

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07042

研究課題名(和文) 発がん初期に関わるヒストン修飾酵素の機能解明と創薬への基盤研究

研究課題名(英文) Functional elucidation and basic research for drug discovery of histone modification enzymes involved in early stages of carcinogenesis

研究代表者

長田 茂宏 (Osada, Shigehiro)

和歌山県立医科大学・薬学部・教授

研究者番号：40263305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がんは日本人の死亡原因第一位であり、新たな抗がん剤の開発および有効な利用法が課題とされている。そして、従来の抗がん剤に加え、がん細胞に特異的に発現しているタンパク質を標的とした分子標的薬が開発されている。DNAはヒストンタンパク質に巻き付いて存在し、その巻き付きを制御する酵素の異常はがんなどの疾患を導く。逆にその酵素の阻害剤は抗がん剤として役立つ可能性がある。

本研究においては、ヒストンメチル化酵素の阻害剤が肝がん治療に用いられているマルチキナーゼ阻害薬と併用することにより、肝がん細胞の増殖抑制効果を促進することを示した。また、その促進作用にはアポトーシスの促進が関わる可能性も示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、細胞増殖シグナルを抑制する分子標的薬とヒストン修飾酵素の阻害剤の併用によりがん細胞増殖抑制効果が促進されたことは、分子標的薬の新たな有効な利用方法と考えられる。このことは、既存の薬の有効な利用法の拡大につながる。一方で、促進されない組み合わせもあったことから、有効な組み合わせを見出すためには、個々の阻害剤が細胞内シグナルに与える影響を詳細に解析する必要があることが示された。

研究成果の概要(英文)：Cancer is still the leading cause of death in Japanese. The development and effective use of new anti-cancer drugs are required. In addition to conventional anti-cancer drugs, molecular-targeted drugs that target proteins specifically expressed in cancer cells has been developed. DNA is wrapped around histone proteins, and abnormalities in enzymes that regulate the wrapping of DNA lead to diseases such as cancer. Conversely, inhibitors of those enzymes could be useful as anticancer agents.

In this study, we showed that inhibitors of histone methyltransferases promote the growth inhibition of hepatocellular carcinoma cells when used in combination with multi-kinase inhibitors used in the treatment of liver cancer. We also showed that this effect may involve the promotion of apoptosis.

研究分野：生化学・分子生物学、生物系薬学

キーワード：ヒストン メチル化酵素 脱アセチル化酵素 エピジェネティクス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんは現在でも日本人の死亡原因第一位である。そのため、発がん、がん悪性化の分子機構の解明、新たな抗がん剤の開発および有効な利用法が課題とされている。

細胞分裂後の細胞や次世代に遺伝情報を伝える DNA は、細胞の核の中ではヒストンタンパク質に巻き付いたヌクレオソームを基本単位としたクロマチンに存在する。発がんおよびがんの悪性化は DNA の変異による遺伝子の異常だけではなく、エピジェネティクスの異常も関与する。エピジェネティクスは DNA の塩基配列変化を伴わない遺伝子機能制御のことであり、遺伝子発現制御も含み、DNA メチル化やヒストンタンパク質の化学修飾（メチル化、アセチル化など）などが関わる。

ヒストンタンパク質の化学修飾による制御には、修飾を書き入れるヒストンメチル化酵素、ヒストンアセチル化酵素、および修飾を取り除くヒストン脱メチル化酵素、ヒストン脱アセチル化酵素などに加えて、修飾を認識するタンパク質が含まれる。この制御はクロマチンからの遺伝子発現制御に関わることから、生命の機能維持に非常に重要である。このことは、その発現や機能の異常はがんを含めた様々な疾患に関わることを意味している。一方でその酵素阻害剤などの機能制御化合物は医薬品の候補化合物となり、実際にヒストン修飾酵素の阻害剤は抗がん剤として開発されている。

これまでに多くの抗がん剤が開発されその有用性が示されてきた。これまでの多くの抗がん剤は細胞を死滅もしくは増殖を抑制することによりその効果を示すため、増殖する正常細胞にも影響を与え、それが副作用として現れることが問題であった。近年、がん細胞に特異的に発現、機能しているタンパク質を標的とする分子標的治療薬が開発され、有効に活用されている。そして、さらなる効果的な利用法の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者らが肝化学がん発がん初期から発現上昇すること、がん細胞増殖促進に関わることを明らかにしたヒストンメチル化酵素の役割、機能発現経路の解析から、がんの悪性化の分子機構を解明すること、および関連するシグナル経路阻害との併用により、ヒストンメチル化酵素阻害剤を有効な利用に導くことを目的とする。

研究代表者らはラット肝化学がん過程において発現上昇するクロマチン関連因子を複数同定し、その機能解析を続けている。その因子の中にはヒストンタンパク質のアルギニン残基をメチル化する coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1)、リシン残基をメチル化する PR-Set7 が含まれる。CARM1 は転写因子として機能する核内受容体の転写共役因子として同定され、乳がん、前立腺がんなどで過剰発現しており、阻害剤の開発が進められている。

CARM1 には複数のスプライシングアイソフォームが存在するが、ヒトで主に発現しているアイソフォームはすべてのエキソンを含む CARM1.v1 およびエキソン 15 を欠く CARM1.v4 である。乳がん細胞において、これらのアイソフォームの発現や安定性の違いが示されているが、不明な点が多く残されている。悪性固形がんの内部の微小環境の特徴として、低酸素などが挙げられる。このような特徴的な環境においては低酸素特異的転写因子 hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) が機能する。HIF-1 サブユニットのひとつ HIF-1 $\alpha$  は通常酸素濃度条件下では速やかに分解されるが、低酸素濃度条件下では分解が抑えられて安定化され、低酸素依存的な転写活性化因子として機能する。このことから、HIF-1 $\alpha$  は低酸素環境の指標とされている。がん微小環境における CARM1 の役割を明らかにすることを目的に低酸素模倣条件下における CARM1 スプライシングアイソフォームの機能解析を行った。

発がんおよびがんの悪性化の研究において、細胞ががん化し、無秩序に増殖するしくみに加えて、血管等を通り、身体の内側に移動し塊を作る浸潤・転移のしくみの解明も重要である。そこで、転移性の異なる細胞を用いて CARM1 阻害剤の感受性を解析することにより、浸潤・転移に対する CARM1 の寄与を検討することも目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 低酸素模倣環境下における CARM1 の役割

通常酸素濃度条件下では、低酸素誘導性因子 HIF-1 $\alpha$  はプロテアソーム系により分解されるが、低酸素濃度条件下では、HIF-1 $\alpha$  が誘導されることにより、その環境に適応が可能になる。塩化コバルト添加により HIF-1 $\alpha$  が誘導されることから、この条件が低酸素模倣環境として用いられている。ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞に CARM1.v1 および CARM1.v4 を導入し、CARM1 スプライシングアイソフォームが細胞増殖に与える影響を検討した。

## (2) メチル化酵素阻害剤が肝がん由来細胞株の増殖に与える影響

ヒト肝がん由来細胞株については野生型 p53 を発現する HepG2 細胞および変異型 p53 を発現する HuH-7 細胞を用いて、CARM1 阻害剤が細胞増殖に与える影響を MTT アッセイにより検討した。また、肝がん治療の一次治療薬ソラフェニブ、レンバチニブ、二次治療薬レゴラフェニブなどが用いられている。ソラフェニブは細胞増殖シグナルに関わる正常型および変異型 Raf キナーゼ、c-KIT、血管内皮増殖因子受容体、血小板由来成長因子受容体などのチロシンキナーゼを阻害する分子標的治療薬である。CARM1 阻害剤の有効な利用法検討のために、キナーゼ阻害薬と CARM1 阻害剤の併用効果についてもあわせて検討した。

ヒストン H4 の 20 番目のリシン残基をメチル化する酵素 PR-Set7 の阻害剤が肝がん由来細胞株の増殖に与える影響を検討した。

## (3) ヒトメラノーマ細胞に CARM1 阻害剤が与える影響

悪性黒色腫メラノーマは他のがんと同様に転移能を持つ。そこで、低転移性細胞株 A375-C6 細胞と高転移性 A375-SM 細胞に対する CARM1 阻害剤感受性を MTT アッセイにより解析した。BRAF 遺伝子変異を有する悪性黒色腫に対し、BRAF 阻害薬ダブラフェニブが用いられ、MEK 阻害薬トラメチニブとの併用はより効果を示す。そこで、それらの薬剤に対する CARM1 阻害剤の併用効果も合わせて検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 低酸素模倣環境下における CARM1 の役割

HeLa 細胞に塩化コバルトを添加することにより HIF-1 $\alpha$  が誘導され、低酸素模倣状態が作製された。塩化コバルト感受性および HIF-1 $\alpha$  誘導について、CARM1 スプライシングアイソフォーム導入が影響を与える傾向が観察されたが、スプライシングアイソフォーム間の違いの有無についてはさらなる詳細な解析が必要である。

### (2) メチル化酵素阻害剤が肝がん由来細胞株の増殖に与える影響

#### ①アルギニン残基メチル化酵素 CARM1 阻害剤

CARM1 阻害剤は野生型 p53 を発現する HepG2 細胞および変異型 p53 を発現する HuH-7 細胞ともに増殖を抑制した。CARM1 阻害剤はソラフェニブの細胞増殖抑制効果を促進した。CARM1 阻害剤のソラフェニブに対する細胞増殖効果の促進は HepG2 細胞では弱く、肝がん由来細胞間で効果に違いが観察された。これらの細胞の違いのひとつとして、p53 の変異の有無があるが、CARM1 阻害剤感受性との違いについては今後の解析が必要である。

CARM1 はヒストンメチル化酵素として機能することから、ヒストン H3 の 17 番目、26 番目のアルギニン残基 (H3R17、H3R26) をメチル化する。ヒストンタンパク質に加えて、クロマチンリモデリング因子である switch/sucrose non-fermenting (SWI/SNF) ファミリーの BRG1-associated factor 155 (BAF155)、スプライシングに関わる因子や RNA 結合タンパク質をメチル化する。CARM1 阻害剤が増殖を阻害する濃度において、H3R17 メチル化状態にわずかに違いがあり、BAF155 のメチル化割合低下の方が顕著であった。

CARM1 阻害剤による細胞増殖抑制過程における細胞死の影響を解析するために poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)、カスパーゼの切断について調べた。CARM1 阻害剤添加により、切断型 PARP が検出されたことから、アポトーシスが関与する可能性が示された。分子標的治療薬であるソラフェニブは ERK リン酸化を抑制することにより、アポトーシスを誘導することが知られている。CARM1 阻害剤をソラフェニブと併用することにより、切断型 PARP が増加したことにより、併用によりアポトーシスの促進の可能性が考えられた。また、ソラフェニブと併用した際に切断型カスパーゼ 9 がわずかながら増加していたことから、上流のカスパーゼに影響を与えている可能性が考えられた。

#### ②リシン残基メチル化酵素 PR-SET7 阻害剤

がん細胞の特徴のひとつとして足場非依存的増殖能がある。正常細胞は足場がない状態においては細胞死が誘導され、増殖できないが、がん細胞は足場非依存的に増殖が可能である。この足場非依存的増殖はがん細胞の浸潤・転移に関係することから、通常の細胞増殖だけではなく、足場非依存的増殖能に与える影響を解析することも必要である。この足場非依存的増殖能は低接着培養により検討することが可能である。PR-SET7 阻害剤は肝がん細胞の増殖を濃度依存的に抑制したが、低接着培養に比べて、通常培養の方が低濃度で増殖抑制したことから、PR-SET7 阻害剤は足場非依存的増殖能には影響を与えないと考えられた。

PR-SET7 阻害剤がアポトーシス関連タンパク質の切断に与える影響を CARM1 阻害剤と同様に検討した。そして、PR-SET7 阻害剤についても切断型 PARP が検出されたことから、アポトーシスが関与する可能性が考えられた。また、ソラフェニブと併用より、切断型 PARP の増加が示され、併用によりアポトーシスが促進される可能性が考えられた。

### (3) ヒトメラノーマ細胞に CARM1 阻害剤が与える影響

CARM1 阻害剤は低転移性細胞株 A375-C6 細胞と高転移性 A375-SM 細胞に対し、肝がん細胞の増殖を阻害する濃度とほぼ同程度で増殖を阻害した。MEK 阻害薬トラメチニブの細胞増殖抑制効果を BRAF 阻害薬ダブラフェニブは促進し、両細胞において、併用効果が観察された。CARM1 阻害剤はトラメチニブの増殖抑制効果を促進しなかった。この傾向についても、低転移性、高転移性の両方の細胞において観察された。

上記解析により、がん細胞の増殖を抑制するヒストン修飾酵素の阻害剤が一部の分子標的治療薬の効果を促進することが示された。細胞増殖シグナルを抑制するマルチキナーゼ阻害薬は併用により効果が促進されることから、有効な利用方法の開発が進められている。本解析においても、ヒストン修飾酵素の阻害剤を分子標的治療薬と併用することにより、効果が促進される組み合わせが存在した。一方で、促進されない場合もあった。有効な組み合わせを見出すためには個々の阻害剤が細胞内シグナルに与える影響を詳細に解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長田茂宏, 澤田妙子, 菱田友昭, 今川正良
2. 発表標題 ヒストン脱アセチル化酵素HDAC9スプライシングアイソフォームとハンチンチン結合因子の相互作用
3. 学会等名 第95年会 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------