染色にて評価した。血液生化学検査については、BUN、クレアチニン、電解質を含めてコントロール群と LSD1 阻害剤投与群には差は見られなかった。LSD1 阻害剤投与による体重の減少は認めなかった。NCD38 投与群において、相対腎重量の低下が認められたが、HE 染色では腎に明らかな変化は見られなかった。腎以外の相対臓器重量や HE 染色の結果は、コントロール群と LSD1 阻害剤投与群で差は認めなかった。



・同所移植モデル

LSD1 阻害剤の投与により、精巣局所においてもコントロール群に比較し腫瘍体積の増加が抑制された。LSD1 阻害剤投与によるリンパ節等への転移抑制効果については明らかではなかった。

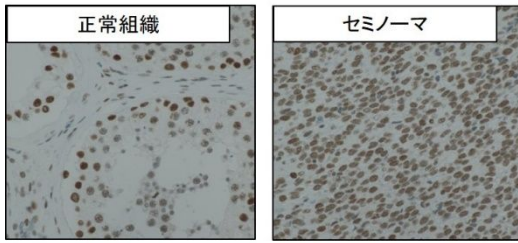


e) 臨床検体における LSD1 発現状態の検討

LSD1 発現は、正常組織に比較し、セミノーマ組織で高くなっており、LSD1 の治療標的としての可能性が示唆された。

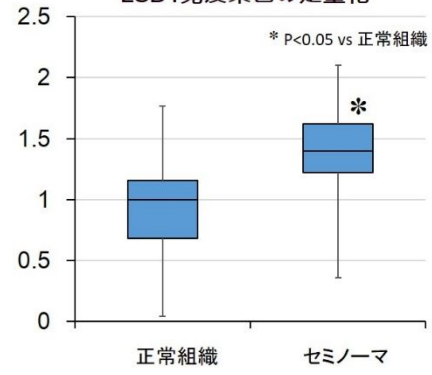
ヒト臨床検体における評価

LSD1 免疫染色



LSD1発現は、正常組織に比較し、セミノーマ組織で高かった。

LSD1免疫染色の定量化



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Etani Toshiki, Naiki Taku, Naiki-Ito Aya, Suzuki Takayoshi, Iida Keitaro, Nozaki Satoshi, Kato Hiroyuki, Nagayasu Yuko, Suzuki Shugo, Kawai Noriyasu, Yasui Takahiro, Takahashi Satoru	4. 巻 8
2. 論文標題 NCL1, A Highly Selective Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitor, Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Growth via Regulation of Apoptosis and Autophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 442 ~ 442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8040442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Etani T, Naiki T, Iida K, Ando R, Kawai N, Tozawa K, Suzuki T, Takahashi S, Yasui T	4. 巻 55
2. 論文標題 NCL1, a novel selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, suppresses prostate cancer without adverse event	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nagoya Medical Journal	6. 最初と最後の頁 169-174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 恵谷 俊紀、内木 拓、永井 隆、田中 勇太郎、飯田 啓太郎、安藤 亮介、河合 憲康、戸澤 啓一、鈴木 孝禎、安井 孝周
2. 発表標題 精巣悪性腫瘍に対するヒストン脱メチル化酵素阻害剤の治療効果
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Etani Toshiki, Naiki Taku, Nagai Takashi, Iida Keitaro, Ando Ryosuke, Kawai Noriyasu, Takahashi Satoru, Suzuki Takayoshi, Yasui Takahiro
2. 発表標題 A selective lysine-specific demethylase1 inhibitor suppresses germ cell tumor proliferation.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Etani Toshiki, Naiki Taku, Nozaki Satoshi, Nagai Takashi, Iida Keitaro, Ando Ryosuke, Kawai Noriyasu, Takahashi Satoru, Suzuki Takayoshi, Yasui Takahiro
2. 発表標題 A selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor suppresses testicular tumor proliferation.
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiki Etani, Taku Naiki, Satoshi Nozaki, Takashi Nagai, Keitaro Iida, Ryosuke Ando, Noriyau Kawai, Satoru Takahashi, Takayoshi Suzuki, Takahiro Yasui
2. 発表標題 Novel selective lysine-specific demethylase 1 inhibitors suppress testicular tumor cell proliferation
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安井 孝周 (Yasui Takahiro) (40326153)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	河合 憲康 (Kawai Noriyasu) (20254279)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究分担者	安藤 亮介 (Ando Ryosuke) (30381867)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	内木 拓 (Naiki Taku) (50551272)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	
研究分担者	飯田 啓太郎 (Iida Keitaro) (30713945)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・臨床研究医 (23903)	
研究分担者	恵谷 俊紀 (Etani Toshiki) (30600754)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	
研究分担者	内木 綾 (Naiki Aya) (20509236)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	