

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)	氏名	山門 奈央
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Chemical inhibition of LSD1 leads to epithelial to mesenchymal transition <i>in vitro</i> of an oral squamous cell carcinoma OM-1 cell line <i>via</i> release from LSD1-dependent suppression of <i>ZEB1</i> (口腔扁平上皮癌 OM-1 での化学的 LSD1 阻害は LSD1 依存的 <i>ZEB1</i> 遺伝子抑制を解放し EMT を引き起こす)			
論文審査担当者			
主査	教授 宮内 睦美	印	
審査委員	教授 柴 秀樹		
審査委員	講師 重石 英生		
〔論文審査の結果の要旨〕			
諸言 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 <i>in vitro</i> 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 <i>Snail</i> は上皮形質を維持する OM-1 を間葉形質へ変換する. <i>Snail</i> 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 <i>Snail</i> 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. 本研究では LSD1 阻害剤単独処理が OM-1 に EMT を誘導することを発見し, その分子機序について解析した.			
結果 1: OM-1 細胞, pEMT OM-1 ^{<i>Snail</i>} に対する LSD1 阻害剤の影響 OM-1 細胞へ LSD1 阻害剤 tranilcyproline (TCP) を添加培養し, Wound healing assay を行なったところ, 細胞間接着を解除し単細胞で遊走する細胞群を確認できた. 遺伝子プロファイル解析にて上皮前駆細胞マーカーの発現増強を認め, 一方で EMT マスター転写因子である <i>ZEB1</i> が濃度依存的に発現増強した. 蛍光免疫染色法にて <i>ZEB1</i> と Vimentin を共染色すると, <i>ZEB1</i> 陽性細胞のほとんどで Vimentin 陽性であることが確認できた. また, OM-1 細胞へ <i>Snail</i> を形質導入した pEMT OM-1 ^{<i>Snail</i>} 細胞において LSD1 阻害剤を添加培養すると, OM-1 同様に上皮前駆細胞マーカーの発現増強を認めた. <i>Snail</i> 依存的な Vimentin の発現は抑制されず, 強い <i>ZEB1</i> の誘導が認められた. 蛍光免疫染色法にて遺伝子発現同様, LSD1 阻害剤添加により pEMT OM-1 ^{<i>Snail</i>} 細胞は <i>ZEB1</i> を発現し, 同時に繊維状の assembled Vimentin が出現し, EMT へと進行することが判明した.			
結果 2: <i>ZEB1</i> knockdown による <i>ZEB1</i> の EMT 形質獲得への関与の検証 これまでの結果より, LSD1 阻害剤による <i>ZEB1</i> 発現誘導が EMT 形質の獲得に関与することが示唆されたため, <i>ZEB1</i> knockdown により関与を検証した. LSD1 阻害剤を添加すると, OM-1 において Vimentin 発現が誘導された. これは LSD1 阻害剤により出現した <i>ZEB1</i> によるものと考え knockdown したところ, Vimentin 誘導は抑制された.			
結果 3: <i>ZEB1</i> 遺伝子上流の LSD1 結合領域の検証 LSD1 が <i>ZEB1</i> プロモータ領域に結合し, 脱メチル化を起こすことで <i>ZEB1</i> 遺伝子発			

現を抑制するという仮説を立て、*ZEB1* 遺伝子上流に *LSD1* 結合領域が 2 領域あることを次世代シーケンスの統合データベースより見出し、その配列を制限酵素で 2 つに切断し 5'プロモーター、3'プロモーターレポータープラスミドを作成した。ルシフェラーゼレポーターアッセイにて両プロモーター共に *LSD1* 阻害剤にて濃度依存的にプロモーター活性の上昇を認め、*LSD1* が *ZEB1* 遺伝子の転写を直接的に抑制していると考えられた。

結果 4 : ChIP-qPCR 法による特定の *ZEB1* 転写制御クロマチン領域上配列と *LSD1* が共免疫沈降するかの検証

ヒストン H3K4 のメチル化を *LSD1* 阻害剤の有無で解析したデータセットを検索したところ、*LSD1* 阻害剤存在下で *LSD1* の集積が解除される領域の特定ができ、さらにその周囲のジメチル化 H3K4 が *LSD1* 阻害剤存在下で回復する領域が特定できた。これを指標として、*LSD1* 阻害剤により *LSD1* 集積が解除される領域、およびジメチル化 H3K4 が集積する領域を予測し、*ZEB1* 転写開始点付近にプライマーを設計した。OM-1 と pEMT OM-1^{Snail} の両細胞において、*ZEB1* プロモーター領域中 *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。抗 H3K4me2 抗体での共免疫沈降が増強される領域も明らかとなり、*LSD1* 阻害により *ZEB1* プロモーターの特定領域での *LSD1* の集積は失われ、周辺の H3K4me2 が集積していることが判明した。

考察と結語

舌癌由来 SCC 細胞株 OM-1 において化学的 *LSD1* 阻害剤は *ZEB1* 誘導を介して EMT を遂行することが判明した。*LSD1* は *ZEB1* 5', 3' プロモーター周辺に結合し、その周囲ヒストンを脱メチル化し *ZEB1* 遺伝子を不活性化していることが示唆された。また、*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り、本研究は口腔がん治療への *LSD1* 阻害剤適応において、考慮すべき重要な反作用を報告した。

以上の結果から、本論文は舌癌由来 SCC 細胞株 OM-1 を用いて、*LSD1* 阻害剤の EMT 誘導の分子機を詳細に検討したものである。論文内に示されたデータは結論を導くために十分であると考えられた。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。