

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26461175

研究課題名（和文）非小細胞肺癌における癌幹細胞表面抗原阻害とヒストン修飾酵素阻害との併用療法の検討

研究課題名（英文）Combined inhibition of stem cell markers and histone modification enzymes in non-small cell lung cancer

研究代表者

木下 一郎 (Kinoshita, Ichiro)

北海道大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40343008

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：EGFRチロシンキナーゼ阻害薬（TKI）抵抗性非小細胞肺癌（NSCLC）細胞H1975において、1%のside population細胞を分取し、造腫瘍能の増強、幹細胞マーカーとヒストンH3K27トリメチル化酵素EZH2の発現上昇を認めた。EZH2が肺癌の癌幹細胞の維持に関わる可能性が示唆された。EZH2とヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の同時阻害はNSCLCの相乗的な細胞増殖抑制、EGFRシグナル経路の抑制、H1975移植マウスモデルでの高い抗腫瘍効果を示した。幹細胞に関連するEZH2とHDACの同時阻害がEGFR-TKI抵抗性肺癌を含むNSCLCの有効な治療法となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：EGFR-tyrosine kinase inhibitor (TKI) resistant non-small lung cancer (NSCLC) cell H1975 had 1% side population fraction, which showed increased tumorigenicity, elevated expression of stem cell markers and histone H3K27 trimethyl transferase EZH2, suggesting that EZH2 may play a role in maintenance of cancer stem cells. The combined treatment with inhibitors of the EZH2 and the histone deacetylases HDACs showed synergistic growth suppressive effects, suppression of EGFR signaling, and decrease in the in vivo tumor growth of H1975 cells, suggesting that the combined pharmacological targeting of the histone modification enzymes may provide more effective epigenetic therapeutics for NSCLCs including those with EGFR-TKI-resistant mutations.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：肺癌 ヒストン修飾 癌幹細胞 EZH2 DZNep HDAC SAHA side population

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌を含む多くの悪性腫瘍は、幹細胞の性質をもつ少数の細胞集団から形成されてくることが示され、癌幹細胞と名付けられた。癌幹細胞は強い抗癌薬抵抗性を持つことが明らかとなり、癌の根治のためには癌幹細胞を標的とした治療法の開発が必須と考えられる。

最近、急性白血病 (AML) 幹細胞と正常造血幹細胞の遺伝子発現の網羅的な解析から、正常造血幹細胞に発現のない T cell immunoglobulin mucin-3 (TIM-3) が、AML 幹細胞の表面抗原であることが報告された。私達は、共同研究によって固形腫瘍の癌組織内で、樹状細胞が TIM-3 を高発現し、alarmin タンパク質の HMGB1 と結合することで、核酸を介した自然免疫応答を抑制していることを報告した。

一方で癌幹細胞 - 非癌幹細胞の移行に可塑性があり、ニッチなどの周囲環境の影響を受けながら適合している事象が報告されてきている。この可塑性はゲノムの塩基配列には規定されず、可逆的なエピジェネティック遺伝子制御であるヒストン修飾が重要な役割を果たしている可能性がある。

ポリコームタンパク質複合体中のヒストンメチル転移酵素 EZH2 は癌幹細胞の維持にも重要な働きをしていることが報告された。私達は、NSCLC において EZH2 がしばしば高発現し独立した予後不良因子となっていること、EZH2 の小分子阻害薬である 3-Deazaneplanocin (DZNep) が G1 細胞周期停止とアポトーシスを介して NSCLC 細胞の増殖を抑制することを報告した。

### 2. 研究の目的

以上より、可塑性のある癌幹細胞を効率的に治療するためには、癌幹細胞を標的とした治療に加え、可逆的なヒストン修飾酵素阻害による癌幹細胞/非癌幹細胞可塑性を標的とした治療法を併用が有用である可能性がある。

本研究では、NSCLC における癌幹細胞表面抗原に対する阻害抗体、および癌幹細胞と非癌幹細胞の可塑性を制御する可逆的なエピジェネティック治療であるヒストン修飾酵素阻害を組み合わせた治療法の開発を最終目標として、その基盤となる研究を行う。研究期間内に以下のことを明らかにする。

(1) NSCLC における TIM-3 陽性細胞分画を同定し、TIM-3 陽性細胞が幹細胞の性質を持つカスフェロイド形成能や幹細胞マーカー等で検討する。

(2) TIM-3 陽性の有意な分画が認められなかった場合は、他の幹細胞分画として知られる CD44 陽性細胞や side population (SP) 細胞を用いて検討する。

(3) ヒストン修飾阻害増強のため、DZNep に加え、ポリコームタンパク質との相互作用し、EZH2 による転写抑制に必要と報告されたヒ

ストン脱アセチル化酵素 (HDAC) に対する阻害薬 SAHA を併用し、in vitro, in vivo での抗腫瘍効果や幹細胞マーカーの変化を検討する。

(4) EGFR 遺伝子変異陽性細胞においては、ゲフィチニブとの併用効果を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) NSCLC における TIM-3 陽性細胞分画をフローサイトメトリー法で検討した。

(2) CD44 陽性細胞や SP 細胞をフローサイトメトリー法で同定し、分取した細胞における癌幹細胞マーカーの発現を検討した。

(3) DZNep と SAHA を併用し、細胞増殖、アポトーシス、エピジェネティクスに与える影響を MTT 法、Annexin V-FITC を用いたフローサイトメトリー法、ウェスタンブロット法で検討した。また、EGFR 変異との関係や EGFR タンパク質や下流シグナルに対する影響をウェスタンブロット法で検討した。In vivo での抗腫瘍効果は、H1975 細胞を異種移植したヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu) を対照群 (5% DMSO)、DZNep 投与群 (DZNep: 4mg/kg)、SAHA 投与群 (SAHA: 40mg/kg)、DZNep+SAHA 併用群 (DZNep: 4mg/kg+ SAHA: 40mg/kg) の 4 群に分けて、週 2 回腹腔内投与を行い比較した。

### 4. 研究成果

(1) EGFR 遺伝子変異陽性細胞株 (PC-3, PC-9, HCC827, H1975) および陰性細胞株 (H1299, A549, H460) を用いて、白血病幹細胞の表面抗原である TIM-3 の発現陽性細胞をフローサイトメトリーによって検討したが、有意な陽性細胞の分画が得られなかった。代替の幹細胞表面抗原として CD44 の発現を検討し、50-80% の陽性細胞分画を認めただが、陽性細胞における各種癌幹細胞マーカーの発現上昇は認めなかった。

(2) このため、代表的な幹細胞分画として知られる side population (SP 細胞) について H1975 を用いて検討し、1-2% の SP 細胞を同定した。SP 細胞は non-SP 細胞と比べ、ソフトアガロース法でのコロニー形成能と SCID マウスでの造腫瘍能の増強を認め、Sox2, Oct4, Nanog, Notch1 の幹細胞マーカーの上昇を認めただが、ヒストン H3K27 トリメチル化酵素 EZH2 の発現も亢進していることを明らかにした。SP 細胞に癌幹細胞が濃縮され、EZH2 が肺癌の癌幹細胞の維持や可塑性に関与している可能性が示唆された。

(3) すでに私達は EZH2 阻害薬の DZNep が種々の肺癌細胞の増殖を抑制することを示していたが、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC 阻害薬の SAHA を併用することで、各種 NSCLC 細胞の細胞増殖を相乗的に抑制することを見出した (図 1)。併用療法 (DZNep 0.2  $\mu$ M, SAHA 2  $\mu$ M) は、EZH2 の発現と H3K27me3 を各々単剤よりも低下させ、強くアポトーシスを誘導した (図 2)。特に EGFR 変異を有する PC-3 と H1975 で効果が高く、正常型だけでなく、

変異型 EGFR の発現とリン酸化も抑制され、EGFR 下流の AKT と ERK1/2 のリン酸化も抑制された (図 3)。

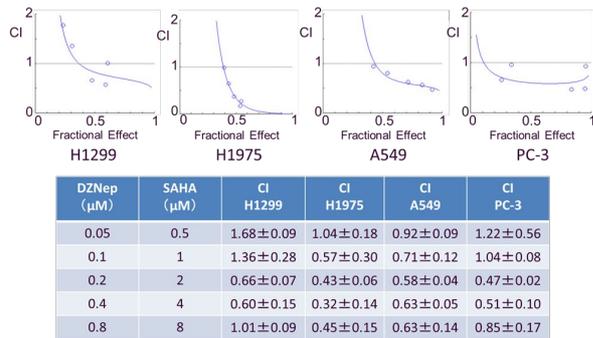


図1 EZH2阻害薬DZNepとHDAC阻害薬SAHAの非小細胞肺癌に対する増殖抑制効果のCombination index (CI) 解析

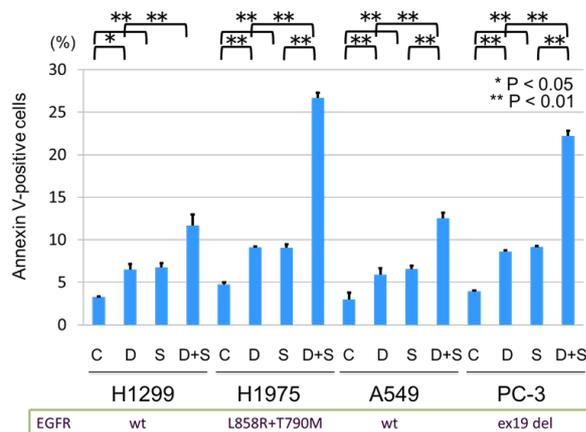


図2 DZNepとSAHAの非小細胞肺癌細胞に対するアポトーシス誘導

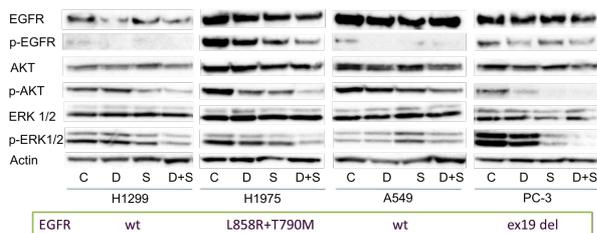


図3 DZNepとSAHAが非小細胞肺癌細胞のEGFRシグナルに与える影響

(4) EGFR-TKI 抵抗性変異のH1975で in vivo 抗腫瘍効果を検討したところ、併用による高い抗腫瘍効果を確認した (図 4)。本実験の治療で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。摘出した腫瘍組織においても、対照群と比し併用療法により EZH2 と H3K27me3 の発現が低下し、EGFR のリン酸化とその下流の AKT、ERK1/2 の

リン酸化も抑制されていた (図 5)。

以上の結果から、幹細胞シグナルに関連するヒストン修飾酵素 EZH2 と HDAC の同時阻害が、EGFR-TKI 抵抗性肺癌を含む非小細胞肺癌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示唆された。

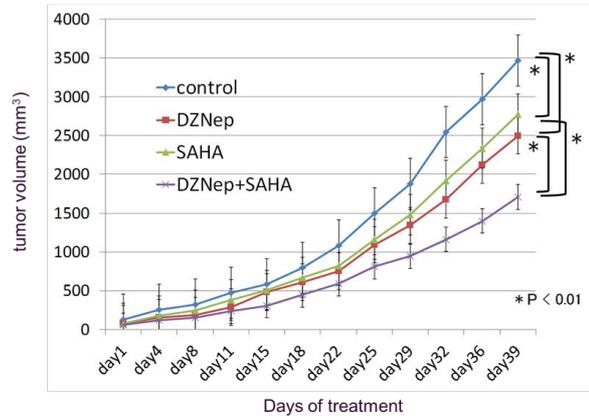


図4 H1975移植腫瘍に対するDZNepとSAHAの in vivo 抗腫瘍効果

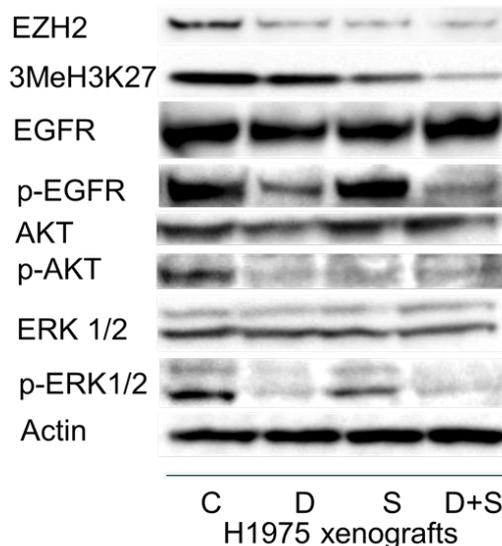


図5 H1975移植腫瘍においてDZNepとSAHAがEZH2発現、H3K27トリメチル化とEGFRシグナルに与える影響

## 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6件)

1. Sakakibara-Konishi J, Kinoshita I (他7名、7番目). Combined antitumor effect of secretase inhibitor and ABT-737 in notch expressing non-small cell lung cancer, *Int J Clin Oncol*. 2017;22:257-268. (査読あり) doi: 10.1007/s10147-016-1060-3.

2. Takashina T, Kinoshita I, Dosaka-Akita H (他 5 名、2 番目). Combined inhibition of EZH2 and histone deacetylases as a potential epigenetic therapy for non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.* 2016;107:955-962. (査読あり)  
doi: 10.1111/cas.
3. Honma R, Kinoshita I, Dosaka-Akita H (他 8 名、2 番目). Expression of fucosyltransferase 8 is associated with an unfavorable clinical outcome in non-small cell lung cancers. *Oncology.* 2015;88:298-308. (査読あり)  
doi: 10.1159/000369495.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 木下一郎, HOT/LC-SCRUM-Japan を利用した HER2 を標的とする肺癌治療の可能性, トラスツズマブ, 第 56 回日本呼吸器学会, 2016 年 4 月 8 日, 国立京都国際会館 (京都府・京都市).
2. Kinoshita I, Screening for HER2 alterations and HER2-targeted therapy in non-small cell lung cancer, 第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2015 年 7 月 18 日, ロイトン札幌 (北海道・札幌市).
3. 木下一郎, EZH2 阻害薬とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬の併用療法の非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞に対する抗腫瘍効果, 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2014 年 6 月 26 日, TKP ガーデンシティ仙台 (宮城県・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

木下 一郎 (KINOSHITA Ichiro)  
 北海道大学・医学研究科・准教授  
 研究者番号 : 40343008

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

地主将久 (JINUSHI Masahisa)  
 慶應義塾大学・医学部・特任准教授  
 研究者番号 : 40318085

秋田弘俊 (AKITA Hirotoshi)  
 北海道大学・医学研究科・教授  
 研究者番号 : 70222528

(4) 研究協力者