



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1687号
学位記番号	第1204号
氏名	村嶋 明大
授与年月日	平成 31年 3月 25日
学位論文の題名	Identification of a Chemical Modulator of EZH2-mediated Silencing by Cell-based High-throughput Screening (細胞を用いた High-throughput Screening 法での EZH2 による遺伝子発現抑制を変調させる化合物の同定) Journal of Biochemistry, in press.
論文審査担当者	主査： 高橋 智 副査： 加藤 洋一, 村上 信五

論文内容の要旨

【背景・目的】

ヒストン修飾は遺伝子発現において重要な働きを持つ。EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) は、PRC2 (Polycomb repressive complex 2) の構成タンパクの一つであり、PRC2 は H3 lysine 27 (H3K27) をメチル化することで、クロマチンを凝集させ、遺伝子発現を抑制することが知られている。EZH2 は種々のがんで過剰発現しており、前立腺がん、乳がん、子宮がんや悪性黒色腫など多くのがんにおいて発現と予後の相関が報告されている。加えて、近年のシーケンス解析において、リンパ腫や骨髄悪性腫瘍において EZH2 の種々の変異が報告されている。特筆すべきことに、EZH2 の機能獲得型変異が B 細胞型リンパ腫において確認されており、H3K27 trimethylation (H3K27me3) のゲノムワイドの増加が確認されている。EZH2 はがんにおいて、悪性度に大きく影響する遺伝子と考えられている。

これらから EZH2 はがん治療の標的と考えられており、いくつかの特異的な阻害剤の開発が行われている。しかし、そのほとんどは EZH2 活性型変異を持つがんで効果が大きいことが報告されている。

EZH2 阻害剤の治療効果は腫瘍関連遺伝子の RNA レベルでの再活性化に依存するが、遺伝子全体での H3K27me3 の減少と細胞増殖抑制効果が必ずしも同時に観察されないことが報告されており、EZH2 は H3K27me3 とは別の系においても発現を抑制する可能性が示唆されている。今回我々は、H3K27me3 によって発現が抑制された遺伝子のプロモーター活性に着目し、H3K27me3 に修飾された遺伝子の発現を上昇させる化合物の同定を行い、新たな EZH2 に作用する薬剤の同定を行った。

【方法】

前立腺がん細胞株 PC3 細胞を用い、SEAP 配列を H3K27me3 の修飾で抑制された遺伝子・RAR β 2 のプロモーター領域に挿入し、プロモーター活性を定量することで測定する系を作成 (PC3-SEAP 株) した。PC3-SEAP 株を用い、high-throughput screening (HTS 法) により、329,049 の化合物による遺伝子発現の変化を定量し、NPD13668 を EZH2 の阻害剤の候補として同定した。また、その化合物による細胞の遺伝子発現の変化、ヒストン修飾の変化、メチルトランスフェラーゼ阻害作用を qPCR、マイクロアレイ、ChIP-PCR、western-blot 法を用い解析した。また、NPD13668 による増殖抑制効果を MTT assay にて定量した。

【結果】

NPD13668 は H3K27me3 によって発現が抑制されている遺伝子 (RAR β 2、TRIM36、ER α) の発現を上昇させ、また、ヒストン脱アセチル化阻害剤である TSA を加える事で、相乗的にこれらの遺伝子発現を上昇させることがわかった。このことから NPD13668 はエピゲノム機構に働く薬剤である可能性が示唆された。また、NPD13668 は ChIP-PCR において、H3K27me3 の脱メチル化を来すことが確認された。一方、DNA メチル化には作用していないことがわかった。Histone methyltransferase assay においてわずか (16.6%) ではあるが、メチルトランスフェラーゼを阻害することが確認された。

我々はマイクロアレイ法を用い、ゲノムワイドの発現変化を確認した。NPD13668 によって発現が上昇した遺伝子 (829 遺伝子) のうち約半数 (406 遺伝子) が、GSK126 で発現が上昇した遺伝子 (901 遺伝子) と一致することがわかった。また、これらの遺伝子のうち、NPD13668 で特に発現上昇が大きかった 15 遺伝子において、8 遺伝子で H3K27me3 の減少と遺伝子発現の

上昇が確認された。

GSK126 と比較し、NPD13668 は PC3、SKOV3 において強い細胞増殖抑制効果が確認され、LNCap では同等の細胞増殖抑制効果が確認された。また、細胞増殖抑制効果においても TSA と相乗的に作用することが確認された。Xenograft モデルマウスにおいても、腫瘍増殖抑制効果が確認され、免疫染色において H3K27me3 の低下が確認された。

【考察】

今回、我々は HTS 法を用い、新たな EZH2 を変調させる薬剤の可能性のある化合物、NPD13668 を発見した。NPD13668 は GSK126 と共通した遺伝子の発現を上昇させることから、EZH2/PRC2 活性を阻害することが示唆された。

NPD13668 の H3K27me3 を減少させるメカニズムとして①EZH2 の直接的阻害、②PRC2 の構成の阻害の可能性が示唆された。細胞増殖抑制のメカニズムとしては①EZH2 の減少による細胞老化、②H3K27me3 によって発現が抑制された遺伝子の発現上昇による細胞死が考えられた。

NPD13668 は他の EZH2 阻害剤と構造が大きく異なる。NPD13668 の薬理作用については更なる解析が必要であるが、NPD13668 及びその由来物がある種のがんにおいて有効な治療法になりうると考えられる。

論文審査の結果の要旨

【背景と目的】

EZH2(Enhancer of zeste homolog 2)は、種々のがんで過剰発現しており、前立腺がん、乳がんなど多くのがんにおいて発現と予後の相関が報告されている。そして、EZH2 は PRC2(Polycomb repressive complex 2)の構成タンパクの一つであり、PRC2 は H3 lysine 27(H3K27)をメチル化することでクロマチンを凝集させ、遺伝子発現を抑制することが知られている。これらのことから EZH2 はがん治療の有用な標的分子と考えられ、特異的な阻害剤の開発が行われている。GSK126、EPZ005687、EPZ-6438(tazemetostat)など種々の EZH2 特異的阻害剤が開発されているが、EZH2 活性型変異を持つ血液腫瘍で高い有効性が指摘されている一方で、EZH2 野生型の固形がんでは有効性が低いことが明らかになってきた。本研究は EZH2 野生型・過剰発現の固形がんにおいて有効な EZH2/PRC2 を阻害する薬剤を同定することを目的とした。

【方法及び結果】

SEAP アッセイを応用した High-throughput screening assay により 329,049 化合物をスクリーニングした結果、NPD13668 を薬効候補化合物として同定した。生化学的作用を qPCR 法、ChIP-PCR 法で確認し、NPD13668 は H3K27me3 により発現が抑制された遺伝子の発現を上昇させ、同時に標的遺伝子の H3K27me3 修飾低下をきたすことを確認した。メチルトランスフェラーゼアッセイでは NPD13668 の直接的な EZH2 阻害作用が確認され、Western blot において EZH2, SUZ12 など PRC2 構成タンパク質の発現低下が確認された。

マイクロアレイにてゲノムワイドな発現変化を観察したところ、NPD13668 で発現が上昇した遺伝子の約半数が、GSK126 でも発現が上昇していた。また、NPD13668 投与後に発現増加が特に大きかった遺伝子は H3K27me3 の修飾も有意に低下していた。

細胞株を用いた MTT アッセイでは、一部の細胞株において NPD13668 により細胞増殖抑制効果を認めた。PC3 細胞で皮下腫瘍を作成した xenograft を用いた治療実験では、NPD13668 治療マウスにおいて腫瘍増殖抑制効果および腫瘍部の H3K27me3 の減少を確認した。

【考察】

NPD13668 の H3K27me3 を減少させるメカニズムとして、①EZH2 の直接的阻害、②PRC2 構成阻害の二つの可能性が示唆された。細胞増殖抑制のメカニズムとしては、①EZH2 の発現低下による細胞老化、②H3K27me3 によって発現が抑制されたがん抑制遺伝子の発現回復による細胞死が考えられる。

【結語】

High-throughput screening により H3K27me3 を減少させる新たな化合物を同定した。詳細な機序については更なる研究が必要であるが、NPD13668 が EZH2/PRC2 機能を変化させる物質として、一部の固形がんにおいて有効な薬剤となりうることを示唆された。

【審査の内容】

主査の高橋教授より 1)Fig.1a の数値の確認、2)候補物質 N41 が検討対象から除外された理由、3)NPD13668 の EZH2/PRC2 阻害活性に対する IC50、4)NPD13668 の特異性など計 12 項目の質問があった。次いで第一副査の加藤教授より 1)H3K27me3 による転写抑制のメカニズムについて、2)H3K27me3 以外に転写を抑制するヒストン修飾について、3)EZH2 特異的阻害剤である GSK126 は、なぜ EZH2 野生型、過剰発現の癌細胞の増殖を抑制できないのか、4)スクリーニングのレポーターに RAR β 2 遺伝子を選んだ理由など計 7 項目の質問がされた。第二副査の村上教授より 1)頭頸部癌治療における Epigenome 的アプローチの可能性について、2)頭頸部癌治療におけるプレジジョン医療とは、3)頭頸部癌治療の将来展望など計 4 項目の質問があった。

これらの質問に対し、概ね適切な回答が得られた事から、申請者は学位論文の内容を十分に理解し、また大学院修了者として十分な学力を備えていると判断した。本研究は EZH2/PRC2、H3K27me3 を標的とした新たな薬剤を同定した研究であり、医学的にも高く評価される。よって本論文の筆頭著者は、博士(医学)の学位を授与するのに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 高橋 智

副査 加藤洋一、村上信五