

論 文 内 容 要 旨

Chemical inhibition of LSD1 leads to epithelial to mesenchymal transition *in vitro* of an oral squamous cell carcinoma OM-1 cell line *via* release from LSD1-dependent suppression of *ZEB1*

(口腔扁平上皮癌 OM-1 での化学的 LSD1 阻害は LSD1 依存的 *ZEB1* 遺伝子抑制を解放し EMT を引き起こす)

Biochemical and Biophysical Research Communications,
647: 23-29, 2023.

主指導教員：相川 友直 教授

(医系科学研究科 口腔外科学)

副指導教員：柳本 惣市 教授

(医系科学研究科 口腔腫瘍制御学)

副指導教員：太田 耕司 教授

(医系科学研究科 公衆口腔保健学)

山門 奈央

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

次世代シーケンスを用いたクロマチン構造の解析法の一般化に伴い、エピジェネティックな制御が遺伝子発現プロファイルの多様性を生むことで様々な細胞の可塑性を理由づけることが理解できるようになってきた。口腔扁平上皮がん (SCC) は、重層扁平上皮分化と上皮間葉転換 (EMT)の双方向の細胞運命決定において可塑性を示す。ヒストン H3 特異的脱メチル化酵素 LSD1 は、クロマチンのヒストン修飾によりエピジェネティックな遺伝子発現プロファイルを変更し、腫瘍の悪性化に関与することが知られてきた。このため LSD1 に対する化学阻害剤が新たな抗がん剤として期待されている。申請者の研究チームは舌癌由来 SCC 細胞株 OM-1 の双方向の可塑性を *in vitro* で解析してきた。EMT のマスター転写因子 (EMT-TF) の 1 つである Snail は上皮形質を維持する OM-1 を間葉形質へ変換する。Snail が標的とする上皮細胞間結合接着分子の発現抑制は、クロマチン上で Snail と LSD1 が会合し標的遺伝子のヒストン修飾を間葉型へと変換することで成される。したがって LSD1 阻害剤は EMT に対し抑制的に働くことが期待された。ところが本研究では、予想外に LSD1 阻害剤単独処理が OM-1 に EMT を誘導することを見出し、その分子機序について解析した。

まず OM-1 に化学的 LSD1 阻害剤 tranilcypromine (TCP) を添加し培養したところ、細胞間接着を解除し単細胞で遊走する細胞群が出現することを見出した。驚いたことに、この細胞群は蛍光免疫細胞染色法にて Vimentin の発現が観察され TCP が EMT を誘導していた。別 LSD1 阻害剤 GSK-LSD1 を用いても同様の結果が得られたため、LSD1 は OM-1 の上皮形質維持に働きその活性阻害が EMT を誘導することが示された。OM-1 では LSD1 阻害により上皮マーカーの発現増強上昇と併せて、EMT-TF の 1 つである *ZEB1* の強い発現が誘導されていた。OM-1 に外因性 *Snail* を導入した pEMT OM-1^{Snail} 細胞は、E-cadherin と Vimentin の両方の発現を伴う partial EMT 表現型を維持した。pEMT OM-1^{Snail} への LSD1 阻害では、OM-1 と同様に、強い *ZEB1* の発現誘導が起きた一方、上皮マーカーの発現増強も示した。pEMT OM-1^{Snail} 細胞は常に Vimentin を発現するが間葉系細胞骨格は形成せず、E-cadherin は細胞間接着を維持していた。LSD1 阻害による *ZEB1* 発現誘導下、Vimentin は細胞骨格を形成し partial EMT は完全な EMT へと転換した。したがって、LSD1 阻害は Snail-LSD1 による上皮形質抑制を解除する一方、これと逆行した間葉形質への移行を *ZEB1* 誘導で制御することが示唆された。次に、LSD1 阻害剤による *ZEB1* の転写制御機構を検証した。申請者はヒト *ZEB1* には異なるプロモーター領域がタンデムに配置されることをゲノム配列解析より見出し、これらプロモーターのルシフェラーゼレポーターを構築した。いずれのレポーター活性も、LSD1 阻害剤に応答し容量依存的に上昇した結果から、LSD1 が *ZEB1* の転写を制御するクロマチン領域に集積し *ZEB1* を抑制していることが予測された。そこで ChIP-qPCR 法にて LSD1 が特定の *ZEB1* 転写制御クロマチン領域上配列と共免疫沈降するかを検討した。

その結果, OM-1 と pEMT OM-1^{Snai1} の両方において, *ZEB1* プロモーター2 領域中, LSD1 阻害剤によって抗 LSD1 抗体での共免疫沈降が減弱される領域が明らかとなった. 最後に抗 H3K4me2 抗体を用いて ChIP-qPCR を行い, *ZEB1* クロマチン領域周辺のヒストン修飾マークの LSD1 阻害剤による変化を検討した. OM-1, pEMT OM-1^{Snai1} の両方において, *ZEB1* プロモーター2 領域中, LSD1 阻害剤によって抗 LSD1 抗体での共免疫沈降が増強される領域が明らかとなった.

以上の結果より, LSD1 は *ZEB1* の転写を抑制し, LSD1 の化学的阻害は *ZEB1* クロマチン構造を変化させることで *ZEB1* の発現を誘導し EMT が誘導されることが示された.

この作用は上皮形質誘導に代表される LSD1 阻害剤の抗がん剤として期待されている作用とは, 全く反対の作用である. 本研究は口腔がん治療への LSD1 阻害剤適用において, 考慮すべき重要な反作用を世界に先駆け報告した.