

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09586

研究課題名（和文）肺癌におけるヒストンメチル化による癌抑制遺伝子不活化の解明

研究課題名（英文）Inactivation of tumor suppressor by histone methylation in lung cancer

研究代表者

田島 健（Tajima, Ken）

順天堂大学・医学部・講師

研究者番号：50384102

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：癌化の過程でジェネティックな変化のみならず、エピジェネティックな異常の関与が明らかにされ、この異常は広範な遺伝子制御異常をきたすと考えられ、肺癌においてもこれらの遺伝子制御異常が重要な役割を担っており、治療標的としての可能性が示唆される。ヒストン脱メチル化酵素であるLSD1の splicing variantであるLSD1+8aが神経分化誘導に関与することに着目し、神経内分泌腫瘍である小細胞肺癌において神経分化誘導ならびに抗がん剤耐性への関与が示された。今後、新規の治療標的としての可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティクスの制御機構の破綻は様々な遺伝子発現の変化を誘導し、癌化の過程に重要な役割を担う。このためエピジェネティクスが新たな有望な治療標的として考えられ、すでにエピジェネティクスを標的とした治療薬であるDNAメチル化阻害剤やヒストンアセチル化阻害剤が血液系の悪性腫瘍で臨床応用されている。しかしこれらの臨床応用された治療の効果は限定されており、依然として課題が残されている。本研究ではいまだ臨床応用されていないヒストンメチル化修飾に焦点をあてたものであり、本研究の結果よりヒストンメチル化修飾が新規治療標的となる可能性が示唆され、肺癌の更なる予後の改善につながる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The focus on cancer biological pathways has recently shifted from genetic to epigenetic regulation. Epigenetic dysregulation ultimately leads to changes in the pattern of gene expression. Therefore, epigenetics is thought to be potential promising targets. We focused on LSD1+8a, which has been reported to have a key role in differentiation in neural tissues, in small cell lung cancer (SCLC) that is neuroendocrine tumor. A significant positive correlation was observed between LSD1+8a and neuroendocrine marker genes. Neuroendocrine marker genes were downregulated by suppression of LSD1+8a in SCLC cell lines. SCLC cells with high LSD1+8a isoform expression were more resistant to chemotherapeutic agents compared with these with low LSD1+8a isoform expression. These results indicate that LSD1+8a should be considered a novel therapeutic target for SCLC.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺癌 エピジェネティクス ヒストン修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は日本において、癌による死亡の第一位であり、極めて予後不良の疾患である。近年、遺伝子変異をもった肺癌に対しては、分子標的治療により治療成績が向上されているが、満足できる結果にはほど遠く新規の治療法の確立が急務である。

近年、癌化の過程で遺伝子変異といったジェネティックな変化のみならず、エピジェネティックな異常の関与が明らかにされてきた。癌のエピジェネティクスとその制御機構は未だ不明な部分が多いが、エピジェネティクスの異常は広範な遺伝子制御異常をきたすと考えられ、肺癌においてもこれらの遺伝子制御異常により細胞が本来持つアポトーシスや老化といった抗腫瘍機構からの逸脱を可能にしていると考えられる。このためこれらの制御機構の解明は新規の治療法の確立へつなぐと考えられ、世界的に熾烈な研究競争がなされている。ヒストン修飾はエピジェネティクスの代表の一つであり、ヒストンのアミノ末端はヒストンテールとよばれ、アセチル化やメチル化といった様々な修飾を受ける。ヒストン修飾による転写制御は複雑であり、ヒストンのアセチル化は殆どすべて転写活性化に関与するが、メチル化は修飾される位置によりその作用が異なり、さらにメチル化の個数によっても異なる。癌細胞ではこれらの複雑な制御機構を攪乱する事により、広範な遺伝子発現の異常をきたしていると考えられている。

研究代表者は以前の研究で、ヒストンメチル化酵素の一つである SETD1A が腫瘍抑制遺伝子の発現を制御し、新たな治療標的の可能性となり得る事を報告している (Nature communications 2015, 6, 8257)。またこの研究の新たな知見として、ヒストンのアセチル化修飾が汎用的なのに対し、数あるヒストンメチル化酵素はそれぞれ個別にメチル化する部位が決まっている可能性、すなわち特定の遺伝子のみ制御している可能性が示され、癌に特異的な新たな治療のターゲットを同定できる可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

以上より本研究「肺癌におけるヒストンメチル化による癌抑制遺伝子不活化の解明」の目的は、エピジェネティクス、特にヒストン脱メチル化酵素に着目し、抗腫瘍機構の制御メカニズムを解明し、肺癌ならびに中皮腫の新たな治療を模索する事である。具体的には神経内分泌腫瘍である小細胞肺癌において高発現しているヒストン H3K4 と H3K9 のモノあるいはジメチル化体を脱メチル化する LSD1 において、splicing variant である LSD1+8a が H3K9 の脱メチル化を介し、神経への分化を促進することが示されたことに着目した。LSD1+8a が神経内分泌腫瘍である小細胞肺癌において脱メチル化による発がん及び悪性化をもたらしているとの仮説を立て、LSD1+8a の小細胞肺癌における機能解析を行うことで、小細胞肺癌の発生機序、さらには治療標的としての可能性を検討することも目的とした。

## 3. 研究の方法

### ・ public RNA sequencing datasets を用いた LSD1+8a の発現解析

先行研究から LSD1 の splicing variant である LSD1+8a はかなり限られた細胞のみに発現している可能性が高いため、LSD1+8a の発現を確認するために、public RNA sequencing datasets である Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) を用いて、複数の小細胞肺癌細胞株における LSD1/LSD1+8a の発現解析を行う。

### ・ 小細胞肺癌細胞株ならびに臨床検体での LSD1/LSD1+8a の発現解析

CCLE の発現解析により LSD1+8a の発現がみられた小細胞肺癌細胞株を用いて、LSD1+8a に特異的な primer を作成し、qPCR により実際の発現を確認する。また当院で保管している小細胞肺

がん患者の臨床検体を用いて同様の解析を行う。

・ 小細胞肺がん細胞株における LSD1+8a と神経分化マーカーとの相関の解析

CCLE の発現解析により LSD1+8a の発現がみられた小細胞肺がん細胞株を用いて、神経分化マーカーである chromogranin A(CHGA)、synaptophysin (SYP)、neural cell adhesion molecule (NCAM)、enolase 2 (ENO2)、beta-1,3-glucuronyltransferase 1 (B3CAT1)、gastrin-releasing peptide (GRP) の発現を qPCR により定量化し、LSD1+8a の発現との相関を解析する。

・ LSD1+8a による神経分化マーカーの発現制御解析

LSD1 の発現は変化させずに splicing variant である LSD1+8a のみを knockdown 可能な LSD1+8a に特異的な siRNA を合成する。この siRNA を用いて、LSD1+8a を特異的に knockdown し、神経分化マーカーである CHGA、SYP、NCAM、ENO2、B3CAT1、GRP の発現を qPCR で定量化し、変化があるか解析する。

・ 小細胞肺がんにおける LSD1+8a の機能解析

小細胞肺がん細胞株を用いて LSD1+8a を knockdown し、増殖スピードならびに CDDP や LSD1 阻害剤を使用し抗がん剤に対する感受性の解析を行う。また LSD1+8a が発現している小細胞肺がん細胞株と発現していない細胞株で CDDP や LSD1 阻害剤を使用しに対して感受性が異なるかを解析する。

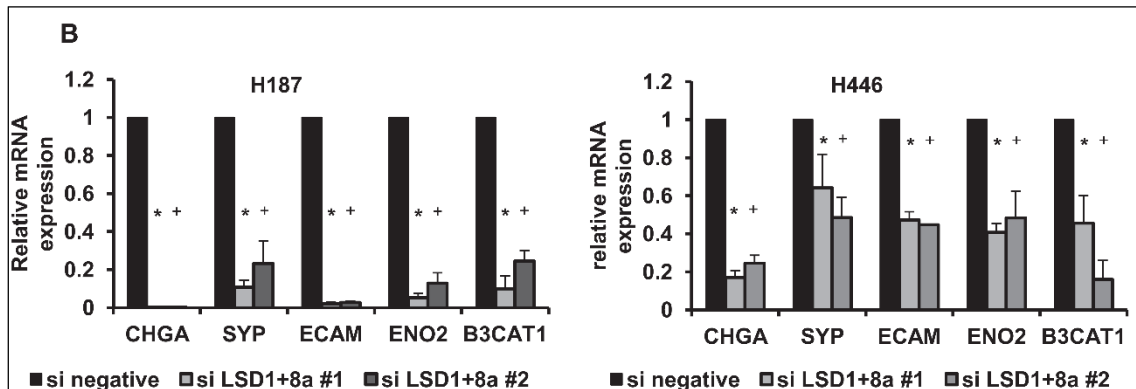
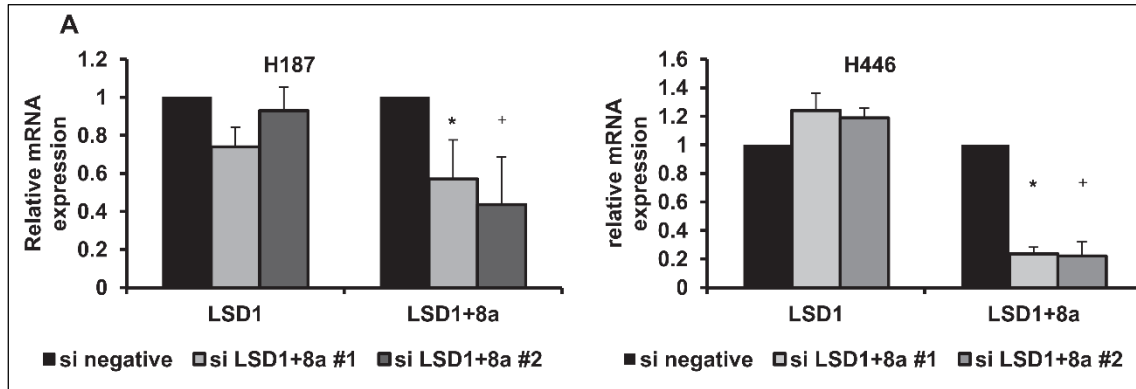
#### 4 . 研究成果

CCLE の database より、小細胞肺癌と他の癌腫合わせて 14 の細胞株 (A549、DMS53、DMS79、DMS114、DMS153、H69、H82、H209、H446、H510、H596、H1155、SBC5、SHP-77) において、Integrative Genomic Viewer を用いて LSD1 ならびに LSD1+8a の発現を解析した。10 read 以上みられた場合は発現ありと定義したところ、H446、SHP-77、H1155、DMS79 の 4 つの細胞株で LSD1+8a の発現を確認した。また実際に小細胞肺癌細胞株(SBC3、SBC5、H69、H446、H187、H82)を用いて qPCR により LSD1+8a の発現を確認したところ、H187、H446、H82 で発現を認めた。小細胞肺がんの臨床検体を用いて qPCR により LSD1+8a の発現を確認し、臨床病期との相関がみられるか解析したが、発現の病期の相関はみられなかった。

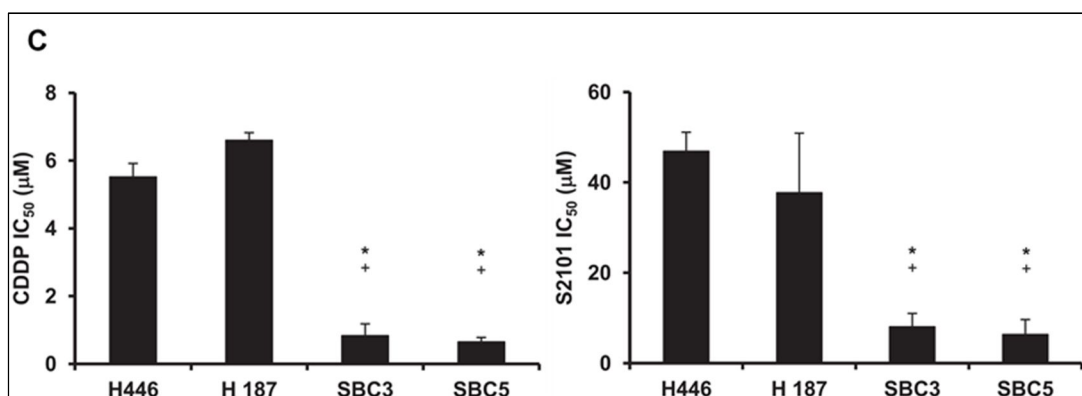
小細胞肺がん細胞株における神経分化マーカーである chromogranin A(CHGA)、synaptophysin (SYP)、neural cell adhesion molecule(NCAM)、enolase 2(ENO2)、beta-1,3-glucuronyltransferase 1(B3CAT1)、gastrin-releasing peptide(GRP)の発現を qPCR により確認し、LSD1+8a の発現との相関を解析したところ CHGA、SYP、NCAM、ENO2 において強い正の相関が示された。この結果から LSD1+8a が神経分化マーカーの発現を制御している可能性が示唆された。

そこで LSD1+8a が神経分化マーカーの発現を制御しているか確認するため、LSD1 の発現は変化させずに splicing variant である LSD1+8a のみを knockdown 可能な siRNA LSD1+8a をデザインした。この LSD1+8a 特異的な siRNA を用いて H446 と H187 における LSD1+8a を knockdown したところ、LSD1 の発現には変化がみられず、LSD1+8a のみ発現が抑制されることが確認された (Figure. A)。さらに LSD1+8a を knockdown 後に神経分化マーカーである CHGA、SYP、NCAM、ENO2、B3CAT1 の発現を解析したところ、これらの発現の有意な低下が確認された (Figure. B)。一方で、幹細胞マーカーである SOX2、POU5F1B、KLF4、MYC、CD44、PROM1 等の発現には変化がみ

られなかった。これらの結果から LSD1+8a が神経分化マーカーの発現制御を行い、小細胞肺がん細胞において神経分化における重要な役割を担っている事が示唆された。



また LSD1+8a を knockdown した小細胞肺がん細胞株では増殖が優位に抑制されることが示された。LSD1+8a が発現している小細胞肺がん細胞株 (H446、H187) と発現していない細胞株 (SBC3、SBC5) における CDDP と LSD1 inhibitor を用いて抗がん剤感受性試験を行った。H446 と H187 における CDDP の  $IC_{50}$  はそれぞれ  $5.51 \pm 0.40 \mu M$ 、 $6.59 \pm 0.22 \mu M$  であり、SBC3 と SBC5 における  $IC_{50}$  はそれぞれ  $0.82 \pm 0.35 \mu M$ 、 $0.64 \pm 0.13 \mu M$  であった (Figure. C)。同様に H446 と H187 における LSD1 inhibitor の  $IC_{50}$  はそれぞれ  $46.87 \pm 4.23 \mu M$ 、 $37.69 \pm 13.21 \mu M$  であり、SBC3 と SBC5 における  $IC_{50}$  はそれぞれ  $8.01 \pm 3.00 \mu M$ 、 $6.34 \pm 3.31 \mu M$  であった (Figure. C)。これらの結果から、LSD1+8a の発現が抗がん剤耐性を誘導している可能性が示唆され、LSD1+8a の抑制が腫瘍増殖の抑制作用があることから、小細胞肺がんにおいて LSD1+8a を治療標的とした新たな治療法の可能性が考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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<br>Jotatsu, T., Yagishita, S., Tajima, K., Takahashi, F., Mogushi, K., Hidayat, M., Wirawan, A., Ko, R., Kanemaru, R., Shimada, N., Mitani, K., Saito, T., Takamochi, K., Suzuki, K., Kohsaka, S., Kojima, S., Mukae, H., Yatera, K., and Takahashi, K. | 4. 巻<br>9           |
| 2. 論文標題<br>LSD1/KDM1 isoform LSD1+8a contributes to neural differentiation in small cell lung cancer   | 5. 発行年<br>2017年     |
| 3. 雑誌名<br>Biochemistry and Biophysics Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>86-94 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.11.015   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ken Tajima, Yae Toshifumi, Fumiyuki Takahashi, Shyamala Maheswaran, Kazuhisa Takahashi     |
| 2. 発表標題<br>In search of new therapy targeting histone methylation in cancer (International Symposium) |
| 3. 学会等名<br>日本呼吸器学会総会（招待講演）  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Aditya Wirawan, 田島健、高橋史行、Moulid Hidayat、金丸良太、濃沼淑芳、早川乃介、田島学、松本直久、金森幸一郎、武田育子、加藤元康、小林功、嶋田奈緒子、高橋和久 |
| 2. 発表標題<br>The Epigenetic Roles of LSD1+8a in Small Cell Lung Cancer                                      |
| 3. 学会等名<br>The International Association for the Study of Lung Cancer（国際学会）                               |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Aditya Wirawan, 田島健、丈達陽順、柳下薫寛、高遼、Moulid Hidayat、金丸良太、濃沼淑芳、井原宏彰、嶋田奈緒子、茂榎薫、高橋史行、高橋和久 |
| 2. 発表標題<br>小細胞肺癌におけるヒストン脱メチル化酵素LSD1+8aの役割   |
| 3. 学会等名<br>第57回日本肺癌学会総会   |
| 4. 発表年<br>2016年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                        | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 高橋 和久<br><br>(Takahashi Kazuhisa)<br><br>(80245711) | 順天堂大学・医学部・教授<br><br><br>(32620)              |    |
| 研究分担者 | 高橋 史行<br><br>(Takahashi Fumiyuki)<br><br>(70327823) | 順天堂大学・医学部・准教授<br><br><br>(32620)             |    |
| 研究分担者 | 茂櫛 薫<br><br>(Mogushi Koru)<br><br>(60569292)        | 順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師<br><br><br>(32620) |    |