

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18434

研究課題名(和文) 脂質代謝とヒストン脱メチル化酵素LSD1に着目した新たな膠芽腫増殖制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a new mechanism for controlling glioblastoma growth focusing on lipid metabolism and histone demethylase LSD1

研究代表者

坂元 顕久 (Sakamoto, Akihisa)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：30404479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫細胞の実験から、腫瘍増殖に関わる上皮成長因子受容体(EGFR)シグナルの活性化によりLSD1タンパク質が調節されることを確認した(活性化でLSD1タンパク質が増加)。同シグナルが活性化した膠芽腫細胞においてLSD1を阻害すると、細胞内のコレステロールが枯渇しやすい状態になる可能性が示唆され、その培養においてLSD1の阻害と共に脂質を含むサプリメント濃度を調整すると、低濃度ほど死滅細胞が増加した。一方、正常アストロサイトでLSD1を阻害すると、コレステロール合成系の遺伝子発現が膠芽腫細胞よりも強く誘導され、LSD1による細胞内コレステロールの消耗に対してより抵抗性を示す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

膠芽腫は最も予後の悪いがんの一つであり、様々な治療の開発でも生存期間は中央値15ヵ月程度とあまり改善しておらず、新たな治療法が求められている。近年、様々な分子標的薬が多くのがんで治療成績を向上させ、EGFR活性を阻害する薬剤はEGFR遺伝子に変異をもつ肺がんの生存期間を延長させた。多くの膠芽腫でもEGFRは活性化しているが、脳には血液脳関門というバリア機構のため多くの薬剤が通過できず、既存の分子標的薬では効果が十分でない。本研究からLSD1がEGFRシグナルの下流で膠芽腫の生存に関わる脂質代謝を調節しており、LSD1はEGFRシグナルが活性化した膠芽腫の治療標的となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In glioblastoma cells, we confirmed that LSD1 protein is regulated by the activity of EGFR signaling, which is involved in tumor growth (its activation increases LSD1 protein). Inhibition of LSD1 in glioblastoma cells with activated EGFR signaling resulted in the depletion of intracellular cholesterol, and when the concentration of lipid supplement was adjusted along with LSD1 inhibition in the culture, the number of dead cells increased at lower concentrations. In contrast, inhibition of LSD1 in normal astrocytes induced expression of genes in cholesterol synthesis more strongly than in glioblastoma cells, suggesting that they may be more resistant to LSD1-induced intracellular cholesterol depletion.

研究分野：脳神経外科学分野

キーワード：膠芽腫 脂質代謝 EGFR LSD1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳内コレステロールはアストロサイトで合成され周囲脳組織に供給される。コレステロール代謝産物であるオキシステロールは、脂質代謝のマスター転写因子である肝臓 X 受容体 (LXR) に作用してコレステロールの新規合成と取り込みを抑え、逆に細胞外排出を促すことで、細胞内コレステロールの恒常性を維持する。しかし、アストロサイトが腫瘍化した膠芽腫細胞では周囲からのコレステロール供給に依存しており、オキシステロールと同効果の LXR 作動薬を用いると、細胞内コレステロールが枯渇し死滅する。また、多くの膠芽腫で上皮成長因子受容体 (EGFR) シグナルの活性化を認め、その下流で脂質代謝遺伝子の発現が変化し、膠芽腫特有の脂質代謝系へとリモデリングされるが、そこにはエピジェネティック因子の関与が示唆される。膠芽腫特有の脂質代謝において、LXR などの転写因子を標的とした治療効果についての報告はあったが、その転写環境を支えるエピジェネティック因子についてはほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

(1) エピジェネティック因子であるヒストン脱メチル化酵素 LSD1 に着目し、EGFR シグナルによって誘導される膠芽腫特異的な脂質代謝における機能を解明する。

(2) LSD1 が制御する脂質代謝と膠芽腫細胞の生存との関係を追究し、EGFR シグナルが活性化した膠芽腫に対する分子標的としての LSD1 の有用性を評価する。

3. 研究の方法

(1) LSD1 が EGFR シグナルの下流で機能しているのかを調べるために、膠芽腫細胞を EGF で刺激し、LSD1 の発現の変化を確認する。逆に、EGFR シグナルを阻害したときの LSD1 の発現変化も確認する。

(2) EGFR シグナルの下流で調節される脂質代謝において LSD1 が関与しているのかを調べるために、EGFR シグナルが活性化した膠芽腫細胞を用いて LSD1 を阻害し、脂質代謝遺伝子の発現がどのように変化するかを確認する。LSD1 の阻害には、LSD1 の選択的阻害剤である S2101 と RNAi 法を用いる。

(3) LSD1 阻害剤を用いて、EGFR シグナルが活性化した膠芽腫細胞の生存にどのような影響を与えるのかを確認する。また、その影響が脂質を含むサプリメントの濃度に依存するの否かをサプリメントの濃度を変えることで確認する。

4. 研究成果

(1) EGFR シグナルが活性化した膠芽腫細胞である GBM39、GSC11 に、EGF を添加した後の LSD1 の転写レベルを比較したところ、EGF 添加によって LSD1 の転写レベルは特に変化を認めなかった。しかし、EGF を添加した細胞では LSD1 のタンパク質量の増加を認め、逆に EGFR チロシンキナーゼ阻害剤である Erlotinib を使用した細胞では LSD1 のタンパク質量は減少した。従って、膠芽腫細胞において LSD1 は、転写レベルではなくタンパク質レベルで EGF シグナルによって調整されることが確認された。

(2) LSD1 の選択的阻害剤である S2101 を用いて EGFR シグナルが活性化した膠芽腫細胞 GBM39 における LSD1 を阻害したところ、転写レベルでは、コレステロールを細胞内に取り込む LDL 受容体を分解する機能をもつ *MYLIP* 遺伝子の発現が誘導されていた。更にはコレステロールを細胞外へと排出させる機能を持つ *ABCA1* 遺伝子の発現も誘導されていた(図1)。これらの変化は、LXR 作動薬である LXR-623 を用いた際の遺伝子発現の変化と同じ作用を示していた。以前の報告では、LXR-623 のこの作用は膠芽腫細胞内のコレステロールを枯渇させることが分かっており(引用文献)、LSD1 の阻害によっても膠芽腫細胞内のコレステロールが枯渇しやすい状態になっている可能性が示唆された。実際に、細胞内のコレステロールの枯渇を感知し、コレステロール合成を活性化させる *SREBF2* 遺伝子の発現が、LXR-623 のみならず、LSD1 阻害剤でも誘導されることが分かり、これらの薬剤を組み合わせると、その効果が一層強まることが分

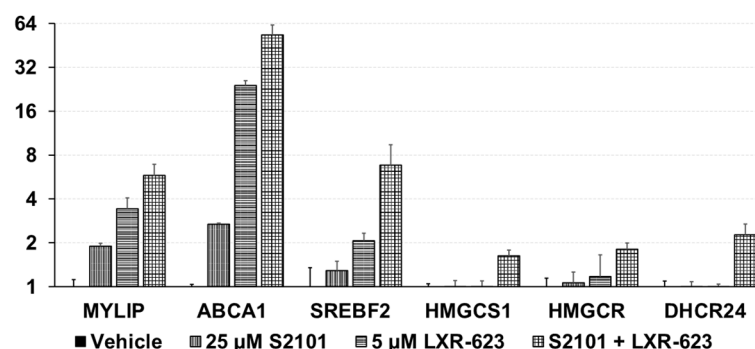


図1. 膠芽腫細胞におけるLSD1阻害薬とLXR作動薬の脂質代謝への影響
(縦軸は対数表示)

これらの変化は、LXR 作動薬である LXR-623 を用いた際の遺伝子発現の変化と同じ作用を示していた。以前の報告では、LXR-623 のこの作用は膠芽腫細胞内のコレステロールを枯渇させることが分かっており(引用文献)、LSD1 の阻害によっても膠芽腫細胞内のコレステロールが枯渇しやすい状態になっている可能性が示唆された。実際に、細胞内のコレステロールの枯渇を感知し、コレステロール合成を活性化させる *SREBF2* 遺伝子の発現が、LXR-623 のみならず、LSD1 阻害剤でも誘導されることが分かり、これらの薬剤を組み合わせると、その効果が一層強まることが分

かった。また同時に、LSD1 阻害剤と LXR 作動薬とを組み合わせさせた膠芽腫細胞では、コレステロール合成系の遺伝子の発現も誘導されていた。

LSD1 阻害剤によるこれらのコレステロール代謝関連遺伝子の発現パターンの変化は、RNAi 法による *LSD1* 遺伝子の転写抑制実験でも概ね再現された。

また同様に、LSD1 阻害剤 S2101 により、LDL 受容体のタンパク質量が減少することを確認し、逆に ABCA1 のタンパク質量は増加することが確認された。

LXR-623 は主に LXR に作用することが知られているが、本研究で実施した共免疫沈降の実験では、LSD1 と LXR との間に明らかな相互作用は確認できなかった。

ヒト正常アストロサイトをを用いて、LSD1 阻害剤のコレステロール代謝に対する作用を確認したが、遺伝子発現の変化のパターンは概ね膠芽腫細胞と変わらなかった。但し、膠芽腫細胞と比べて正常アストロサイトではコレステロール合成系の遺伝子発現が強く誘導されており、LSD1 による細胞内コレステロールの消耗に対してより抵抗性を示す可能性がある。

(3) EGFR シグナルが活性化した膠芽腫細胞 GBM39 の通常培養において、B27 サプリメントが主なコレステロールの供給源と考えられるが、この B27 サプリメントを通常培養の 10 分の 1 量まで減量しても 10% 程度しか死滅しない。しかし、この細胞に LXR-623 を使用して細胞内のコレステロールを枯渇させると 80% 以上の細胞が死滅する。同様の実験を、LSD1 阻害剤 S2101 を使用して行うと、サプリメントの濃度が薄まるにつれて、細胞が死滅しやすくなることが分かった (図 2 上)。同様の結果は、DMEM 培地に 10% ウシ胎児血清 (FBS) を添加して培養する膠芽腫細胞 U87-EGFRvIII においても、血清濃度を薄くするにつれて、LSD1 阻害剤によって細胞が死滅しやすくなった (図 2 下)。現在、LSD1 阻害によって認めるこれらの細胞の死滅が、コレステロールや LDL の添加によって救済されるのかを確認している。

<引用文献>

Villa, G. R. et al., *Cancer Cell*, 2016.

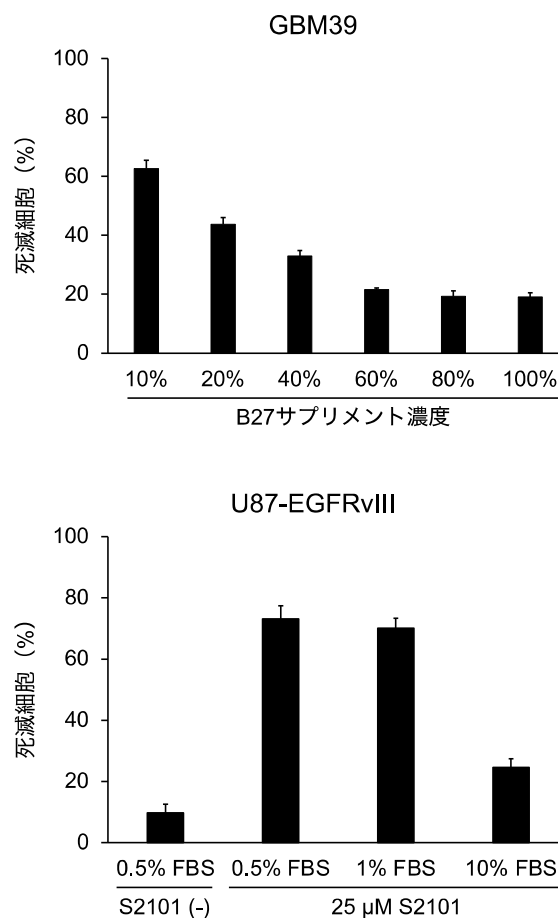


図2. 低濃度のサプリメントまたは血清下では膠芽腫細胞はLSD1阻害により死滅しやすくなる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------