



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1478号
学位記番号	第1064号
氏名	惠谷 俊紀
授与年月日	平成 27年 3月 25日
学位論文の題名	<p>NCL1, a highly selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, suppresses prostate cancer without adverse effect (リジン特異的脱メチル化酵素 LSD1 に対する高選択的阻害剤 NCL1 は有害事象なく前立腺癌を抑制する)</p> <p>Oncotarget 2014, Accept for publication</p>
論文審査担当者	主査： 高橋 智 副査： 近藤 豊, 安井 孝周

## 論文内容の要旨

### 【背景と目的】

前立腺癌において近年、エピジェネティックな変化による増殖メカニズムが解明されつつある。中でも、ヒストン H3K9 を脱メチル化する Lysine specific demethylase 1 (LSD1) が、前立腺癌組織において強く発現することが報告されている。そこで本研究では、LSD1 に対する高選択的阻害剤である NCL1 の抗腫瘍効果およびそのメカニズムの解明を行った。

### 【対象と方法】

研究①：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②：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③：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④：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⑤：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。

### 【結果】

研究①：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②：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③：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-II 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。

研究④：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。

研究⑤：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。

**【結論】**

NCL1 による前立腺癌への抗腫瘍効果は、cell cycle arrest とアポトーシス誘導によることが証明された。さらに動物モデルを用いた解析により、NCL1 の安全性と、前立腺癌治療への有効性を確認した。NCL1 はオートファジーを誘導することから、その制御により抗腫瘍効果を増強する可能性も示された。ヒト前立腺癌組織で LSD1 の発現が高いことから、NCL1 は前立腺癌への新規治療法になりうると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

【目的】前立腺癌において近年、エピジェネティックな変化による増殖メカニズムが解明されつつある。その中でも、ヒストン H3K9 を脱メチル化する Lysine specific demethylase 1 (LSD1) が、前立腺癌組織において強く発現することが報告されている。本研究では、LSD1 に対する高選択的阻害剤である NCL1 の抗腫瘍効果およびそのメカニズムの解明を行った。

【対象と方法】研究①：前立腺癌細胞株 LNCaP（アンドロゲン感受性）、PCa1、PC3（アンドロゲン抵抗性）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②：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 PCa1 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③：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④：PCa1 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 PCa1 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⑤：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。

【結果】研究①：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②：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、PCa1 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③：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-II 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。研究④：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。研究⑤：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。

【結論】NCL1 による前立腺癌への抗腫瘍効果は、cell cycle arrest とアポトーシス誘導によることが証明された。さらに動物モデルを用いた解析により、NCL1 の安全性と、前立腺癌治療への有効性を確認した。NCL1 はオートファジーを誘導することから、その制御により抗腫瘍効果を増強する可能性も示された。ヒト前立腺癌組織で LSD1 の発現が高いことから、NCL1 は前立腺癌への新規治療法になりうると考えられる。

【審査内容】主査の高橋から、LSD1 阻害による有害事象について、形態的変化以外に機能的変化についてはどの程度検討しているか、NCL1 の Pharmacokinetics についてどこまでわかっているのかなど 10 項目、第一副査の近藤教授からは、LSD1 の標的として H3K9 を解析しているが H3K4 については検討しているのか、LSD1 阻害の結果、どのような遺伝子のエピゲノムを変化させることによってアポトーシス、オートファジー誘導を来したと考えているのかなど 12 項目、さらに第二副査の安井教授からは前立腺癌に罹患してから死に至るまでにどのような経過を辿るのか、今回用いた NCL1 を臨床応用につなげていくにはどのようにすれば良いかなどについての質問があった。これらの質問に対して申請者から適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に理解していると判断した。本研究は、高選択的 LSD1 阻害剤である NCL1 がアポトーシス、オートファジー誘導を介して前立腺癌の増殖抑制を惹起することを明らかにした。その際、有害事象はみられておらず、前立腺癌に対する新たな治療薬になりうる可能性を示した。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士（医学）の学位を授与するに相応しいと判定した。