

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19941

研究課題名(和文) 消化器癌におけるがん代謝関連酵素LSD1の機能解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Functional analyses and developments of new therapies targeting LSD1 in gastrointestinal cancers

研究代表者

小澄 敬祐 (KOSUMI, Keisuke)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：50594884

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)：本研究の目的は、消化器癌において新たながん代謝関連バイオマーカーとしての Lysine Specific Demethylase-1 (LSD1) の発現意義をグローバルなデータベースを用いて解明し、新規治療法の開発に寄与する事である。我々は食道癌において、LSD1がglobal DNA methylation levelの指標であるLINE-1メチル化レベル及びperitumoral lymphocytic reactionと有意に逆相関する事を確認した。本データはがん代謝因子であるLSD1がepigenetic change及び腫瘍免疫に関与する事を示唆するデータである。

研究成果の概要(英文)：The aim of the current study is to investigate the significance of Lysine Specific Demethylase-1 (LSD1) using global human population-based database, and contribute to the development of the new treatments. No association was observed between tumor LSD1 expression, and PIK3CA mutation, NRF2, CD8+ T-cell density, FOXP3+ T-cell density, PD-L1, IDO1, or tumor-infiltrating lymphocytes ($P > 0.14$). However, we found the significant inverse association of LSD1 with LINE-1 methylation level and peritumoral lymphocytic reaction ($P = 0.0019$ and $P = 0.017$, respectively). Our findings support the possible influence of LSD1 on epigenetic change and anti-tumor immunity.

研究分野：外科腫瘍学

キーワード：がん代謝 消化器癌 バイオマーカー エピジェネティクス がん免疫

1. 研究開始当初の背景

“がん代謝”は、癌細胞の発育・進展において非常に重要な役割を担っており、近年がん研究において非常に注目されている。細胞の代謝において重要な経路として、解糖系と酸化リン酸化がある。解糖系の特徴として、エネルギー産生が速い、低酸素環境でも可能、中間産物(細胞増殖の基質となる)の産生、乳酸産生による酸性環境創出があり、また活性酸素産生による細胞障害がないことも重要である。一方、酸化リン酸化の特徴として、十分量の酸素が必要、活性酸素産生による細胞障害がある。がん代謝では『Warburg effect』が重要であり、解糖系亢進、酸化リン酸化抑制を特徴とする。癌細胞は Warburg effect という代謝 Shift を形成することで、細胞増殖・進展に有利な環境を自ら作り出している。

Lysine Specific Demethylase-1 (LSD1) は最初に発見された脱メチル化酵素であり、ヒストン H3 の 4 番目リジン残基の脱メチル化をフラビン依存的に行う。様々な癌腫において細胞増殖・浸潤及び上皮間葉転換への関与が報告されており、分子標的治療の新たなターゲットとして注目を集めている。我々は食道癌において、LSD1 が癌部において発現が強く、浸潤のみでなく『Warburg effect』という代謝 Shift に寄与することで、予後不良に関与している可能性を報告している (Kosumi et al. Int J Cancer. 2015)。

食道癌はがん死亡原因第一位でその予後は未だに不良である。基礎研究及び臨床研究により、分子標的療法に代表される革新的な治療法の開発が模索されている。前述したように、食道癌において LSD1 は癌進展に寄与している可能性がある。様々な癌種において LSD1 が高発現であることから、LSD1 は癌治療の target として非常に有望である。さらに、近年注目されるがん代謝と関連するエピジェネティックな変化を同定することは、リスクに応じた治療方針決定に役立ち、また、その変化を標的とした治療法が開発された際には、対象患者選別のマーカーとして用いられることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食道癌において、新たながん代謝関連バイオマーカーとしての LSD1 の発現意義をグローバルなデータベースを用いて解明し、新規治療法を開発に寄与する事である。また、食道癌における LSD1 発現と予後、臨床病理学的因子(年齢、性別、喫煙・飲酒などの生活習慣)、分子的变化 (CMIP、MSI、KRAS、BRAF、PIK3CA など)との関連を網羅的に解析する。

3. 研究の方法

熊本大学消化器外科学及び Dana-Frabre Cancer Institute の所有する消化器癌臨床検体を対象に下記解析を行った。

免疫染色による評価

LSD1、NRF2、CD8、FOXP3、PD-L1、IDO1、SQSTM1 病理学的リンパ球浸潤の評価

Epigenetic change 解析

LINE-1 メチル化レベル解析

Genetic change 解析

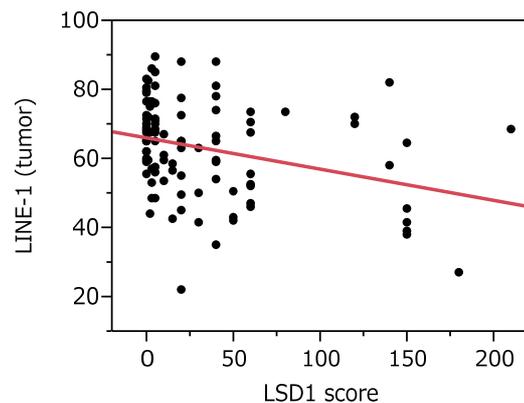
KRAS、BRAF、PIK3CA 変異解析

また、食道癌細胞を用い機能解析を行った。(Aspirin 曝露による細胞周期・アポトーシスの変化を評価)

4. 研究成果

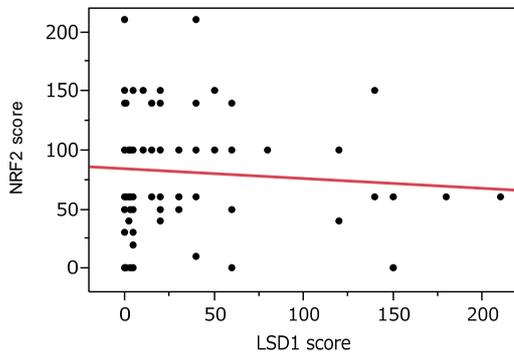
LSD1 の癌進展に関わる機序を解明すべく、分子病理学的因子、腸内細菌、腫瘍免疫との関連を解析した。

食道癌において、LINE-1 (long-interspersed nucleotide element-1) メチル化レベルは予後予測マーカーとなりうる。LSD1 との関連解析の結果、癌部の LSD1 発現レベルが癌部の LINE-1 メチル化レベルと有意に逆相関である事を認めた ($P=0.0019$ 、下図)。これは食道癌の進展において、LSD1 が global DNA methylation level と関連する事をサポートするデータと考えられる。

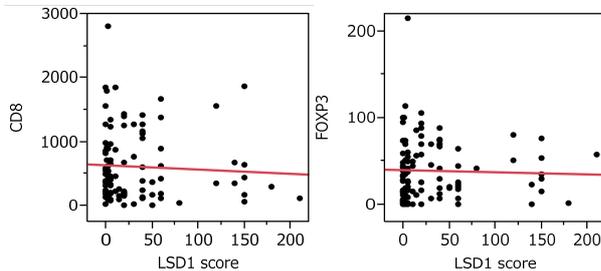


また、食道癌において重要な Genetic change の一つである PIK3CA 変異との関連解析を行った。しかし、PIK3CA 変異と癌部の LSD1 発現レベルに有意な相関は認めなかった ($P=0.14$)。

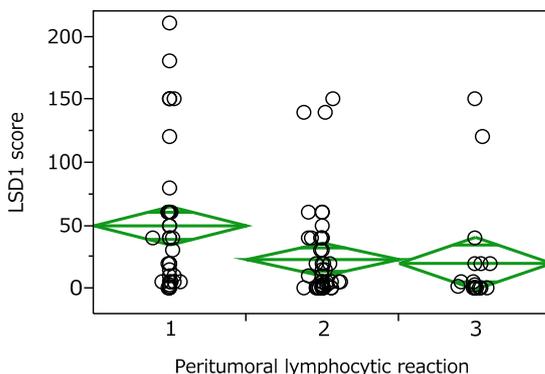
次に、がん代謝の関連に着目した。NRF2 は LSD1 とともにがん代謝制御に関して重要な役割を持つ可能性がある。しかし、それぞれの発現レベルに有意な相関は認めなかった ($P=0.54$ 、下図)。



近年の癌研究において、腫瘍免疫は特に注目を集めており、消化器癌もその一つである。特に CD8、FOXP3 陽性細胞数は予後に寄与する可能性があり、LSD1 との関連解析を行った。しかし、LSD1 発現レベルと、腫瘍最深部における CD8 陽性細胞数、FOXP3 陽性細胞に、有意な相関は認めなかった ($P>0.5$ 、下図)。



次に Lymphocytic reaction との関連解析を行った。その結果、LSD1 発現レベルは peritumoral lymphocytic reaction と有意に逆相関である事を認めた ($P=0.017$ 、下図)。これはがん代謝が抗腫瘍免疫に影響を及ぼす可能性を示唆するデータと考えられる。



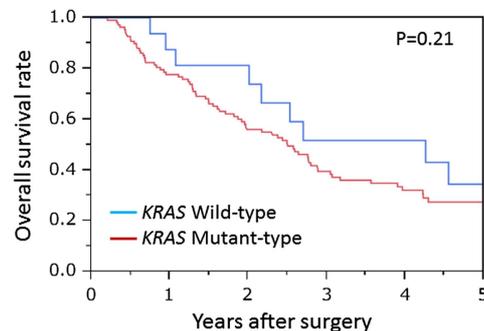
Tumor-infiltrating lymphocytes、癌部の PD-L1 発現、癌部の IDO1 発現と関連も解析したが、いずれも有意な相関は認めなかった ($P>0.23$)。

次に、大腸癌に関して研究を行った。大腸癌では、LSD1 が発癌・癌進展に寄与する事をサポートする報告が多数ある (Br J Cancer 2013、PLoS One 2013、Oncotarget 2017)。一方、近年 LSD1 はオートファジーと複雑な相互作用を有する可能性があり (PLoS Biol 2015)、そしてオートファジーは宿主の腫瘍免疫にも関連する可能性がある (Immunity 2013)。そこで、大腸癌におけるオートファジーと腫瘍免疫の関連性を評価した。その結果、オートファジーマーカーである SQSTM1 発現レベルが FOXP3 陽性 T 細胞数と有意に逆相関することを明らかにした (Oncoimmunology 2017、下表)。

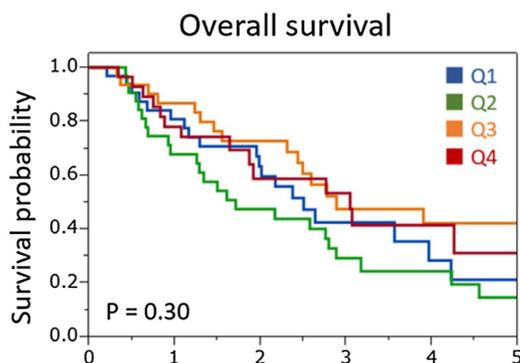
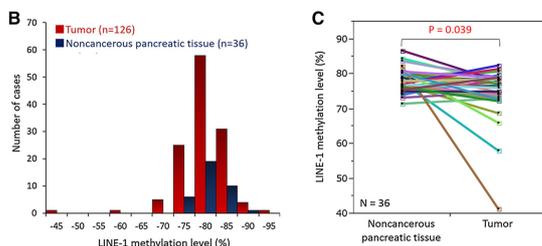
		Multivariable OR (95% I)
Model for FOXP3 ⁺ cell density		
Tumor SQSTM1	Low	1 (referent)
	Intermediate	0.66 (0.45-0.98)
	High	0.55 (0.36-0.83)
	P_{trend}	0.006

大腸癌において重要ながん関連遺伝子として LSD1、PTGS2 が挙げられ、これらは互いに影響しうる可能性がある。そこでまず、臨床で用いられる Aspirin による腫瘍抑制効果に関して検討を行った。その結果、*In vitro*において、PTGS2 阻害剤である Aspirin が *PIK3CA* 変異大腸癌細胞株で有意に腫瘍抑制効果が強い事を示した (Oncotarget 2017)。

膵臓癌において、LSD1 は癌進展に寄与する可能性が報告されている (Cancer Lett 2014、Tumour Biol 2016、Am J Transl Res 2017)。まず、膵臓癌における様々な分子病理学的変化を解析した。解析の結果、*KRAS* 変異 86.5%、*PIK3CA* 変異 0.8%、*BRAF* 変異 0% を認めた。しかし、いずれも予後との相関はなかった (Med Oncol 2016)。



次に、Genome 全体のメチル化レベルを示す LINE-1 methylation level を評価し、非癌部に比べ癌部で有意に LINE-1 methylation level が低い事を報告した (Surg Today 2017、下図)。しかし、予後との相関はなかった。



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4件)

全て査読有

Yamamura K, Kosumi K, Baba Y, Harada K, Zhang X, Zhou L, Kitano Y, Arima K, Kaida T, Takeyama H, Higashi T, Imai K, Hashimoto D, Chikamoto A, Tan X, Baba H. LINE-1 methylation level and patient prognosis in pancreas cancer: pyrosequencing technology and literature review. *Surg Today*. 2017 Dec;47(12):1450-1459. doi: 10.1007/s00595-017-1539-1.

Kosumi K, Masugi Y, Yang J, Qian ZR, Kim SA, Li W, Shi Y, da Silva A, Hamada T, Liu L, Gu M, Twombly TS, Cao Y, Barbie DA, Noshio K, Baba H, Garrett WS, Meyerhardt JA, Giovannucci EL, Chan AT, Fuchs CS, Ogino S, Nishihara R. Tumor SQSTM1 (p62) expression and T cells in colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2017 Jan 31;6(3):e1284720. doi: 10.1080/2162402X.2017.

Zhou L, Baba Y, Kitano Y, Miyake K, Zhang X, Yamamura K, Kosumi K, Kaida T, Arima K, Taki K, Higashi T, Imai K, Hashimoto D, Yamashita Y, Chikamoto A, Beppu T, Tan X, Baba H. KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations, and patient prognosis in 126 pancreatic cancers:

pyrosequencing technology and literature review. *Med Oncol*. 2016 Apr;33(4):32. doi: 10.1007/s12032-016-0745-9.

Gu M, Nishihara R, Chen Y, Li W, Shi Y, Masugi Y, Hamada T, Kosumi K, Liu L, da Silva A, Nowak JA, Twombly T, Du C, Koh H, Li W, Meyerhardt JA, Wolpin BM, Giannakis M, Aguirre AJ, Bass AJ, Drew DA, Chan AT, Fuchs CS, Qian ZR, Ogino S. Aspirin exerts high anti-cancer activity in PIK3CA-mutant colon cancer cells.

Oncotarget. 2017 Sep

18;8(50):87379-87389.

doi: 10.18632/oncotarget.20972.

〔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 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

小澄 敬祐 (KOSUMI, Keisuke)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号: 50594884

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

馬場 祥史 (BABA, Yoshifumi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号：20599708

原田 和人 (HARADA, Kazuto)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：70608869

山村 謙介 (YAMAMURA, Kensuke)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：10816507