

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861284

研究課題名(和文)新規ヒストンメチル化修飾薬NCL1による前立腺癌治療法確立のための基礎的研究

研究課題名(英文) Analysis of effectiveness of NCL1, a highly selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, for prostate cancer

研究代表者

恵谷 俊紀 (ETANI, TOSHIKI)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30600754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、培養細胞および私たちが樹立した動物モデルを用いて、新規ヒストン脱メチル化酵素LSD1の阻害剤であるNCL1が前立腺癌の増殖を効率よく抑制することを見いだした。NCL1は、良好な抗腫瘍効果を示しており、また明らかな有害事象を認めなかった。また、癌細胞の生存にかかわる反応として注目されているオートファジーに着目し、LSD1阻害剤によるオートファジーの誘導を見出した。そして、培養細胞を用いた実験においてオートファジー阻害剤の併用がLSD1阻害剤の治療効果を増強することを示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated therapeutic potential of a novel histone lysine demethylase 1 (LSD1) inhibitor, NCL1, in prostate cancer. Prostate cancer cells, LNCaP, PC3 and PCa1 were treated with NCL1, and LSD1 expression and cell viability were assessed. Prostate cancer cells showed strong LSD1 expression, and cell viability was decreased by NCL1. NCL1 also induced G1 cell cycle arrest and apoptosis. In addition, autophagosomes and autolysosomes were induced by NCL1 treatment in LNCaP. Furthermore, LC3-II expression was significantly increased by NCL1 and chloroquine. In mice injected subcutaneously with PCa1 and intraperitoneally with NCL1, tumor volume was reduced with no adverse effects in NCL1-treated mice. Finally, LSD1 expression in human cancer specimens was significantly higher than that in normal prostate glands. NCL1 effectively suppressed prostate cancer growth without adverse events. We suggest that NCL1 is a potential therapeutic agent for hormone-resistant prostate cancer.

研究分野：医学

キーワード：エピジェネティクス ヒストン修飾 LSD1 前立腺癌 オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム情報を癌治療に用いる、遺伝子治療の分野は目覚ましい進歩を遂げている。中でもある特定の遺伝子をターゲットとした分子標的治療は、癌に特異的な遺伝子変異を標的にすることが多い。しかし、実際の癌で高率に変異を有する遺伝子数は少なく、一部の症例にしか適用できないという難点がある。

近年、遺伝子に変異を伴わない場合でも、発現に異常を認める、エピジェネティックな変化が解明されつつある。中でも、ヒストンタンパク質のエピジェネティックな変化であるメチル化は、発がん、細胞変性、老化などの病態発現に大きく関与していることから、これらの酵素を阻害する薬剤の機能解明が期待されている。しかし前立腺癌においては、エピジェネティックな遺伝子変化を標的とした治療薬は臨床応用されていない。

Lysine Specific Demethylase 1(LSD1)を代表とするヒストン脱メチル化酵素には、多くのアイソザイムが存在する。そのため、これらの酵素の機能解明や医薬品としての開発のためには、高いアイソザイム選択性を有する高活性な阻害剤の創製が必要となる。本学においてはこれまで、タンパク質データベースに登録されている X 線構造解析情報と分子モデリングによって得たタンパク質三次元構造に着目し、新たな LSD1 阻害剤である NCL1 を創製した。そして、低分子化合物 NCL1 は既存の阻害剤と比べて高い受容体選択性をもつことが確認できた。

前立腺癌治療の薬剤効果の検証を行うためにはモデル動物が必要となるが、前立腺癌の進展・転移メカニズムに関しては不明な点が多く、ヒトの病態をよく模倣した安定的に骨に転移を起こす動物モデルはほとんどない。私たちは、ラットのプロバシン遺伝子プロモーター下 PBSVT トランスジーンを SD 系ラットの受精卵に導入し、前立腺癌のモデルラットを確立した。そして、モデルラットから得られた癌組織を、去勢したヌードマウス皮下に移植し長期に継代することで、細胞株 PCai1 を樹立した。PCai1 は、ヌードマウスの前立腺への同所移植や尾静脈投与を行うことで、安定的に骨転移を起こすことも確認できた。

これらの成果を踏まえ本研究では、樹立した動物モデルを用いて、LSD1 を介した前立腺癌の増殖メカニズムを検証することで、新規治療薬 NCL1 を用いた分子標的治療の臨床応用に向けた基礎的研究を行う。

## 2. 研究の目的

前立腺癌に有効な遺伝子治療が存在しない理由として、標的となる有力な遺伝子変異が存在しないことがあげられる。近年、変異を伴わない場合でも標的となりうる、エピジェネティックな変化に基づく増殖メカニズムが解明されつつある。中でもヒストンタン

パク質のエピジェネティックな変化であるメチル化は、前立腺癌に関与していることから、メチル化変換酵素を阻害する、修飾薬の臨床応用が期待されている。本学薬学部で、エピジェネティクス修飾薬として世界初となる、細胞系でも作用する「ヒストン脱メチル化酵素の高選択的阻害剤 NCL1」が創製された。それらの成果に基づき、本研究では NCL1 を用いた遺伝子治療確立を目的とした基礎的研究を行う。

前立腺癌における LSD1 発現は、正常組織に比べて高く、予後と相関することが指摘されている。しかし、LSD1 阻害剤が生体に与える影響には未解明な部分が多い。私たちは、ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP を用いた研究で、NCL1 の細胞増殖抑制効果を確認した。そこで今回、樹立した動物モデルを用いて、LSD1 に着目した前立腺癌の増殖・進展・転移メカニズムの解析を行い、新たな分子標的治療法開発への足掛かりとする。

## 3. 研究の方法

本研究では、前立腺癌における LSD1 の制御機序を解明し、LSD1 の選択的阻害剤である NCL1 を中心とした治療法を確立することを目的としている。私たちはこれまでの研究で、NCL1 の前立腺癌細胞への増殖抑制効果を確認してきた。その成果を踏まえ、*in vivo* での NCL1 の有効性と安全性を検証し、その作用メカニズムの解明を目指す。そのため本研究では、以下の研究項目を設定した。

(1) 前立腺癌細胞株を用いた NCL1 の細胞増殖抑制効果の検証とメカニズム解明

(2) NCL1 を用いた LSD1 阻害による制癌作用ならびに生体に及ぼす影響を検証

(3) ヒト前立腺癌検体を用いた LSD1 タンパク発現の解析

これらについて、具体的には下記の研究項目で施行した。

研究 : 前立腺癌細胞株 LNCaP、PCai1、PC3 と、正常前立腺細胞株 PrEC を用いて、ウェスタンブロットにより LSD1 の発現を、WST アッセイにより細胞増殖に与える影響を検討した。

研究 : LNCaP を用いて、クロマチン免疫沈降により、増殖に関与する遺伝子のメチル化状態を検討した。また、LNCaP および PCai1 を用いて、ウェスタンブロットおよびフローサイトメトリーにより NCL1 の抗腫瘍効果のメカニズムを検討した。

研究 : LNCaP を用いて、透過型電子顕微鏡、ウェスタンブロット、WST アッセイ、蛍光免疫染色により、NCL1 によるオートファジー誘導を検討した。

研究 : PCai1 皮下移植モデルを用いて、NCL1 の腫瘍抑制効果および生体に及ぼす影響を検討した。6 週齢ヌードマウスの皮下に PCai1 を移植し、4 日後から NCL1 の腹腔内投与を開始した。NCL1 0.5mg/kg および 1.0mg/kg を週 2 回投与し、皮下移植から 9 週間後に sacrifice を行った。

研究 : ヒト前立腺全摘除術標本から作製した tissue microarray を用いて、正常前立腺組織および前立腺癌組織における LSD1 発現を免疫組織学的に検討した。

#### 4. 研究成果

研究 : ウェスタンブロットでは LSD1 はすべての前立腺癌細胞株において高い発現を認めた。WST アッセイでは NCL1 は濃度依存的に細胞増殖抑制効果を認めた。一方、PrEC では LSD1 の発現は癌細胞株に比べて弱く、細胞増殖抑制効果も軽度であった。

研究 : クロマチン免疫沈降では、NCL1 投与によって ELK4、KLK2 のプロモーター領域の H3K9 のメチル化亢進を認めた。ウェスタンブロットでは、LNCaP において、p21、p27、Cleaved caspase 3 の増加および ELK4、KLK2、Cyclin D1、CDK2、CDK4 の低下を認めた。さらにフローサイトメトリーでは、cell cycle arrest およびアポトーシスが誘導されていた。これらに対し、PCai1 において、ウェスタンブロットでは Cleaved caspase 3 の増加を認めたが、細胞周期関連蛋白の発現変化は認めなかった。フローサイトメトリーでは、アポトーシスを誘導していたが、cell cycle arrest の誘導は認めなかった。

研究 : LNCaP において、NCL1 投与により透過型電子顕微鏡像でオートファゴソームが認められ、ウェスタンブロットおよび蛍光免疫染色ではオートファジーのマーカーである LC3- の誘導が認められた。また、オートファジー阻害物質であるクロロキンと NCL1 の併用により、抗腫瘍効果が増強された。

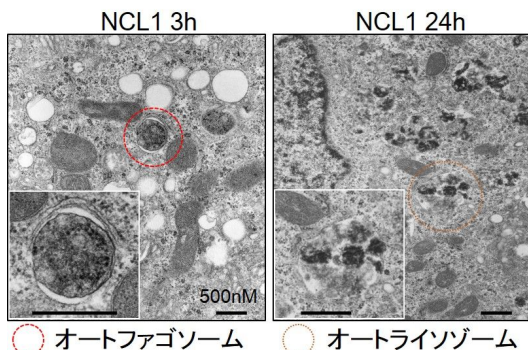


図1 NCL1投与によるオートファジーの誘導

研究 : NCL1 1.0mg/kg 投与群は有意に腫瘍体積が小さく、CD31 陽性腫瘍血管数の有意な減少と、アポトーシスの誘導を認めた。さらに、生体に対する NCL1 による有害事象は

認めなかった。

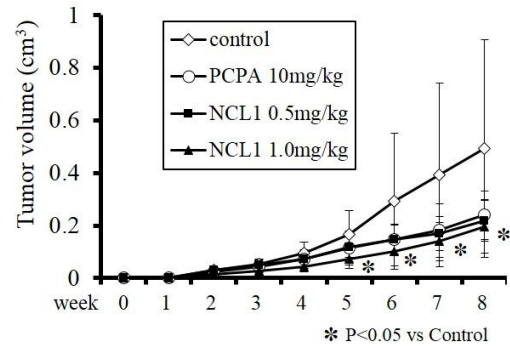


図2 皮下腫瘍の腫瘍体積

研究 : ヒト検体では、正常前立腺組織と比較し、前立腺癌組織における LSD1 の発現が有意に高かった。

#### 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 2 件)

1. Etani Toshiki, Suzuki Takayoshi, Naiki Taku, Naiki-Ito Aya, Ando Ryosuke, Iida Keitaro, Kawai Noriyasu, Tozawa Keiichi, Miyata Naoki, Kohri Kenjiro, Takahashi Satoru: NCL1, a highly selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, suppresses prostate cancer without adverse effect. *Oncotarget*, 6(5):2865-2878, 2015. 査読あり.  
DOI : 10.18632/oncotarget.3067
2. 惠谷 俊紀, 内木 拓, 安藤 亮介, 河合 憲康, 戸澤 啓一, 鈴木 孝禎, 郡健二郎, 高橋 智: 新規ヒストン脱メチル化酵素阻害剤 NCL1 の前立腺癌に対する抗腫瘍効果。泌尿器外科, 28(8), 1289-1292, 2015. 査読なし.  
DOI や URL : なし

[学会発表](計 11 件)

1. Toshiki Etani. Novel selective lysine specific demethylase 1 inhibitors and autophagy inhibitors effectively impair castration resistant prostate cancer growth. American Urological Association Annual Meeting 2016, 2016.5.6-10, San Diego (USA)
2. 惠谷 俊紀, 去勢抵抗性前立腺癌に対するヒストン脱メチル化酵素阻害剤の治療効果, 第 104 回日本泌尿器科学会総会, 2016.4.23-25, 仙台国際会館(宮城県仙台市)
3. Etani Toshiki, Taku Naiki, Iida Keitaro, Ryosuke Ando, Daichi Kobayashi, Noriyasu Kawai, Keiichi

- Tozawa, Takayoshi Suzuki, Satoru Takahashi, Kenjiro Kohri, Takahiro Yasui. NCL1, a selective lysine specific demethylase 1 inhibitors suppresses castration resistant prostate cancer growth. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015.10.8-10、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）
4. 惠谷 俊紀、内木 拓、飯田 啓太郎、安藤 亮介、河合 憲康、戸澤 啓一、鈴木 孝禎、高橋 智、安井 孝周、郡 健二郎：新規ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 の阻害剤 NCL1 による前立腺癌に対する抗腫瘍効果。第 158 回名古屋市立大学医学会例会、2015.6.15、名古屋市立大学（愛知県名古屋市）
  5. Etani Toshiki, Taku Naiki, Iida Keitaro, Ryosuke Ando, Daichi Kobayashi, Noriyasu Kawai, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri, Using the novel selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor NCL1 to impair prostate cancer growth. American Urological Association Annual Meeting 2015, 2015.5.15-19, New Orleans (USA)
  6. 惠谷 俊紀、内木 拓、飯田 啓太郎、小林 大地、安藤 亮介、河合 憲康、戸澤 啓一、林 祐太郎、鈴木 孝禎、郡 健二郎：新規ヒストン脱メチル化酵素阻害剤 NCL1 の前立腺癌への治療効果。第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015.4.18- 21、石川県立音楽堂 他（宮城県金沢市）
  7. 惠谷 俊紀、内木 拓、安藤 亮介、河合 憲康、戸澤 啓一、鈴木 孝禎、郡 健二郎、高橋 智：新規ヒストン脱メチル化酵素阻害剤 NCL1 の前立腺癌に対する抗腫瘍効果。第 24 回泌尿器科分子・細胞研究会、2015.2.28、JP タワーホール&カンファレンス（東京都千代田区）
  8. 惠谷 俊紀、内木 拓、安藤 亮介、河合 憲康、戸澤 啓一、鈴木 孝禎、郡 健二郎、高橋 智：新規ヒストン脱メチル化酵素阻害剤 NCL1 の前立腺癌に対する抗腫瘍効果、第 31 回前立腺シンポジウム、2014.12.12、東京コンファレンスセンター・品川（東京都港区）
  9. Etani Toshiki, Taku Naiki, Iida Keitaro, Ryosuke Ando, Daichi Kobayashi, Noriyasu Kawai, Keiichi Tozawa, Takayoshi Suzuki, Satoru Takahashi, Kenjiro Kohri, 新規ヒストン脱メチル化酵素阻害剤 NCL1 の前立腺癌に対する治療効果、第 73 回日本癌学会学術総会、2014.9.27、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
  10. Etani Toshiki, Taku Naiki, Iida Keitaro, Ryosuke Ando, Daichi Kobayashi, Kenji Yamada, Hironichi Naruyama, Katsuhiko Fukuta, Noriyasu

Kawai, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri Prostate cancer growth impairment by NCL1, a novel selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor. American Urological Association Annual Meeting 2014, 2014.5.16-21, Orlando (USA)

11. 惠谷 俊紀、内木 拓、安藤 亮介、河合 憲康、戸澤 啓一、佐々木 昌一、林 祐太郎、鈴木 孝禎、郡 健二郎：新規ヒストン脱メチル化酵素阻害剤を用いた前立腺癌治療法の確立に向けた基礎的研究。第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014.4.24-27、神戸国際会議場 他（兵庫県神戸市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

惠谷 俊紀 (ETANI Toshiki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科 研究員

研究者番号：30600754

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし