

Title	尿路上皮癌におけるEZH2制御による抗腫瘍効果の検討
Sub Title	Antitumor effect by regulation of EZH2 on urothelial carcinoma
Author	早川, 望(Hayakawa, Nozomi) 菊地, 栄次(Kikuchi, Eiji) 宮嶋, 哲(Miyajima, Akira) 大家, 基嗣(Oya, Mototsugu)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>EZH2の選択的メチル化抑制阻害剤であるGSK126を用いて直接的な抗腫瘍効果の検討を行った。ウエスタンブロット法にて、ヒト膀胱癌細胞株(UMUC3, KU19-19, T24, 5637)におけるEZH2の発現は確認できたが、GSK126投与後のH3K27me3発現の変化は認められなかった。さらにWSTアッセイでは濃度・時間依存ともにGSK126の有効な殺細胞効果は認められなかった。EZH2抑制と免疫チェックポイント阻害との相乗効果が検討されているが、上部尿路上皮癌検体においてPD-1発現を検討したところ、腫瘍内部のPD-1強陽性が独立して上部尿路上皮癌死と関連していた。</p> <p>We examined direct antitumor effect for urothelial carcinoma by using GSK126, which is an inhibitor of selective methylation of EZH2. Expression of EZH2 could be confirmed in human bladder cancer cell lines (UMUC3, KU19-19, T24, 5637) by the Western blotting method, whereas expression of H3K27me3 after administration of GSK126 in vitro was no change in the expression level compared with the control. Furthermore, we examined the effect of GSK on cell growth by WST assay, and no effective decrease of cell viability in either concentration dependence or time dependence. Recently, a synergistic effect between inhibition of EZH2 and immuncheckpoint inhibitor has been studied. We examined the role of PD-1 expression on the clinical outcome of upper tract urothelial carcinoma. PD-1 positivity in the tumor inside could be a strong predictor for a worse clinical outcome.</p>
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2015～2016 課題番号：15K20112 研究分野：泌尿器悪性腫瘍
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K20112seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20112

研究課題名(和文)尿路上皮癌におけるEZH2制御による抗腫瘍効果の検討

研究課題名(英文)Antitumor effect by regulation of EZH2 on urothelial carcinoma

研究代表者

早川 望(HAYAKAWA, NOZOMI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究院

研究者番号：10528441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：EZH2の選択的メチル化抑制阻害剤であるGSK126を用いて直接的な抗腫瘍効果の検討を行った。ウエスタンブロット法にて、ヒト膀胱癌細胞株(UMUC3、KU19-19、T24、5637)におけるEZH2の発現は確認できたが、GSK126投与後のH3K27me3発現の変化は認められなかった。さらにWSTアッセイでは濃度・時間依存ともにGSK126の有効な殺細胞効果は認められなかった。EZH2抑制と免疫チェックポイント阻害との相乗効果が検討されているが、上部尿路上皮癌検体においてPD-1発現を検討したところ、腫瘍内部のPD-1強陽性が独立して上部尿路上皮癌死と関連していた。

研究成果の概要(英文)：We examined direct antitumor effect for urothelial carcinoma by using GSK126, which is an inhibitor of selective methylation of EZH2. Expression of EZH2 could be confirmed in human bladder cancer cell lines (UMUC3, KU19-19, T24, 5637) by the Western blotting method, whereas expression of H3K27me3 after administration of GSK126 in vitro was no change in the expression level compared with the control. Furthermore, we examined the effect of GSK on cell growth by WST assay, and no effective decrease of cell viability in either concentration dependence or time dependence. Recently, a synergistic effect between inhibition of EZH2 and immunocheckpoint inhibitor has been studied. We examined the role of PD-1 expression on the clinical outcome of upper tract urothelial carcinoma. PD-1 positivity in the tumor inside could be a strong predictor for a worse clinical outcome.

研究分野：泌尿器悪性腫瘍

キーワード：EZH2 尿路上皮癌 H3K27me3 PD-1

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞の癌化の機序の一つとして、エピジェネティクス制御機構が注目されているが、EZH2 はポリコームタンパク質と呼ばれる遺伝子発現調節タンパク質複合体の一員としてこのエピジェネティックな遺伝子発現調節に関与している。EZH2 gene は、PcG タンパク質複合体を構成し、H3K27 をメチル化することにより負の遺伝子制御に関与する。正常細胞では EZH2 が microRNA による発現抑制を受け、癌細胞ではその microRNA コード領域の欠失と EZH2 の高発現化が相関していることが示されている。膀胱癌において EZH2 の発現が増強されているとの報告¹⁾はあるが、EZH2 の発現調節機構については依然として十分に解明されていない。

(2) 近年 EZH2 は H3K27me3 を介して IFN 誘導性ケモカインである CXCL9 および CXCL10 を抑制し、結果としてヘルパー T 細胞の腫瘍内への浸潤を制限していることが報告されている。²⁾ さらに EZH2 を抑制することで腫瘍内へのヘルパー T 細胞の浸潤を増進することから、免疫チェックポイント阻害剤の効果を促進する可能性が示唆されている。免疫チェックポイント阻害剤の中でも特に抗 PD-1/PD-L1 抗体は、尿路上皮癌の新規治療薬としてその有用性が期待されている。今回上部尿路上皮癌における PD-1 の研究も同時に行った。

2. 研究の目的

(1) 当教室では以前より前立腺癌および尿路上皮癌における H3K27me3 および EZH2 発現の研究を行っている。尿路上皮癌においては、腎尿管全摘術を施行した 173 例を後方視的に解析した結果、EZH2 と H3K27me3 の正の相関および EZH2 の高発現が 5 年非再発率および癌特異的生存率において独立した負の予測因子であることを認めた。今回 EZH2 の選択的メチル化抑制阻害剤である GSK126 (図 1) を用いて抗腫瘍効果の検討を行った。

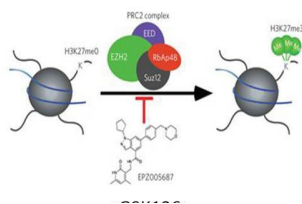


図 1 GSK126 による EZH2 の選択的ヒストンメチル化酵素阻害.

(2) 過去 20 年間に当院で上部尿路上皮癌に対して腎尿管全摘術を施行した 181 例を対象に切除検体の PD-1 発現を免疫染色法にて評価し、PD-1 発現の臨床的役割につき検討した。

3. 研究の方法

(1)

ヒト膀胱癌細胞株における EZH2 発現の確認

当教室で保有してあるヒト膀胱癌細胞株 (UMUC3、KU19-19、T24、5637) を用いた Western blotting 法にて、膀胱癌における EZH2 発現の有無を確認する。

選択的ヒストンメチル化酵素阻害剤である GSK126 のヒト膀胱癌細胞株での殺細胞効果についての検討

GSK126 投与後の cell viability 及び細胞数の変化を WST assay 法とセルカウンターを用いて確認する。GSK126 投与量に濃度勾配をつけ、暴露時間も 24 時間から 96 時間まで確認する。

同様に細胞浸潤活性抑制効果の検討

マトリゲルインベージョンチャンバーを用いた 24 時間 invasion assay にて、GSK126 の細胞浸潤活性抑制効果を確認する。

GSK126 による EZH2 発現抑制の確認
Western blotting 法にて、GSK126 投与に伴う H3K27me3 発現の有無を確認する。

(2)

上部尿路上皮癌における PD-1 の検討

上部尿路癌の腎尿管全摘検体を用いて抗 PD-1 抗体 (AF1086, 1:40: R&D System Inc) を使用し免疫染色法にて後方視的に PD-1 の発現を評価する。腫瘍内部と腫瘍辺縁に分けて検討し、高発現・低発現群に分類した。

4. 研究成果

(1)

Western blotting 法にて、当教室で保有してあるヒト膀胱癌細胞株 (UMUC3、KU19-19、T24、5637) での EZH2 の発現を確認した (図 2)。結果、すべての細胞株にて EZH2 の発現を確認することができたが、特に KU19-19 および 5637 で発現が強いことが分かった。よってこの 2 つの細胞株が GSK126 を用いた抗腫瘍効果確認のための実験候補であると考えられた。

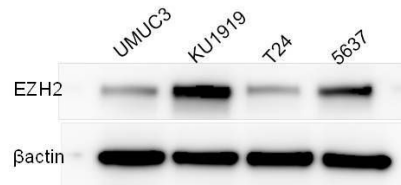
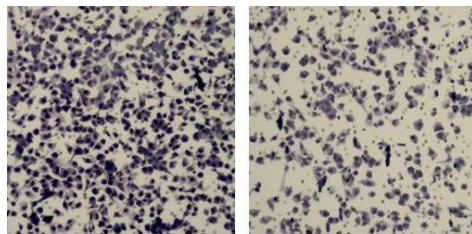


図 2 Western blotting 法による EZH2 発現の確認

次に、上記 4 種のヒト膀胱癌細胞株において WST assay 法とセルカウンターによる細胞数変化を確認することで、GSK126 の殺細胞効果を確認した。結果、すべての細胞株において濃度依存および時間依存のいずれも、有効な殺細胞効果は認められなかった。

同様にマトリゲルインページョンチャンバーを用いた24時間 invasion assay を上記4種のヒト膀胱癌細胞株を用いて施行した。UMUC3にて invasion 抑制の傾向を認めたが(図3)、その他の細胞株においては明らかな invasion の抑制は確認されなかった。



control群 GSK126投与群

図3 UMUCも用い24時間 invasion assay

ESH2 を強発現しているヒト膀胱癌細胞株 KU1919 および 5637 において、invitro に GSK126 投与した後、H3K27me3 の発現を再度 Western blotting 法で確認したが、control 群と比して発現量の変化は認められなかった。

(2)

133 例の上部尿路癌検体で、発現の高低を評価した(図4)。

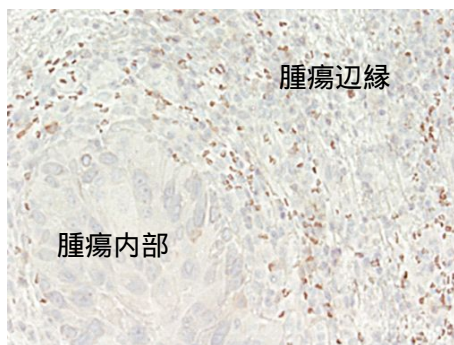


図4 PD-1 抗体の発現：

辺縁は高発現、内部は低発現

腫瘍内部、辺縁ともに PD-1 の高発現群にておいて、低発現群に比して有意に予後が悪いことがわかった。(図5,6) さらに腫瘍内部の PD-1 強陽性が壁内脈管侵襲陽性とともに独立して上部尿路上皮癌死と関連していることが分かった。

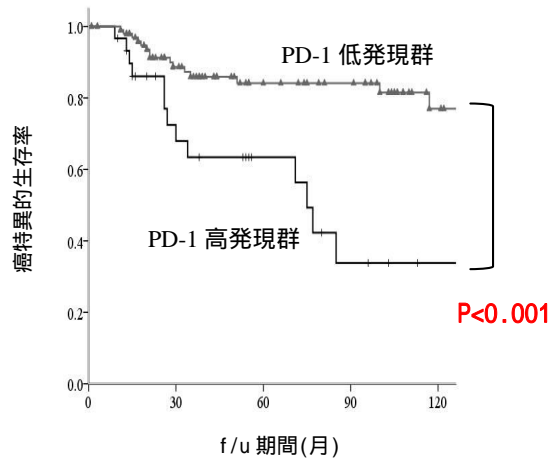


図5 腫瘍内部における PD-1 発現の違いによる癌特異的生存率の比較

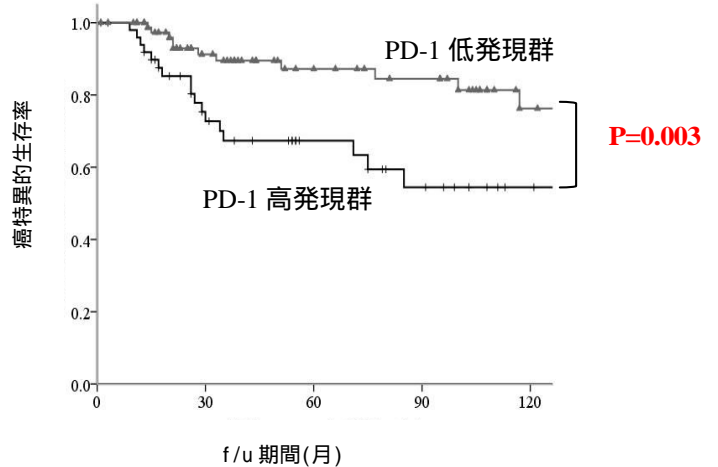


図6 腫瘍辺縁における PD-1 発現の違いによる癌特異的生存率の比較

引用文献

- 1) Raman JD et al. Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder. Clin Cancer Res. 2005 Dec 15;11(24 Pt 1):8570-6.
- 2) Peng D et al. Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. Nature. 2015 Nov 12;527(7577):249-53.

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)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者：早川望

発表標題：Prognostic role of programmed cell death protein 1 expression in

surgically treated patients with upper tract urothelial carcinoma.

学会名：American Urological Association Annual

発表年月日：2016年5月6日から5月10日

発表場所：San Diego Convention Center

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 望 (HAYAKAWA Nozomi)

慶應義塾大学・医学部・助手

研究者番号：10528441

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

菊地 栄次 (KIKUCHI Eiji)

慶應義塾大学・医学部・講師

宮嶋 哲 (MIYAJIMA Akira)

慶應義塾大学・医学部・准教授

大家 基嗣 (OYA Mototsugu)

慶應義塾大学・医学部・教授