

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460805

研究課題名(和文) 食品成分を用いたヒストンのメチル化抑制による新規がん予防法の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular-targeting cancer prevention with histone methylation inhibitory dietary compound

研究代表者

曾和 義広 (Sowa, Yoshihiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70315935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンメチル化酵素EZH2に対する阻害剤により増殖抑制されるヒト肺がん細胞株A549細胞を用い、その増殖抑制を示す化合物の探索を一次スクリーニングとし、1,223化合物に対してその増殖抑制効果を評価した。その結果、80%以上の増殖抑制能を示す化合物は58化合物であった。この58化合物の中から、既に細胞傷害性とその作用機構、あるいは既にエピジェネティクスな作用が報告されている化合物を省いたところ、20化合物が残った。次に、これらの化合物の中からヒストンH3 K27に対するヒストンメチル化抑制能を、ELISA法を用いて評価したところ、3化合物がヒストンメチル化抑制能を示した。

研究成果の概要(英文)：Using human lung cancer A549 cells that is reported to be sensitive to an inhibitor against histone methyltransferase EZH2, we searched for compounds that inhibit proliferation as the primary screen, and evaluated its growth inhibitory effect of 1,223 compounds. As a result, 58 compounds showed a growth inhibitory ability of 80% or more. Of the 58 compounds, 20 compounds have remained when the compounds having cytotoxicity, their clarified mechanisms of action, or epigenetic effects already reported have been omitted. Next, among the 20 compounds, histone methylation inhibitory ability against histone H3 K27 was evaluated by ELISA method, and three compounds showed histone methylation inhibitory ability.

研究分野：分子標的予防医学

キーワード：エピジェネティクス ヒストンメチル化 EZH2 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

発がんにおけるがん抑制遺伝子の発現抑制は、多くのがんにおいて認められる現象であり、中でもがん抑制遺伝子の p16 遺伝子の発現抑制はその代表的な例である。

この p16 の発現抑制は、DNA のメチル化だけでなく、ヒストンのメチル化が原因であることが報告されている (H3K27 trimethylation is an early epigenetic event of p16INK4a silencing for regaining tumorigenesis in fusion reprogrammed hepatoma cells. *J Biol Chem*, 2010, 285:18828)。

そして実際、ヒストンのメチル化が発がんの原因となることが、次々と明らかとなってきた (Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet*. 2008, 40:741, Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nat Genet*. 2009, 41:521)。

また、そのヒストンのメチル化は、ヒストンメチル化酵素 EZH2 とヒストン脱メチル化酵素 UTX のバランスにより制御されており、EZH2 が強く働くなど、そのバランスが崩れることで、ヒストンのメチル化が生じ、その結果、がん抑制遺伝子 p16 の発現が抑制され、発がんに至る (*J Biol Chem*. 2010, 285:18828)。

2. 研究の目的

そこで、上述のようにヒストンのメチル化制御分子 (EZH2、UTX) のバランスが崩れることで、ヒストンのメチル化が起こり、その結果、p16 を抑制し、発がんに至ることから、逆に、がん予防食品成分でそのバランスを回復させることが出来れば、ヒストンのメチル化を抑制し、その結果、p16 を上昇させることで、発がん予防に寄与できると着想した。

3. 研究の方法

SWI/SNF 複合体を形成する分子である SMARCB1/SNF5/INI1 が欠失すると、SWI/SNF 複合体の機能が損なわれ、その結果、SWI/SNF 複合体と拮抗して機能する PRC2 複合体 (EZH2 は PRC2 複合体を形成する分子) の働きが優位になり、EZH2 によるヒストン H3 K27 のメチル化が亢進し、その結果、p16 mRNA の発現が抑制されることが、ヒトウィルムス腫瘍細胞株 G401 細胞で報告されている (Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012, 109:21360)。従って、この G401 細胞を用い、その p16 mRNA の発現誘導を指標とした cell-based スクリーニングを実施していた。

しかしながら、実際にライブラリー化合物

を用いてスクリーニングを開始してみたところ、mRNA 発現測定のための TaqMan RT-PCR に供するサンプル調製の煩雑さや G401 細胞の取扱い難さのために、迅速なスクリーニングを実施することが困難であることが判明した。

そのスクリーニング期間中に、SMARCB1/SNF5/INI1 と同様に SWI/SNF 複合体を形成する分子である SMARCA4/BRG1 に変異を有するヒト肺がん細胞株 A549 も、EZH2 阻害剤により増殖抑制されることが報告された (SWI/SNF-mutant cancers depend on catalytic and non-catalytic activity of EZH2. *Nat Med*. 2015, 21:1491)。

そこで、A549 細胞を用い、まず増殖抑制を示す化合物の探索を一次スクリーニングとすることにした。

またスクリーニングに供する化合物ライブラリーとしては、食品関連化合物ライブラリー、天然生理活性物質ライブラリー、ガン抑制化合物ライブラリー、インヒビターライブラリー、エピジェネティクス関連化合物ライブラリーを用いた。

4. 研究成果

SMARCA4/BRG1 に変異を有することで EZH2 阻害剤により増殖抑制される A549 細胞を用い、まず増殖抑制を示す化合物の探索を一次スクリーニングとし、上記の化合物ライブラリーより 1,223 化合物に対してその評価を行った。陽性対照としては、EZH2 阻害剤 GSK126 を用い、被験化合物の濃度は 20 μ M、薬剤処理期間は 7 日間とした。

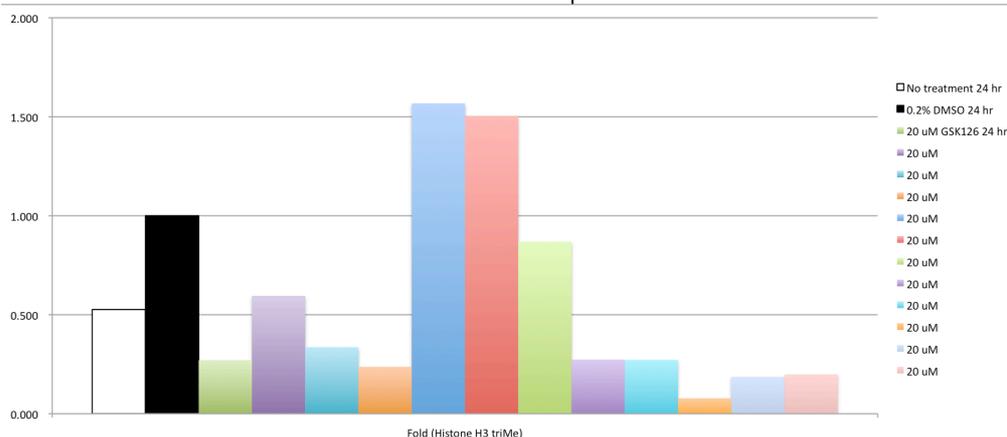
その結果、上記の処理条件において、再現性をもって 80% 以上の増殖抑制能を示す化合物は 58 化合物であった。

これらの A549 細胞に増殖抑制能を示した 58 化合物に対して文献的調査等を実施し、既がん細胞に対する細胞傷害性とその作用機構が報告されている化合物、あるいは既にヒストン脱アセチル化阻害能等のエピジェネティクスな作用が報告されている化合物を省いたところ、20 化合物が残った。更に、これら 20 化合物の中より、以降の検討に用いるのに十分量が入手できる化合物として 11 化合物を選んだ。

次に、これらの 11 化合物の中から EZH2 によりメチル化が生じるヒストン H3 K27 において、被験化合物によりその亢進したメチル化が抑制されるか否か、すなわち被験化合物がヒストン脱メチル化能を有するか否かを、トリメチル化ヒストン H3 K27 に対する抗体を使用する ELISA 法を用いて評価を行った。陽性対照としては、EZH2 阻害剤 GSK126 を用い、被験化合物の濃度は 20 μ M、薬剤処理期間は 24 時間とし、陽性対照である EZH2 阻害剤 GSK126 より強くヒストン H3 K27 のトリメチル

ル化を抑制した化合物をヒット化合物とした。
その結果、再現性を持って 3 化合物にヒストン脱メチル化能があることが確認された(図 1)。

図 1 : A549 細胞におけるトリメチル化ヒストン H3 K27 に対する抗体を用いた ELISA による 11 被験化合物のヒストン脱メチル化能の評価 (被験化合物名は公表を控える)



この結果、ヒストン H3 K27 のトリメチル化を抑制した 3 化合物について、文献調査の結果を実施したが、いずれ化合物ともヒストン脱メチル化能は報告されておらず、新規のヒストン脱メチル化能を有する化合物であることが明らかとなった。

現在、これら化合物に対して、その細胞増殖抑制能やヒストン脱メチル化能に関する用量依存性や、あるいは、A549 細胞以外の EZH2 阻害剤感受性細胞での検討を実施中である。

また、前述の G401 細胞では、EZH2 阻害時に p16 遺伝子が誘導されることが報告されていたが (Proc Natl Acad Sci USA. 2012, 109:21360)、A549 細胞では、EZH2 阻害時に p16 遺伝子が誘導するか否かの報告がなく、その点も検討準備中である。

また、G401 細胞での SMARCB1/SNF5/INI1 変異、A549 細胞での SMARCA4/BRG1 変異と同様に SWI/SNF 複合体を形成する分子である ARID1A1 に変異を有するヒト卵巣がん細胞でも、EZH2 阻害剤に感受性であり、その増殖抑制の際には、PI3K-Akt 経路を抑制する PIK3IP1 遺伝子が誘導されることが報告されている (Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers. Nat Med. 2015 21:231)。従って、上記 3 化合物については、p16 遺伝子誘導だけでなく、PIK3IP1 遺伝子誘導についても、検証を実施する予定である。

さらに、上記 3 化合物については、EZH2 の阻害形式として、直接、EZH2 に結合して、酵素阻害的に阻害するのか、あるいは EZH2 分子

の発現を抑制するのか、あるいは EZH2 分子を含む PRC2 複合体への影響なのか等の阻害機構を明らかにする予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾和 義広 (SOWA YOSHIHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70315935