

博士論文

高異型度卵巣漿液性癌における SMYD2 の機能解析および
SMYD2 選択的阻害剤の治療効果の検討

久 木 田 麻 子

目次

目次	2
要旨	3
目的	24
方法	25
結果	33
考察	49
謝辭	55
引用文献	56

要旨

本研究では、リシンメチル化酵素 SMYD2 が PARP1 の 528 番目のリシン基をメチル化して PARP1 活性を増加させることにより PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase) 阻害剤 (オラパリブ) による合成致死の誘導を減弱させる可能性に着目し、高異型度卵巣漿液性癌 (HGSOC) において、SMYD2 が新規治療戦略になり得るか検証した。

HGSOC 臨床検体において、SMYD2 の有意な発現亢進が認められ、HGSOC 細胞において、SMYD2 の抑制により細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導が認められた。

HGSOC 細胞に対する SMYD2 選択的阻害剤 (LLY-507) の単剤療法にて抗腫瘍効果が認められ、LLY-507 とオラパリブの併用療法にて相加効果が認められ、SMYD2 が新規治療戦略になり得る可能性が示唆された。

序文

卵巣癌の疫学

卵巣癌は、全世界において、年間 239,000 人の新規症例数（全てのがん症例の 3.6%）、年間 152,000 人の死亡人数（全てのがん死亡の 4.3%）であり、女性における世界の 7 番目に多い悪性腫瘍、8 番目の死因である [1]。卵巣癌は、初期に発見、診断に至った場合は治癒が可能であるが、初期には自覚症状が乏しい [2, 3]。米・英における卵巣癌患者の約 75%は stage III/IV で診断され、5 年生存率は 47%である [4]。本邦では、40%以上が stage III/IV 期で診断され [5]、2009-2011 年に診断された卵巣癌の 5 年生存率は 60% [6]、2011 年初回治療例の 5 年生存率は III 期が 48.2、IV 期が 30.5%であった [7]。卵巣癌の罹患者数は 10,438 人 (2015 年)、死亡者数は 4,784 人 (2018 年) であり、罹患者数、死亡率ともに漸増傾向にある [6] (図 1, 2)。

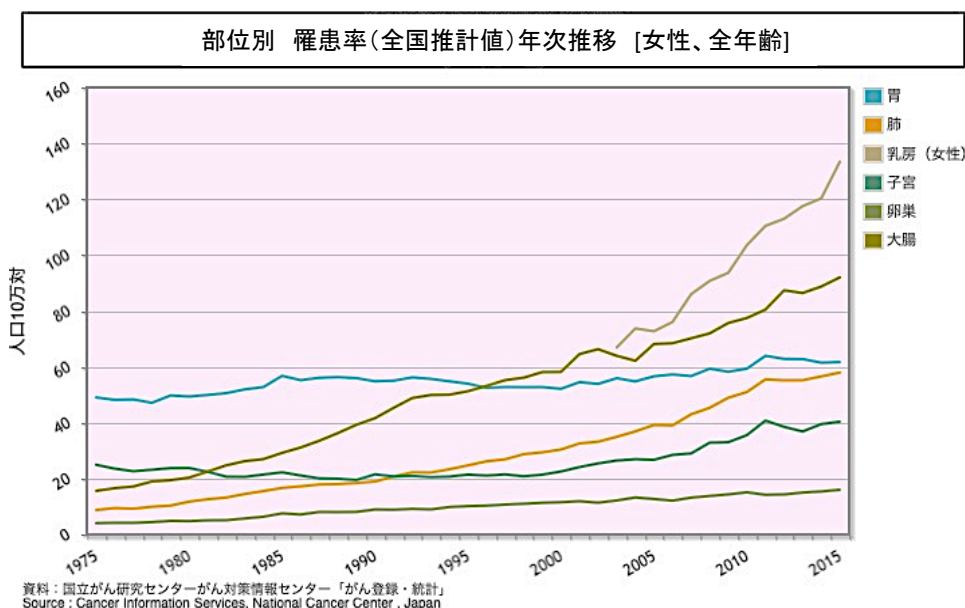


図 1) 人口 10 万人当たりの部位別罹患者数の年次推移

部位別 死亡率(全国推計値)年次推移 [女性、全年齢]

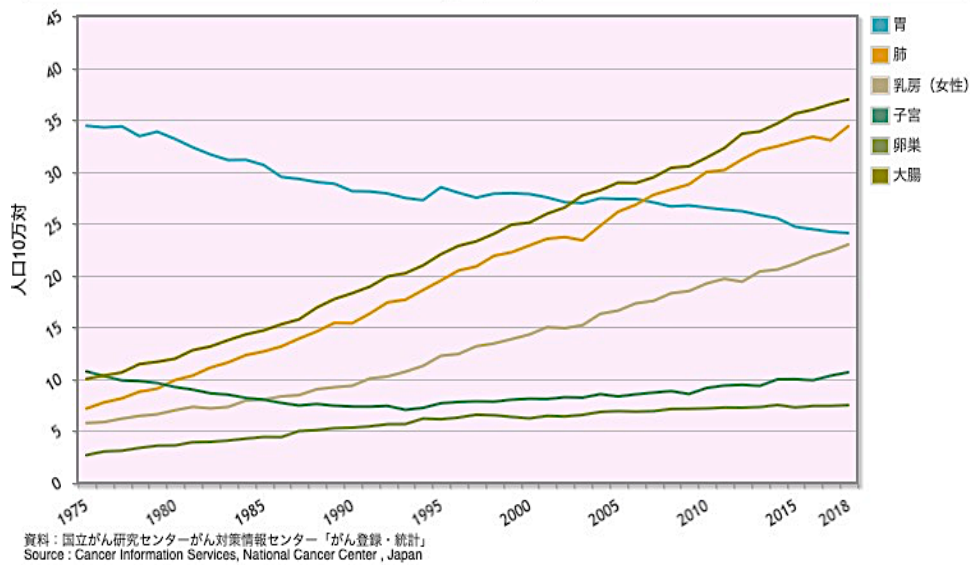


図 2) 人口 10 万人当たりの部位別死亡率の年次推移

卵巣癌の組織型

卵巣悪性腫瘍の 95%以上が、上皮性卵巣癌である[4]。卵巣癌は単一疾患ではなく、病理形態学的・分子学的特性から少なくとも 5 つの組織型—高異型度漿液性癌 (HGSOC)、低異型度漿液性癌 (LGSOC)、明細胞癌、類内膜癌、粘液性癌、に分類される[4, 8]。近年のゲノム解析による遺伝子背景の違いから、漿液性癌において、*TP53* 変異を有する HGSOC と *KRAS* および *BRAF* の変異を有する LGSOC は異なる組織型であると考えられている[4]。北米・欧州と本邦の卵巣癌の組織型の割合は異なる傾向を示しており、北米・欧州では HGSOC が約 70%を占め、明細胞癌は 5%程度であるところ、本邦では、明細胞癌が約 24%を占め、漿液性癌は約 33%である[4, 8, 9] (図 3)。

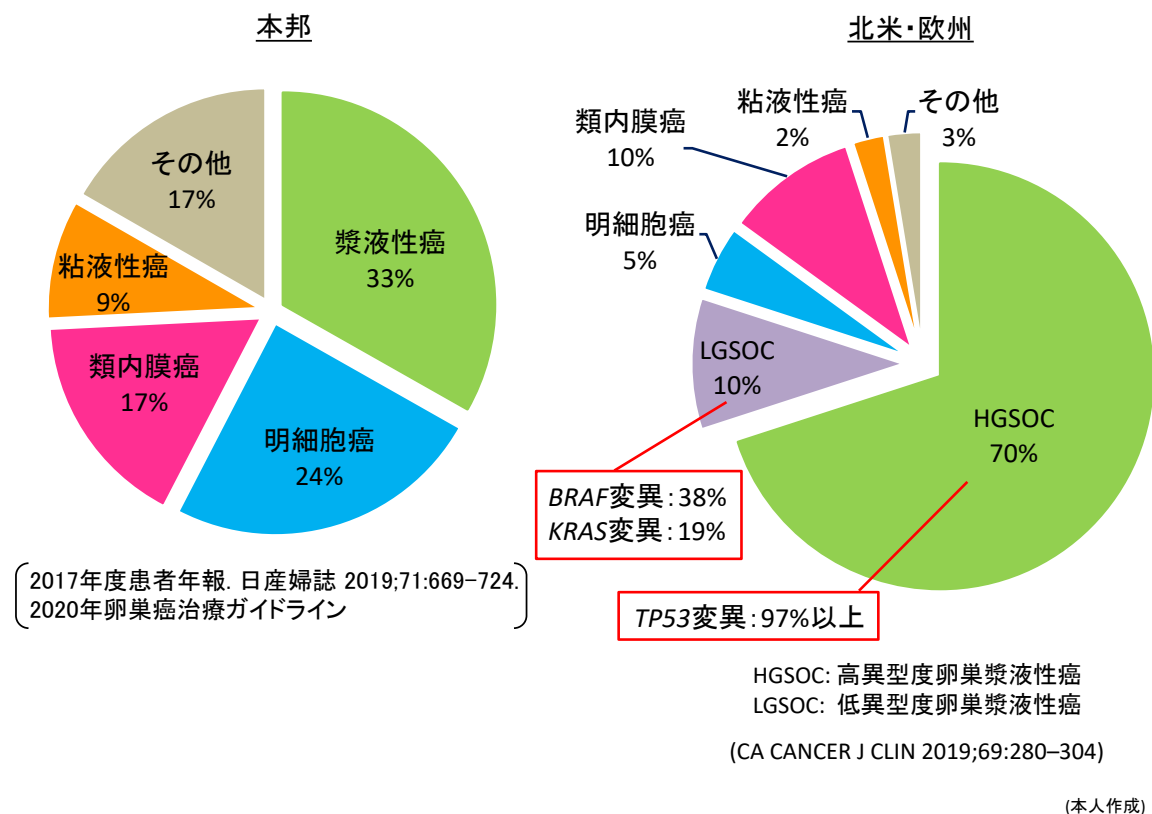
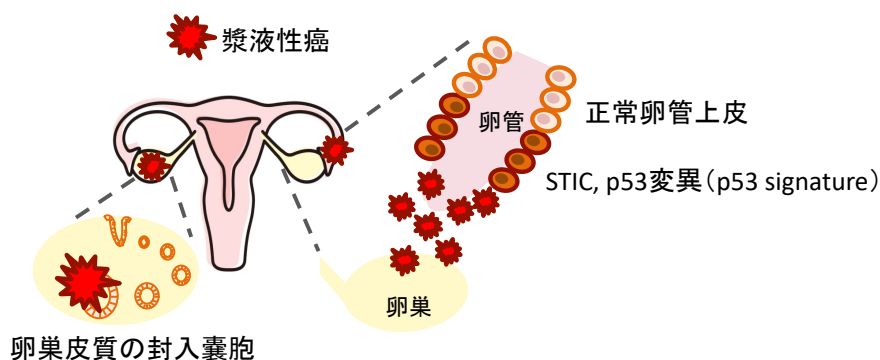


図 3) 卵巣癌の組織型分類

卵巣癌は単一疾患ではなく、病理形態学的・分子学的特性から少なくとも5つの組織型に分類される。

高異型度卵巣漿液性癌 (HGSOc)

これまでは、卵巣皮質の封入嚢胞(CICs: cortical inclusion cyst)がHGSOcの原発とされてきたが[8, 10]、正常卵管上皮にみられる *p53* 変異 (*p53* signature) や漿液性卵管上皮内癌 (STIC: serous tubal intraepithelial carcinoma) の存在から、卵管上皮・卵管采上皮も原発となることが明らかとなった[11-13] (図 4)。



STIC: Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma (漿液性卵管上皮内癌)

(本人作成)

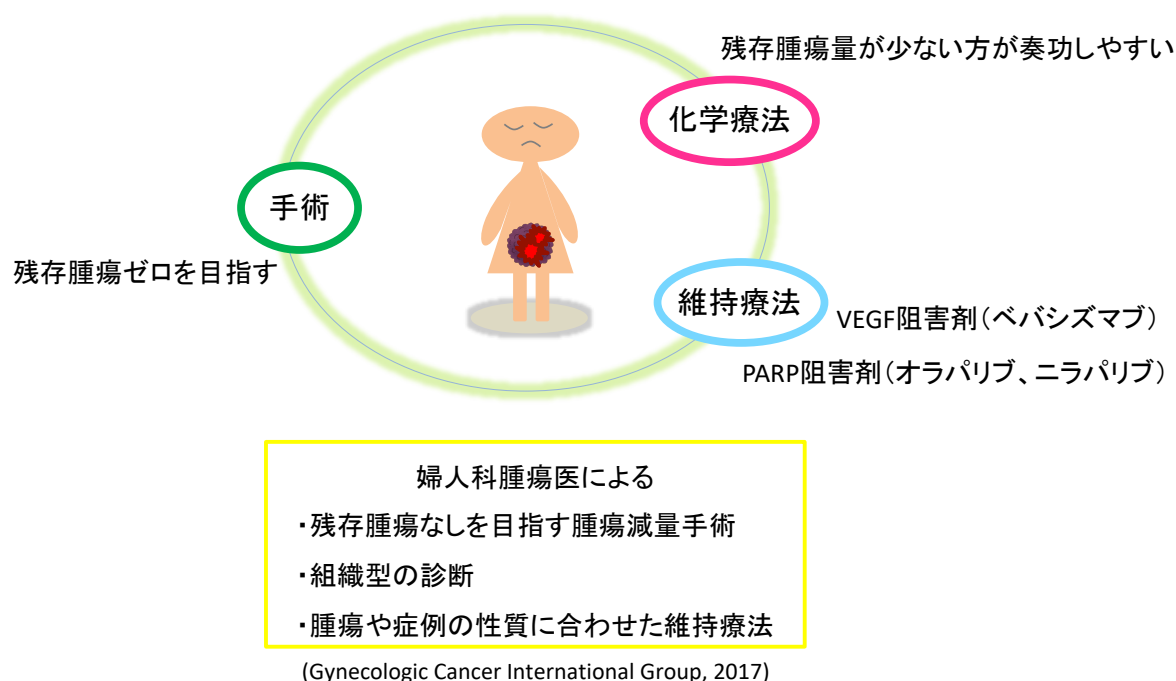
図 4) HGSOC の発生起源仮説

HGSOC は、その約半数が卵巢皮質の封入嚢胞、残りの半数が正常卵管上皮にみられる *p53* 変異および STIC の存在から卵管・卵管上皮が原発であると考えられている。

HGSOC の特徴として、*TP53* 変異 (97%以上) や高度のゲノム不安定性に伴うコピー数変化 (CNAs: copy number alterations) を示す [4]。TCGA (The Cancer Genome Atlas) にて、HGSOC の約半数に相同組換え修飾異常 (Homologous Recombination Deficiency, HRD) が認められ [14, 15]、約 15-20% に生殖細胞系あるいは体細胞の *BRCA1/2* 変異が認められる [14, 16]。遺伝性乳癌卵巢癌症候群 (Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC) syndrome) は、常染色体優性の遺伝形式をとる生殖細胞系列の *BRCA1/2* 変異を伴い、卵巢癌に関しては、生涯発症率は *BRCA1* 変異で約 40-60%、*BRCA2* 変異で約 20% である [17, 18]。*BRCA1* alteration を伴う卵巢癌の 11% に DNA メチル化亢進 (プロモーターのメチル化亢進による *BRCA1* のエピジェネティックなサイレンシング) が認められるとされるが [14]、*BRCA2* の DNA メチル化は一般的ではなく、*BRCA2* の DNA メチル化がみられたとしても、*BRCA2* の mRNA 発現レベルと相関を認めないことが報告されている [19]。

卵巣癌の治療

卵巣癌の標準治療は、腫瘍減量手術、プラチナ製剤・タキサン製剤を併用した化学療法、分子標的治療薬（血管新生(vascular endothelial growth factor: VEGF)阻害剤、PARP(Poly(ADP-ribose) polymerase)阻害剤による維持療法である[20]。卵巣癌は、手術による残存腫瘍量が少ない程、化学療法が奏功しやすい[21]。国際的な臨床試験から得られた知見から導き出された Gynecologic Cancer Inter Group (GCIG)による提言は、全ての卵巣癌患者に善い治療を行う上で、婦人科腫瘍医による残存腫瘍なし(R0)を目指す腫瘍減量手術、組織型の診断、腫瘍や症例の性質に合わせた維持療法の重要性を強調している[22-24](図5)。



(本人作成)

図5) 卵巣癌治療の全体像

卵巣癌の治療は、腫瘍減量手術、化学療法、維持療法からなる。

本邦における PARP 阻害剤の適応

2018年に、Olaparib（オラパリブ）が「白金系抗悪性腫瘍剤感受性の再発卵巣癌における維持療法」に対して適応承認となり、2019年に「BRCA 遺伝子変異陽性の卵巣癌における初回化学療法後の維持療法」、2020年12月には「相同組換え修復欠損を有する卵巣癌におけるベバシズマブ（遺伝子組換え）を含む初回化学療法後の維持療法」が追加承認された[25]。2020年9月に、Niraparib（ニラパリブ）が「卵巣癌における初回化学療法後の維持療法、白金系抗悪性腫瘍剤感受性の再発卵巣癌における維持療法、白金系抗悪性腫瘍剤感受性の相同組換え修復欠損を有する再発卵巣癌」に対して適応承認となった[26]。（図6）

<p>リムパーザ（一般名：オラパリブ、アストラゼネカ） 1回300mg 1日2回内服 錠剤</p> <p>適応：<2018年1月 承認></p> <p>「白金系抗悪性腫瘍剤感受性の再発卵巣癌における維持療法」</p> <p><2018年7月 承認></p> <p>「がん化学療法歴のあるBRCA遺伝子変異陽性かつHER2陰性の手術不能又は再発乳癌」</p> <p><2019年6月 承認></p> <p>「BRCA遺伝子変異陽性の卵巣癌における初回化学療法後の維持療法」</p> <p><2020年12月 承認></p> <p>「相同組換え修復欠損を有する卵巣癌におけるベバシズマブ（遺伝子組換え）を含む初回化学療法後の維持療法」</p> <p>「BRCA遺伝子変異陽性の遠隔転移を有する去勢抵抗性前立腺癌」</p> <p>「BRCA遺伝子変異陽性の治癒切除不能な膀胱癌における白金系抗悪性腫瘍剤を含む化学療法後の維持療法」</p>	
<p>セジューラ（一般名：ニラパリブ、武田薬品） 1回200mg 1日1回内服 カプセル</p> <p>適応：<2020年9月 承認></p> <p>「卵巣癌における初回化学療法後の維持療法、BRCA遺伝子変異の有無にかかわらず</p> <p>白金系抗悪性腫瘍剤感受性の再発卵巣癌における維持療法、現時点では乳癌の適応はなし</p> <p>白金系抗悪性腫瘍剤感受性の相同組換え修復欠損を有する再発卵巣癌」</p>	

(本人作成)

図6) 本邦における PARP 阻害剤の適応

本邦の PARP 阻害剤のオラパリブとニラパリブの適応承認の一覧を示す。

PARP 阻害剤の作用機序

PARP1 は、DNA 結合ドメイン(DBD: DNA binding domain)により DNA 一本鎖切断部位を検出して結合する (図 7)。

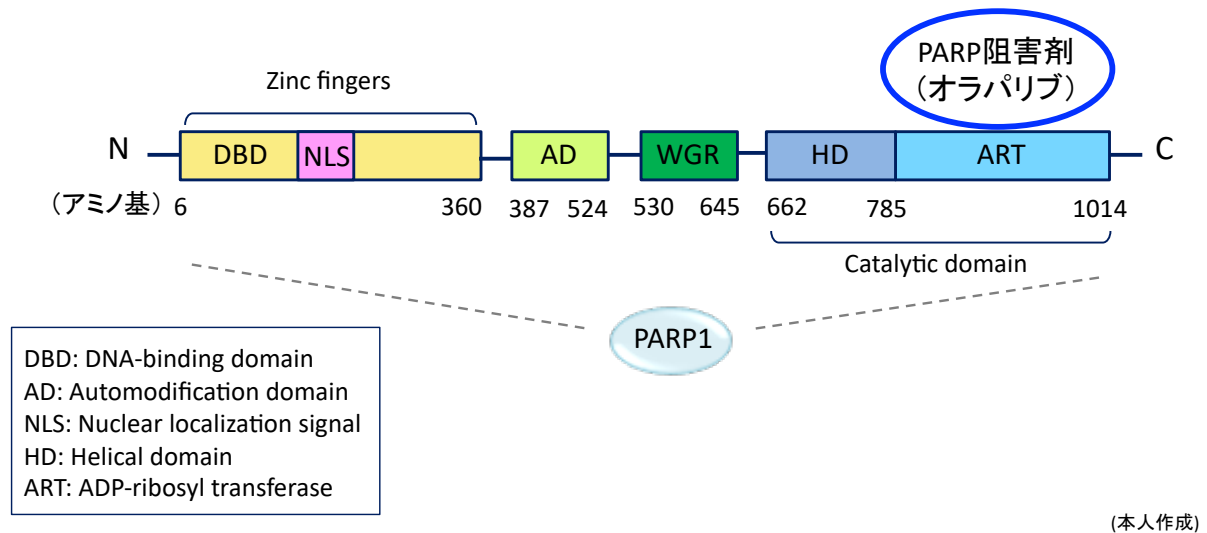


図 7) PARP1 ドメイン構造とオラパリブの結合部位

PARP1 ドメイン構造[27]、オラパリブの結合部位[28]

PARP1 が DNA 切断部位に結合すると、 NAD^+ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) を加水分解し、poly(ADP) ribose (pADPr) の合成を活性化する (PARP1 のポリ ADP リボース化)。合成した pADPr の高密度の負電荷により、PARP1 は DNA との親和性を失い、DNA 損傷部位への修復蛋白がリクルートされ、塩基除去修復が行われる[29]。また、PARP1 は、トポイソメラーゼ I 切断複合体と DNA 二本鎖切断の修復[29]においても重要であり、また、クロマチン構造の調整や DNA メチル化の状態を変更や、転写因子と相互作用する可能性が示唆されている[30]。

PARP 阻害剤は、PARP1 のカタリティックドメインに結合し（図 7）、PARP1 の活性を低下させて塩基除去修復の機能低下を引き起こし、*BRCA1/BRCA2* 変異や他の HRD を伴う場合、細胞内に DNA 損傷が蓄積し DNA 二本鎖切断を引き起こして合成致死（synthetic lethality）を誘導する[31]（図 8）。

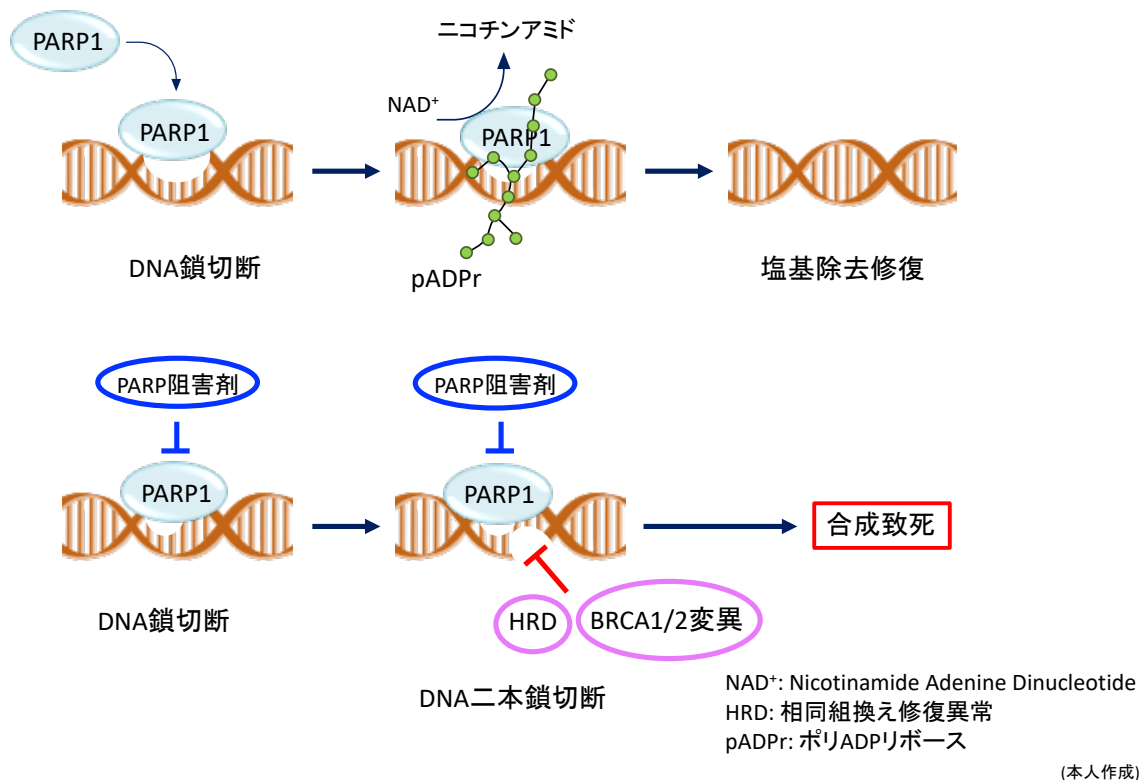


図 8) PARP-BRCA 合成致死モデル

PARP1 は DNA 損傷部位へ結合し、NAD⁺を加水分解してポリ ADP リボースの合成を活性化することにより、DNA 一本鎖切断部位の塩基除去修復を行う。*BRCA1/BRCA2* 変異などの相同組換え修復異常を伴う場合、PARP の阻害は DNA 二本鎖切断を引き起こし、合成致死を誘導する。

また、PARP 阻害剤は、相同組換え経路が不全の際に亢進する非相同末端結合（NHEJ）の DNA 修復経路を妨げ[32]、DNA 複製フォークを妨害する[33]。PARP1 の捕捉能は、オラパリブ > ニラパリブであり、PARP1 の捕捉能が高いほど細胞障害能が高い[28]。

オラパリブ (Olaparib)

オラパリブは、*BRCA1/2*変異症例で奏功し、特にプラチナ製剤感受性において高い奏功がみられる[34-39]。セカンドライン以上の治療歴があるプラチナ製剤感受性HGSOCでBRCA変異陽性の患者(n=295)に対するオラパリブ内服について評価した第Ⅲ相無作為化試験(SOLO2/ENGOT-0v21)の結果は、オラパリブ投与群(19.1ヶ月 [95% CI, 16.3-25.7])の方がプラセボ群(5.5ヶ月 [5.2-5.8]; HR, 0.30 [95% CI, 0.22-0.41])よりも有意に無増悪生存期間(PFS)が延長した(P<.0001)[37]。グレード3以上の有害事象は、貧血(19%)であった。

NCCN(National Comprehensive Cancer Network guidelines)は、BRCA変異の有無に関わらず、プラチナ製剤感受性再発卵巣癌の維持療法としてオラパリブを使用することを推奨している[40]。また、米国では、プラチナ製剤への感受性に関わらず、germline BRCA(gBRCA)変異を有する進行卵巣癌患者への治療としても使用されている[41]。本邦のガイドラインでも、*BRCA1/2* 遺伝子変異を有するプラチナ製剤感受性再発卵巣癌症例に対して、プラチナ製剤を含む化学療法で奏効した後にオラパリブの維持療法を行うことを推奨しており、また、*BRCA*変異のない、もしくは不明なプラチナ製剤感受性再発卵巣癌症例に対して、プラチナ製剤を含む化学療法で奏効した後にオラパリブの維持療法を行うことを提案している[8]。

ニラパリブ (Niraparib)

NCCN は、セカンドライン以上のプラチナ製剤による治療歴を有し、直近の再発治療で CR/PR を認めるプラチナ製剤感受性再発卵巣癌に対する維持療法として、ニラパリブを使用することを推奨している[40]。プラチナ製剤感受性再発卵巣癌に対するニラパリブ (300mg) 群とプラセボ群を比較した第Ⅲ相臨床試験 (ENGOT-0V16/NOVA) の結果は、gBRCA 変異を有するニラパリブ群の PFS が有意に延長し (21.0 vs. 5.5 months) (HR, 0.27; 95% CI, 0.17-0.41)、gBRCA 変異を有さないが HRD を有するニラパリブ群の PFS (12.9 ヶ月 vs 3.8 ヶ月) (HR, 0.38; 95% CI, 0.24 to 0.59)、gBRCA 変異も含め HRD を有さないニラパリブ群の PFS (9.3 ヶ月 vs 3.9 ヶ月) (HR, 0.45; 95% CI, 0.34 to 0.61; $P < 0.001$) も有意に延長した[42]。グレード 3/4 の有害事象は、血小板減少症 (33.8%)、貧血 (25.3%)、好中球減少症 (19.6%) であった[42]。

また、プラチナ製剤感受性再発卵巣癌 (HGSOC、類内膜癌) に対して、ニラパリブ (300mg) 群とニラパリブ (300mg) ・ベバシズマブ (15 mg/kg、3 週おき) 併用群を比較した第Ⅱ相臨床試験 (NSGO-AVANOVA2/ENGOT-ov24) の結果は、ニラパリブ・ベバシズマブ併用群の方が有意に PFS を延長した (11.9 ヶ月 [95% CI 8.5-16.7] vs 5.5 ヶ月 [3.8-6.3]) ([HR] 0.35 [95% CI 0.21-0.57]; $p < 0.0001$) [43]。

エピゲノム

エピゲノムは、ゲノムにおける DNA とヒストンのエピジェネティックな修飾全体の総称であり、エピジェネティックな修飾は、DNA 配列を変更せずに、遺伝子発現やクロマチン構造の変化に影響を及ぼす DNA およびヒストンの修飾のことである [44]

(図 9)。がんゲノム解析は、バイオマーカーやがん治療標的を同定することに重要な役割を果たした [44]。最近 20 年の急速なエピゲノム研究の発展により、「がん」の概念が、ゲノムの異常と同等にエピゲノムの異常による病であることが明らかになってきている [45]。

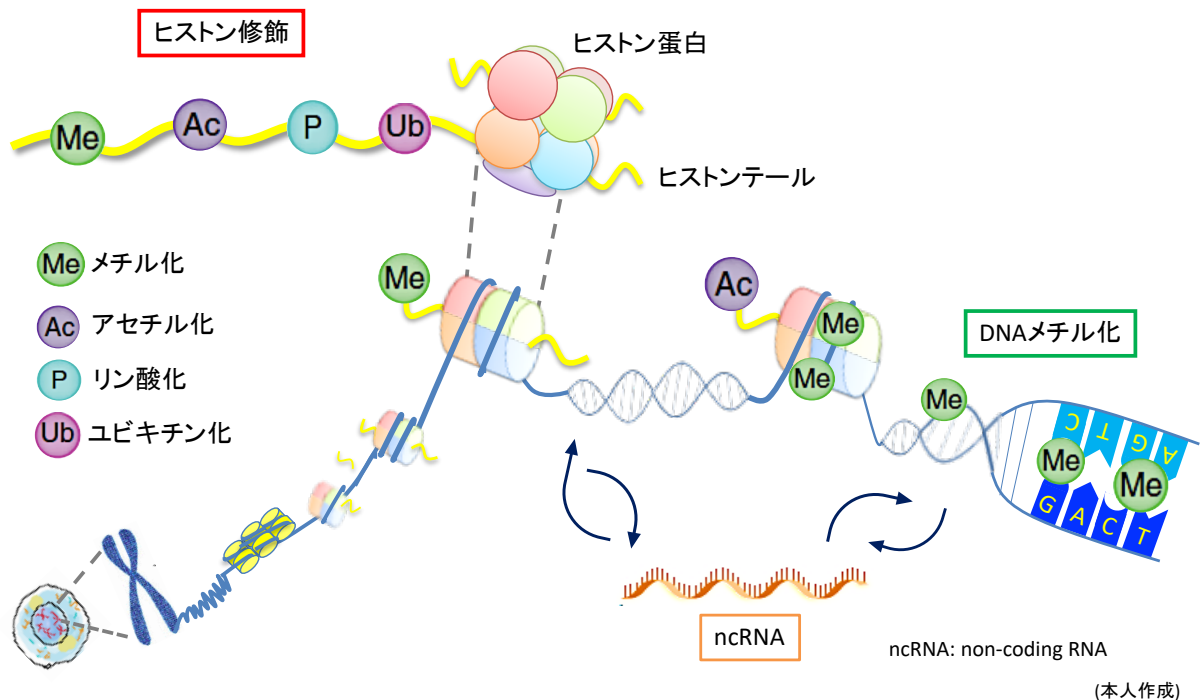


図 9) エピゲノムの模式図

エピゲノムは、ゲノムにおける DNA とヒストンのエピジェネティックな修飾全体の総称であり、ヒストン修飾、DNA メチル化、ncRNA により遺伝子発現やクロマチン構造の変化が複雑に調節されている。

DNA メチル化

がんのエピゲノム研究において、CpG アイランド（プロモーター領域）における DNA メチル化の亢進が、遺伝子の転写抑制と機能不全を伴うことは最も知られているところである[46-48]。ほとんどのがん腫において、数百もの遺伝子に DNA メチル化の亢進がみられることが明らかとなっている[46, 47]。また、DNA メチル化の亢進が microRNAs(miRNAs)の転写を抑制することでがん遺伝子を活性化の方向へ調節することも明らかになってきている[49]。

ヒストン修飾

ヌクレオソームは、4 種類のコアヒストン（H2A、H2B、H3、H4）からなる 8 量体に DNA が約 2 周巻きついて形成されている[50]。ヒストンは、その N 末端のヒストンテールにおいて、アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO(Small Ubiquitin- related(like) Modifier)化といった様々な翻訳後修飾を受けることにより、クロマチンの立体構造を変化させて遺伝子発現を調節する[51-53]。

ヒストンメチル化

ヒストンメチル化酵素 (histone methyltransferases: HMTs) は、発見当初はヒストン蛋白のみをメチル化するとされたが、後に非ヒストン蛋白もメチル化することが明らかとなり、リシン基に対して特異的なメチル化酵素 (Lys-specific methyltransferases: KMTs) は、PKMTs (Protein Lys-specific methyltransferases) と総称されるようになった。ヒストンのメチル化は、主にアルギニン基、リシン基に生じる。PKMTs は、リシン基の ϵ アミノ基を、adenosyl-l-methionine (AdoMet) に依存して、モノメチル化 (me1)、ジメチル化 (me2)、トリメチル化 (me3) にメチル化する [54] (図 10)。

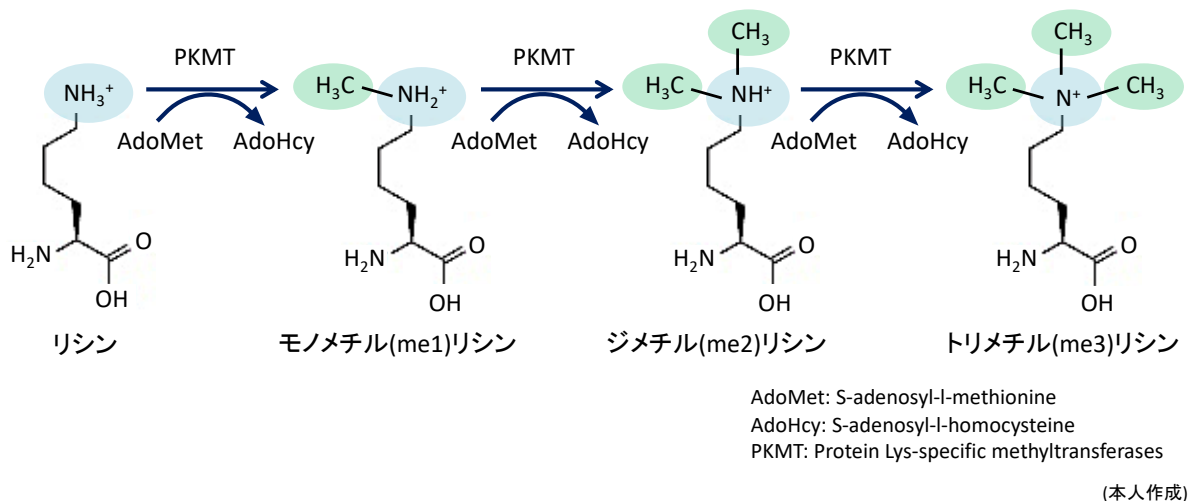
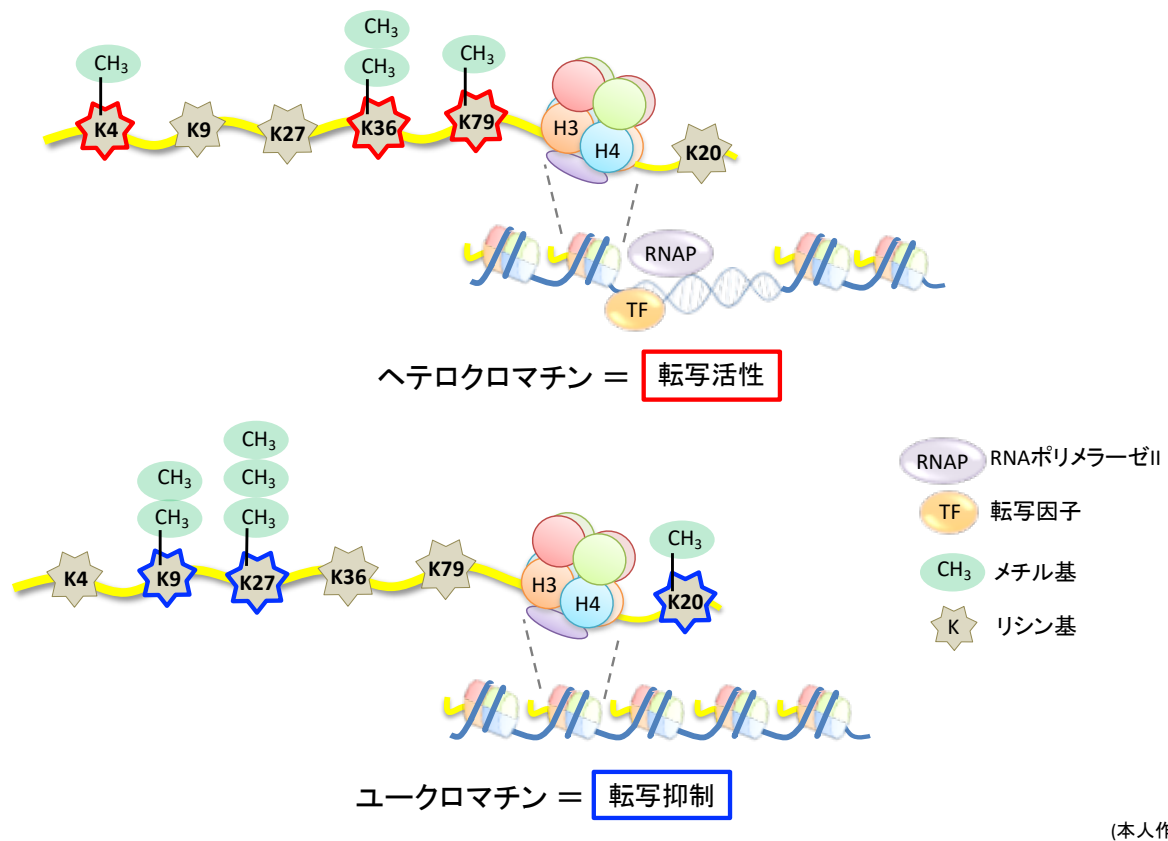


図 10) リシン基のメチル化

PKMT の作用により、AdoMet からリシン基の ϵ -N 末端にメチル基が転移される。

ヒストンメチル化によって、クロマチン立体構造の変化により遺伝子発現 (転写) が活性もしくは抑制するかは、ヒストン(H)のリシン基(K)のメチル化の部位 (何番

目か) と量 (me1, me2, me3) に左右される [50, 52-59]。転写が開始されるためには、転写因子や RNA ポリメラーゼなどがアクセスできるようにクロマチンは開いている状態 (ヘテロクロマチン) である必要がある [60, 61]。一般的に、ヒストン H3 リシン 4 (H3K4)、H3K36、H3K79 のメチル化は転写活性、H3K9、H3K27 の me2 と me3、H4K20 のメチル化は転写抑制に働くとされている [57, 62, 63] (図 11)。



(本人作成)

図 11) ヒストンリシンメチル化の部位による転写の状態

クロマチンが開く状態となるヒストン H3 リシン 4 (H3K4)、H3K36、H3K79 のメチル化は転写活性、クロマチンが閉じる状態となる H3K9、H3K27 の me2 と me3、H4K20 のメチル化は転写抑制に働くとされている。

非ヒストン蛋白メチル化

細胞間のシグナル伝達は、タンパク間の相互作用と、主にチロシン基・セリン基・スレオニン基のリン酸化およびリシン基・アルギニン基のメチル化といった翻訳後修飾により行われている[54]。メチル化酵素は、非ヒストン蛋白のリシン基、アルギニン基をメチル化することで、シグナル調節などにより細胞機能を幅広く調節し[58]、がんの病態にも関連する[54]。また、転写因子の作用により、メチル化される基質の同部位でリン酸化されるというような翻訳後修飾のクロストークは顕著にみられる。隣り合うメチル化とリン酸化の相互作用が、離れた場所での翻訳後修飾クロストークを生じることもある（メチル化-リン酸化スイッチ）[64]。

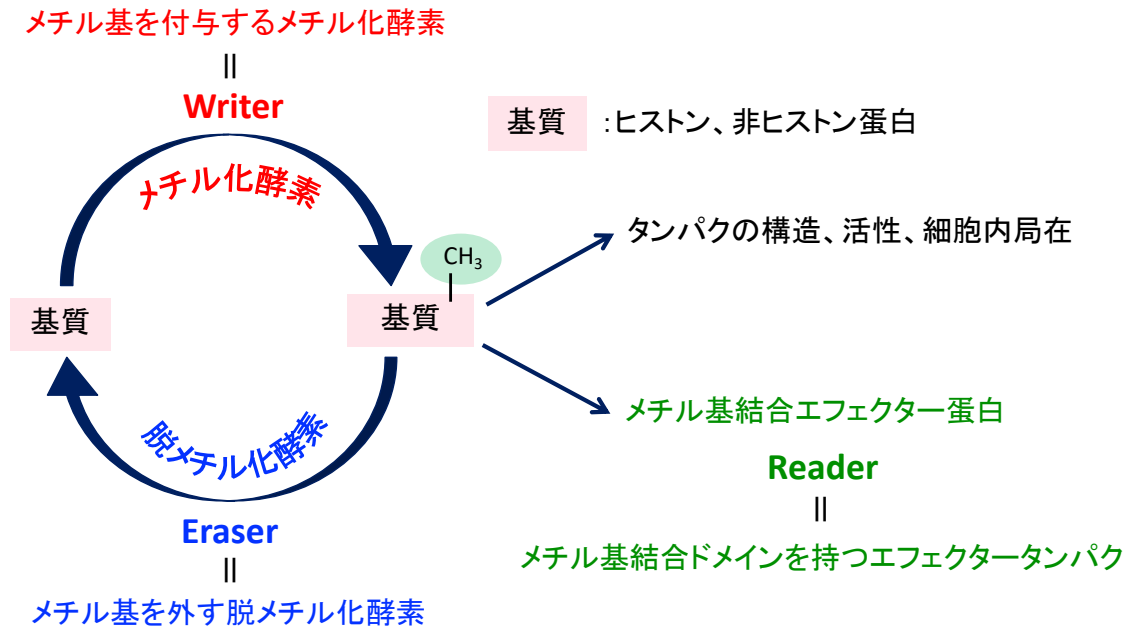
“writer-reader-eraser” モデル

メチル化により調節を受ける生物学的機能は、クロマチン構造の再構築[65]、転写[65, 66]、DNA複製・合成・修復[67]、タンパク合成[68]、RNA代謝[69-71]、細胞周期[66, 72]、アポトーシス[73]、シグナル伝達[74]に留まらない[54]。

メチル化のモデルとして、“writer-reader-eraser”モデルが提唱されている（図12）。このモデルは、メチル基を付与するメチル化酵素（Writer）、メチル基を外す脱メチル化酵素（Eraser）、メチル基結合ドメインを持つエフェクタータンパク（readers）から成るモデルである。メチル化された基質は、タンパクの構造、活

性、細胞内局在、エフェクタータンパク (Reader) との相互作用を変更する

[55, 75, 76]。



(本人作成)

図12) “writer-reader-eraser” モデル

メチル基を付与するメチル化酵素 (writer)、メチル基を外す脱メチル化酵素 (eraser)、メチル基結合ドメインを持つエフェクタータンパク (readers) により構成される。

ヒストンメチル化は、ヒストンメチル化酵素 (Writer) によりアミノ酸側鎖の電荷を変更せずに、me1、me2、me3にメチル化の状態を変更することが可能であるため、ヒストンメチル化の働きの大部分は、メチル化の部位を識別するエフェクタータンパク (Reader) の働きによるものと考えられている [63]。エフェクタータンパク (Reader) は、メチル基-リシン基結合モチーフを含んでおり、メチル化の部位および

周囲のアミノ酸配列から標的とするメチル基-リシン基を識別することが可能である [77]。

リシンメチル化酵素 SMYD2

SMYD2、SET (Su (var)3-9, Enhancer-of-zeste, and Trithorax) and MYND (myeloid translocation protein-8, Nrvy, and DEAF-1) domain-containing 2、の略称である。SET ドメインは、130-140 個のアミノ酸から成る保存配列を有し、MYND ドメインは、zinc finger モチーフで蛋白同士の相互作用に関わる [78]。

SMYD2 は、SMYD ファミリー (SMYD1~5) の一つで、H3K4 をモノメチル化 (me1) および H3K36 をジメチル化 (me2) し、転写活性に遺伝子調節を行う [57]。SMYD2 は、HSP90 が不在の状況で H3K36 をジメチル化 (me2) し [79]、HSP90 の存在下で H3K4 をモノメチル化 (me1) する [78, 79]。H3K36me2 は、マクロファージの IL-6 と TNF- α の産生を抑制する [80]。

他にも、SMYD2 は、p53 [81]、Rb [82]、PARP1 [83]、HSP90 [84]、ER α [85]、EML4-ALK [86]、 β -カテニン [87]、PTEN [88]、MAPKAPK3 [89]、STAT3 [90]、p65 (NF- κ B) [90] など様々な非ヒストン蛋白をモノメチル (me1) 化し、細胞機能を調節している [91]。SMYD2 がリシンメチル化酵素である EZH2 の 307 番目のリシン基をメチル化することで EZH2 の安定性を高めて転写抑制を増強したり [92]、SMYD2 による H3K36 のジメチル化が、Sin3A (transcriptional co-repressor SWI-independent

3A)/HDAC(ヒストン脱アセチル化酵素)複合体との相互作用で転写抑制に働いたり

[79]、DNMT(DNAメチル化酵素)1をリクルートしてDNAメチル化を亢進したりするこ

と[93]が報告されている(図14)。

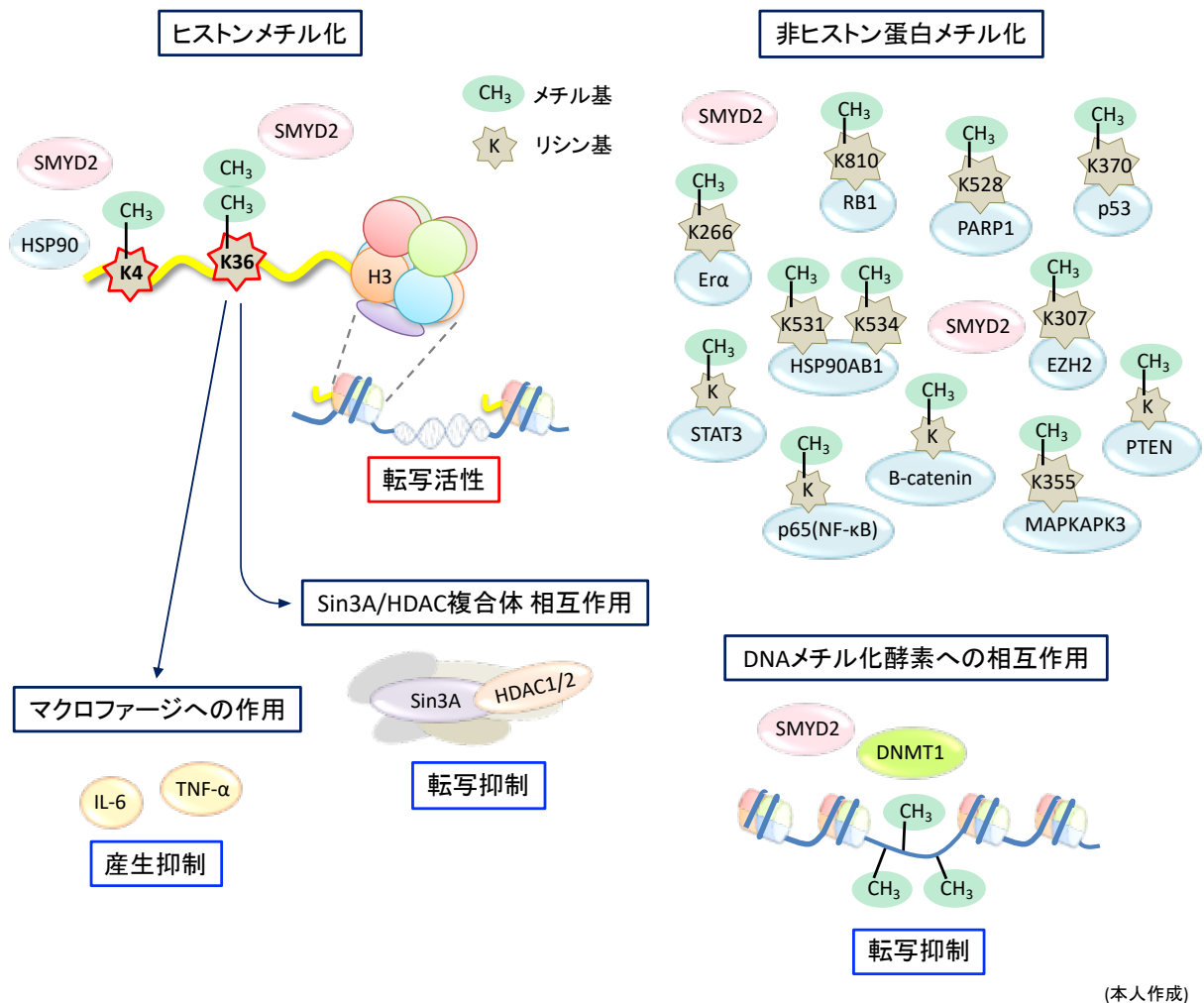


図14) SMYD2の機能のまとめ

SMYD2は、ヒストンメチル化酵素として、H3K4をモノメチル化(me1)およびH3K36をジメチル化(me2)して転写活性に遺伝子調節を行い、非ヒストンタンパクメチル化酵素として、p53やPARP1を始めとする様々な非ヒストンタンパクのメチル化を行う。また、HDACやDNAメチル化酵素との相互作用、マクロファージへの作用が報告されている。HDAC: ヒストン脱アセチル化酵素

SMYD2 は、PARP1 の 528 番目のリシン基をメチル化し PARP1 を活性化する [83] (図 13)。

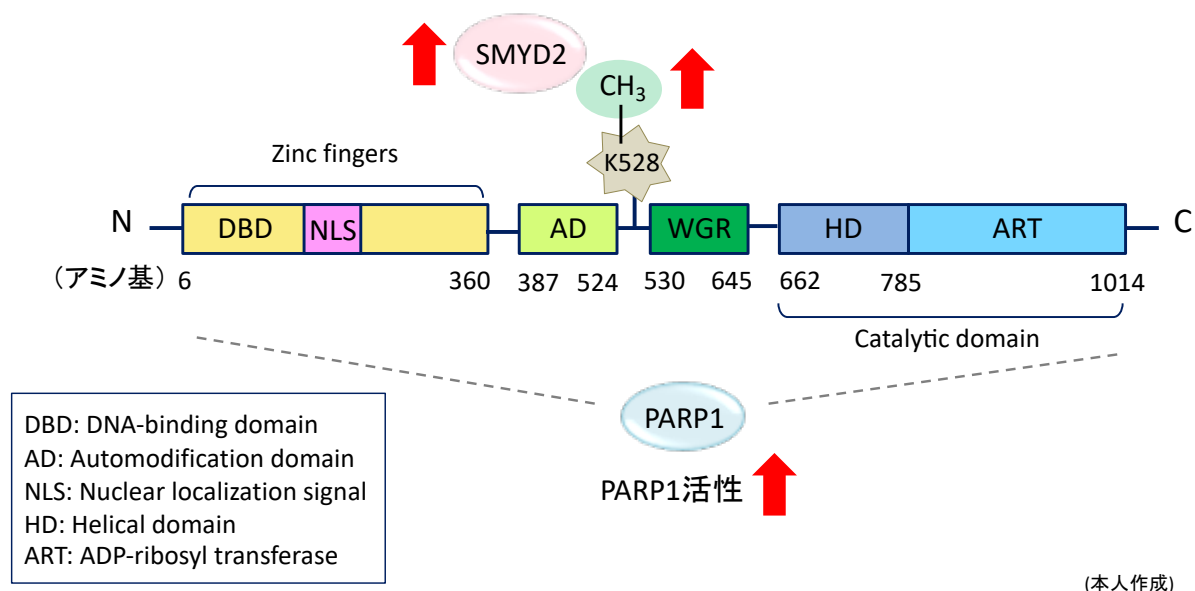


図 13) SMYD2 の PARP1 のメチル化部位

SMYD2 は PARP1 の 528 番目のリシン基をメチル化し PARP1 を活性化する。
 PARP1 ドメイン構造 [27]

SMYD2 は、PARP1 を抑制することで DNA 傷害性薬剤の効果を高めることが報告されており [94]、SMYD2 の阻害が PARP1 の活性を減少させ、化学療法や放射線治療への感受性を高める可能性が示唆されている [82, 95]。また、腎明細胞癌において、SMYD2 選択的阻害剤 (AZ-505) とチロシンキナーゼ阻害剤スニチニブとの併用療法が、SMYD2/miR-125b/DKK3 パスウェイの阻害により相乗効果が認められたことや [96]、膵管腺癌において、SMYD2 選択的阻害剤 (BAY-598) とゲムシタビンの併用効果が認められたことが報告されている [89]。

SMYD2は、卵巣明細胞癌[97]、子宮頸癌[98]、トリプルネガティブ乳癌[90]、食道癌[99]、非小細胞肺癌[86]、胃癌[100]、膵管腺癌[89]、膀胱癌[82]など、様々ながん腫で発現亢進が認められる。子宮頸癌[98]、食道癌[99]、小児急性リンパ芽球性白血病[101]、腎明細胞癌[96]、胃癌[100]においてSMYD2の発現亢進が予後不良と相関することが報告されている。大腸癌において、SMYD2の発現亢進がAPCを抑制することによりWnt/ β カテニンパスウェイを亢進させ、上皮間葉転換 (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition) を誘導して、転移を促進することが報告されている[93]。

SMYD2は多様な機能を持ち、その全容は明らかではないが、がんの発生・進展や抗がん剤耐性に関与している可能性が示唆される。

SMYD2 選択的阻害剤 (LLY-507)

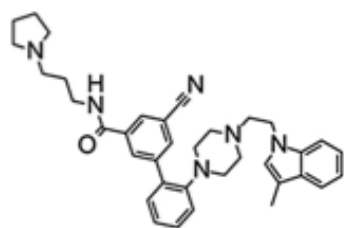


図 15) LLY-507 の構造式

LLY-507 (3-cyano-5-{2-[4-[2-(3-methylindol-1-yl)ethyl]piperazin-1-yl]-phenyl}-N-[(3-pyrrolidin-1-yl)propyl]benzamide) は、他の様々な

メチル化酵素および非メチル化酵素の標的よりも

SMYD2 に対して 100 倍以上の選択性を有している[91]。

目的

初期の卵巣癌は自覚症状に乏しく、多くはstageⅢ/Ⅳに診断され、5年生存率は50%を下回る。卵巣癌の治療は、残存腫瘍ゼロを目指す手術と化学療法、維持療法が主体となり、化学療法、維持療法の奏功が重要な予後因子となる。PARP阻害剤（オラパリブ）は、BRCA遺伝子変異やHRDを有する卵巣癌およびプラチナ製剤感受性再発卵巣癌に対する維持療法として承認されている。オラパリブは、PARP1に結合し、PARP1活性を低下させることによりDNA損傷を蓄積させ合成致死を誘導する。本研究では、リシンメチル化酵素SMYD2がPARP1の528番目のリシン基をメチル化してPARP1活性を増加させることによりオラパリブによる合成致死の誘導を減弱させる可能性に着目し（図16）、HGSOCに対してSMYD2が新規治療標的になり得るか、LLY-507が新規治療戦略となり得るか検証した。

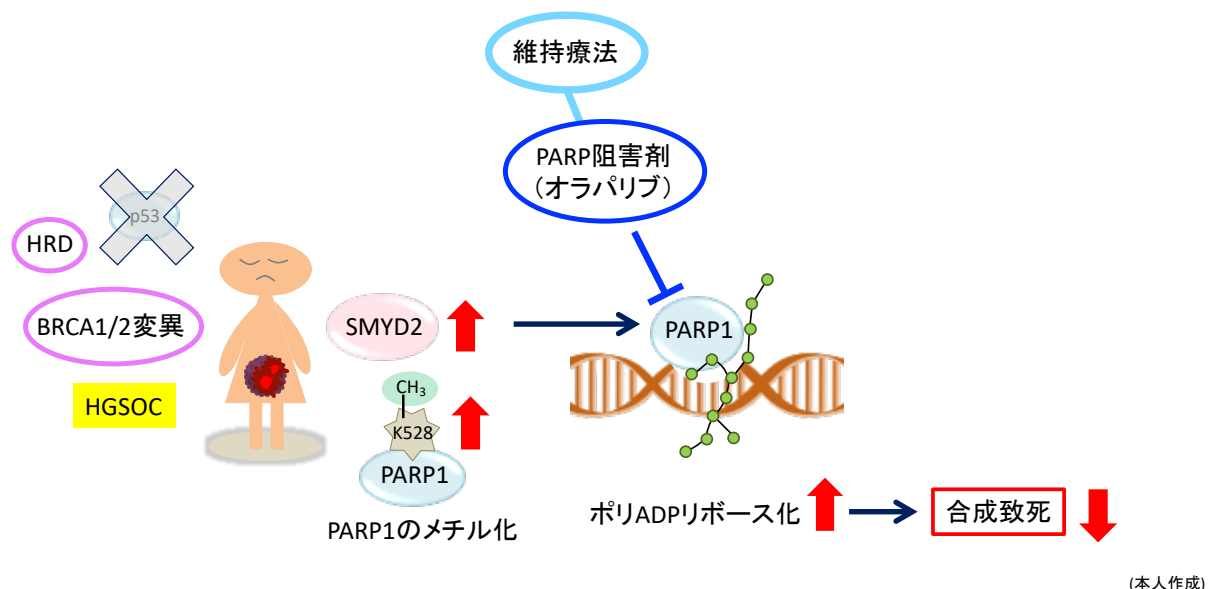


図 16) 本研究の着目点

SMYD2によりPARP1がメチル化し、PARP1活性を増加させることによりオラパリブによる合成致死の誘導を減弱させる可能性（赤矢印）に着目した。

方法

新鮮凍結検体

2010年から2016年にかけて、東京大学医学部附属病院にて採取された、35症例の治療歴のないHGSOC検体と5症例の正常卵巣検体を使用した。

本研究は、東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会より承認を受けている。（倫理番号：683-19）

細胞株および細胞培養

HGSOC細胞株として以下の9種類の細胞株を使用した。

- JHOS2、JHOS3、JHOS4、HTOA：理化学研究所(茨城県)
- KURAMOCHI、OVSAHO、OVKATE、TYKnu：JCRB細胞バンク(大阪府)
- OVCAR3：American Type Culture Collection (ATCC; Manassas)

以下の培地（1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含有）を使用した。

- JHOS2、JHOS3、JHOS4：DMEM/F12培地 + 10% FBS
- KURAMOCHI、OVSAHO、OVKATE：RPMI培地 + 10% FBS
- OVCAR3：RPMI培地 + 20% FBS
- TYKnu：DMEM培地 + 10% FBS
- HTOA：HamF12培地 + 10% FBS

細胞培養は、37°C、5%CO₂濃度の湿潤環境にて行った。

siRNA トランスフェクション

10cm dish で前培養を行った翌日に、Lipofectamine-RNAi MAX Transfection Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用して、終濃度 100nM となるように siRNA トランスフェクションを行った。siRNA トランスフェクションは、Opti-MEM Medium を使用し、siRNA トランスフェクションから 3-4 時間後に、FBS と抗菌薬を含む培地にて培地交換を行い、その後、細胞回収まで培地交換は行わなかった。

siRNA は Sigma-Aldrich より購入した。配列を以下に示す。

- siSMYD2 #1 [88]

sense: 5' -GAAUGACCGGUAAGAGA-3' 、 antisense: 5' -UCUCUUAACCGGUCAUUUC-3'

- siSMYD2 #2 [102]

sense: 5' -GAUUUGAUUCAGAGUGACA-3' 、 antisense: 5' -UGUCACUCUGAAUCAAAUC-3'

- MISSION siRNA Universal Negative Control (siNC) をネガティブコントロール

siRNA として使用した。

RNA 抽出、逆転写反応、リアルタイム PCR 法

RNeasy Mini Kit (50) (QIAGEN) を使用して抽出した RNA サンプルを、65°C で 5 分間 インキュベートして変性させ、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を使用して、ゲノム DNA 除去反応、逆転写反応 (37°C 5 分 → 98°C 5 分) を行った。リアルタイム PCR 法は、One-Step SYBR Prime Script RT-PCR Kit

(タカラバイオ)を使用し、プライマーの終濃度 $0.5 \mu\text{M}$ にて、PCR サイクル条件を、初期変性 : 98°C 2 分、変性 : 98°C 10 秒、アニーリング : 60°C 10 秒、伸長 : 68°C 30 秒、40 サイクルに設定した。機器は、Light Cycler instrument (Roche Diagnostics)を使用した。mRNA の発現量は、 β -アクチン (housekeeping gene) にて正規化を行った。プライマー配列を、表 1 に示す。

遺伝子名	プライマー配列
β -actin (housekeeping gene)-f	5'-CACACTGTGCCCATCTACGA-3'
β -actin (housekeeping gene)-r	5'-CTCCTTAATGTACGCACGA-3'
SMYD2-f	5'-ATCTCCTGTACCCAACGGAAG-3'
SMYD2-r	5'-CACCTTGGCCTTATCCTTGTC-3'
SMYD3-f	5'-TTCCCGATATCAACATCTACCAG-3'
SMYD3-r	5'-AGTGTGTGACCTCAATAAGGCAT-3'
EZH2-f	5'-CGCTTTTCTGTAGGCGATGT-3'
EZH2-r	5'-TGGGTGTTGCATGAAAAGAA-3'
WHSC1-f	5'-TCGAAGCAGCTCTTGTGTCTAAG-3'
WHSC1-r	5'-TTTGGACCACACCAAATCACCAAC-3'
SET7-f	5'-GACACAAGGCAAATCACTCC-3'
SET7-r	5'-TGGTCATAGCCATAGGCAAC-3'
SETD8-f1	5'-TCTTGTGATTCCACCAATGCAG-3'
SETD8-r1	5'-CCTTCGGACAGGGTAGAAATCC-3'
SETD1A-f	5'-AAGGTGTACCGCTATGAT-3'
SETD1A-r	5'-CCAATATAGAACTCGTCCAG-3'
SUV39H2-f	5'-TGGGGTGTAAAGACCCCTTGTG-3'
SUV39H2-r	5'-ATTCCCTTGTGTCATAGAAC-3'
EHMT2-f	5'-GGAGGAAGCTGAACTCAGGAGG-3'
EHMT2-r	5'-GACTGAAGTCATCACCACCAC-3'

表 1) プライマー配列一覧

細胞生存アッセイ

cell counting kit-8 solution (同仁化学研究所)を培地の 1/10 量ずつ添加し、2 時間インキュベートの後に吸光度 450nm で測定した。吸光度計は、microplate reader (BioTek)を使用した。細胞生存率は、siNC もしくは 0.02%DMSO (Sigma-Aldrich)の細胞を基準にして正規化を行った。Triplicate で行った実験データを平均値±SD で示した。

抗体

以下の抗体を使用した。

- SMYD2 抗体 (#9734; Cell Signaling Technology)
- cleaved PARP 抗体 (#5125; Cell Signaling Technology)
- β -actin 抗体 (A2228; Sigma-Aldrich)
- anti-rabbit IgG, HRP-linked 抗体 (#7074S; Cell Signaling Technology)
- anti-mouse IgG, HRP-linked 抗体 (#7077S; Cell Signaling Technology)

阻害剤

以下の阻害剤を使用した。阻害剤は、DMSO(dimethyl sulfoxide)を溶媒とした。

- SMYD2 選択的阻害剤 : LLY-507 (No. S7575; Selleck)
- PARP 阻害剤 : オラパリブ (No. 10621; Cayman Chemical)

フローサイトメトリーによる細胞周期解析

siRNA または LLY-507 を添加し、72 時間後の細胞を回収した。回収した細胞を、PBS(-) で洗浄・遠心 (1500rpm、5 分) を 2 回行った後、70%エタノールで固定、4°C で一晩以上保存した。固定した細胞は、PBS(-) で洗浄・遠心 (1500rpm、5 分) を 2 回行い、エタノールを除去した。Ribonuclease A from bovine pancreas (R4875; Sigma-Aldrich) を、終濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ で添加し、37°C で 20 分間インキュベート後にヨウ化プロピジウム溶液 (P4170; Sigma-Aldrich) を添加し、遮光、4°C、15 分間にて核酸の蛍光染色を行った。Epics XL instrument (Beckman Coulter) を使用して、蛍光活性化セルソーティング (FACS) を行い、Cell Quest pro software v3.1. (BD Bioscience) を使用して解析を行った [103, 104]。Triplicate で行った実験データを平均値 \pm SD で示した。

免疫組織化学染色 (IHC)

HGSOC 新鮮凍結検体 35 症例のうち、入手可能であった HGSOC30 症例のパラフィン包埋 (FFPE: Formalin fixed paraffin embedded) 切片 (倫理番号: 683-19) を使用し、 $6 \mu\text{m}$ に薄切して標本を作成した。55°C で 30 分間のベーキングを行い、キシレンとエタノールで脱パラフィン化し、Target Retrieval Solution with a pH of 9 (Agilent) を使用してマイクロウェーブ法にて抗原賦活化処理を行った。Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution を使用して、内在性ペルオキシダーゼ不活性化処理

を行った。標本は、1%BSA でブロッキングし、SMYD2 抗体(1:200)にて、4°C、オーバーナイトで一次抗体反応を行った。標本は、Dako REAL EnVision Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse, HRP (K5007)を使用して二次抗体反応・発色(8分間)を行い、ヘマトキシリンにて対比染色をし、エタノール・キシレンにて脱水・透徹し、ヒストファイン (Code:415141)にて封入し乾燥させた。IHC スコアは、Allred score により算出した。

Allred score: Total score (TS) = Proportion score (PS)+ Intensity score (IS)

PS : 陽性細胞の比率 (score 0: 0%, score 1:<1%, score 2: 1-10%, score 3: 10-33%, score 4:33-67%, score 5:>67%)

IS : 染色強度 (score 0: background, score 1: weak staining, score 2: moderate staining, score 3: strong staining)

IHC スコアは、スコア 0-4 を陰性、スコア 5-8 を陽性として評価した[105, 106]。

蛋白抽出

10cm dish に PBS(-) 500 μ L を添加し、セルスクレーパーにて細胞を 1.5mL チューブに回収した。遠心 (3000rpm, 15分) して上清を破棄し、プロテアーゼ阻害剤

(11836153001、Roche) を添加した RIPA バッファー(188-02453、和光)に細胞ペレットを懸濁し、超音波破碎を行い、再度、遠心 (14000rpm, 15分) して得られた上清を回収した。

ウェスタンブロット法

95°C、5分間の加熱処理を行ったサンプルを使用した。BIO-RAD Mini-PROTEAN® TGX™ Gels を使用し、SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) によって分離したサンプルを、ウェット法およびセミドライ法 (トランスブロット Turbo™ 転写システム) にてメンブレン (フッ化ポリビニリデン; PVDF) に転写した。Tris に溶解した 5% 脱脂粉乳を使用し、室温、1 時間でブロッキングを行い、SMYD2 抗体 (1:1000)、cleaved PARP 抗体 (1:1000)、 β -actin 抗体 (1:5000) にて、4°C、オーバーナイトで一次抗体反応を行った。anti-rabbit IgG, HRP-linked 抗体および anti-mouse IgG, HRP-linked 抗体にて二次抗体反応を行った。Amersham ECL Select (GE Healthcare Life Sciences) にて発光反応を行い、ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare Life Sciences) を使用して検出を行った。

コロニー形成アッセイ (CFA)

6 ウェルプレートを使用し、1 ウェルあたりの細胞数を 1.2×10^3 細胞として前培養を行った。翌日に、LLY-507 (0.5 と 1.0 mM) とオラパリブ (0.1 もしくは 1.0 mM) の単剤もしくは 2 剤を添加し、2-3 日おきに薬剤添加培地を交換した。11 日目に、100% エタノールにて 2 時間で固定を行い、20 倍希釈したギムザ液 (277-06995、和光) に

て1時間で染色を行った。50細胞以上で1コロニーとし、DMSO添加のコロニー数にて正規化を行った。Triplicateで行った実験データを平均値±SDで示した。

統計学的解析

統計学的有意差は、エクセルと JMP Pro. v. 12 を使用し、スチューデントの t 検定とピアソンのカイ二乗検定により決定した。エクセルを使用して、SMYD2 の発現量と Stage との相関についてピアソンの積立相関係数により分析を行った。JMP Pro. v. 15 を使用して、SMYD2 の発現量と全生存期間(OS)との相関について Kaplan-Meier 法とログランク検定により分析を行った。実験データは、平均値±SDで示した。統計学的有意差は、** $P < 0.05$ と * $P < 0.01$ として Figure に表記した。

結果

HGSOC 新鮮凍結検体において 6 種類のメチル化酵素の mRNA 量が発現亢進している

HGSOC におけるリシンメチル化酵素の発現レベルを調べるため、治療歴のない HGSOC の新鮮凍結検体を使用し、9 種類のリシンメチル化酵素の発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。正常卵巣 (n=6) と HGSOC (n=35) を比較した結果、HGSOC において 6 種類のメチル化酵素の有意な発現亢進が認められた ($p < 0.01$) (図 17)。

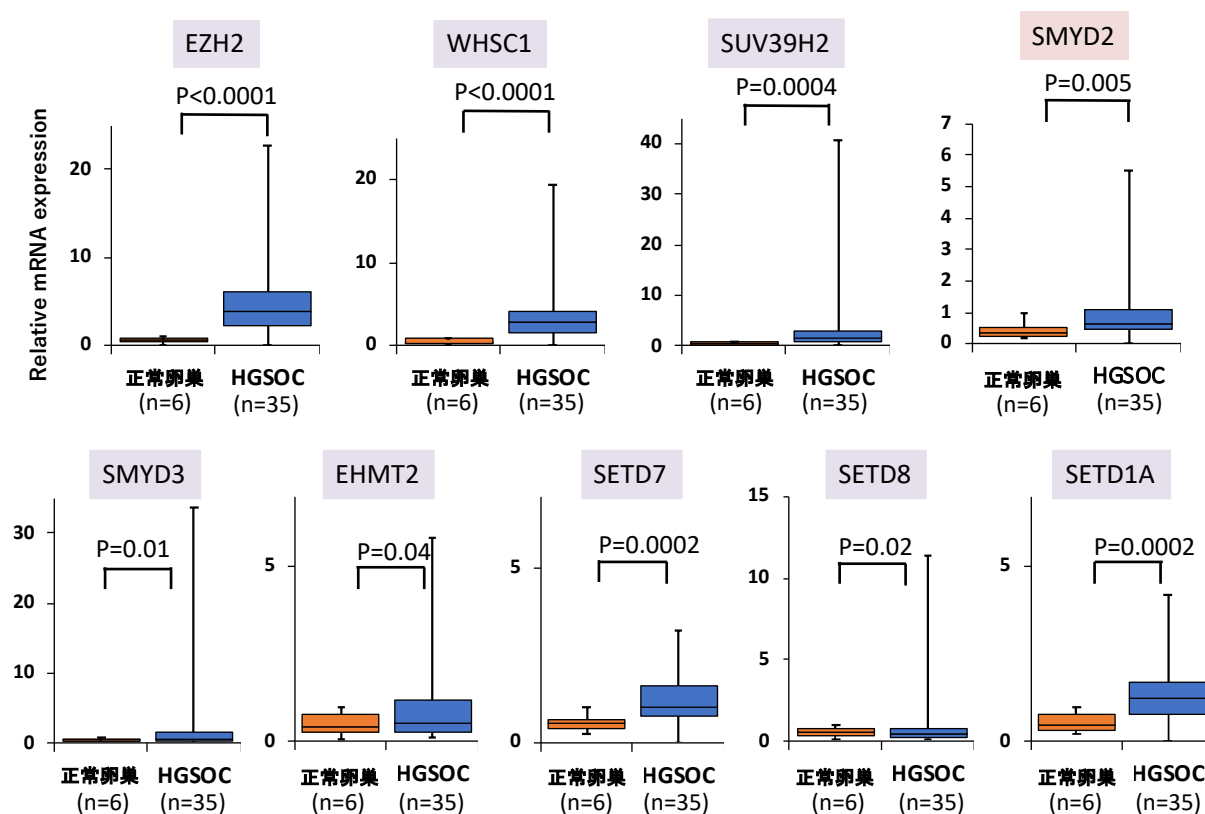


図 17) 新鮮凍結検体におけるメチル化酵素の mRNA 発現解析

正常卵巣 (n=6) と HGSOC (n=35) の新鮮凍結検体を使用し、リアルタイム PCR 法にて 9 種類のメチル化酵素の発現解析を行った。6 種類のメチル化酵素 (EZH2, WHSC1, SUV39H2, SMYD2, SETD7, SETD1A) の有意な発現亢進が認められた。実験データは、平均値 \pm SD で示した。

リシンメチル化酵素 SMYD2 が PARP1 の 528 番目のリシン基をメチル化することにより PARP1 活性を増加させることが報告されている [83]。SMYD2 の発現亢進が、卵巣癌の維持療法として承認されている PARP 阻害剤（オラパリブ）による合成致死の誘導を減弱させる可能性が示唆され、HGSOC において有意な発現亢進が認められた 6 種類のリシンメチル化酵素の中から SMYD2 に着目した。

SMYD2 mRNA 発現量とステージの相関関係、全生存期間との間に有意差を認めない

SMYD2 mRNA 発現量とステージおよび全生存期間を比較した結果、ステージと相関を認めず、全生存期間との間に有意差は認められなかった（図 18、表 2）。

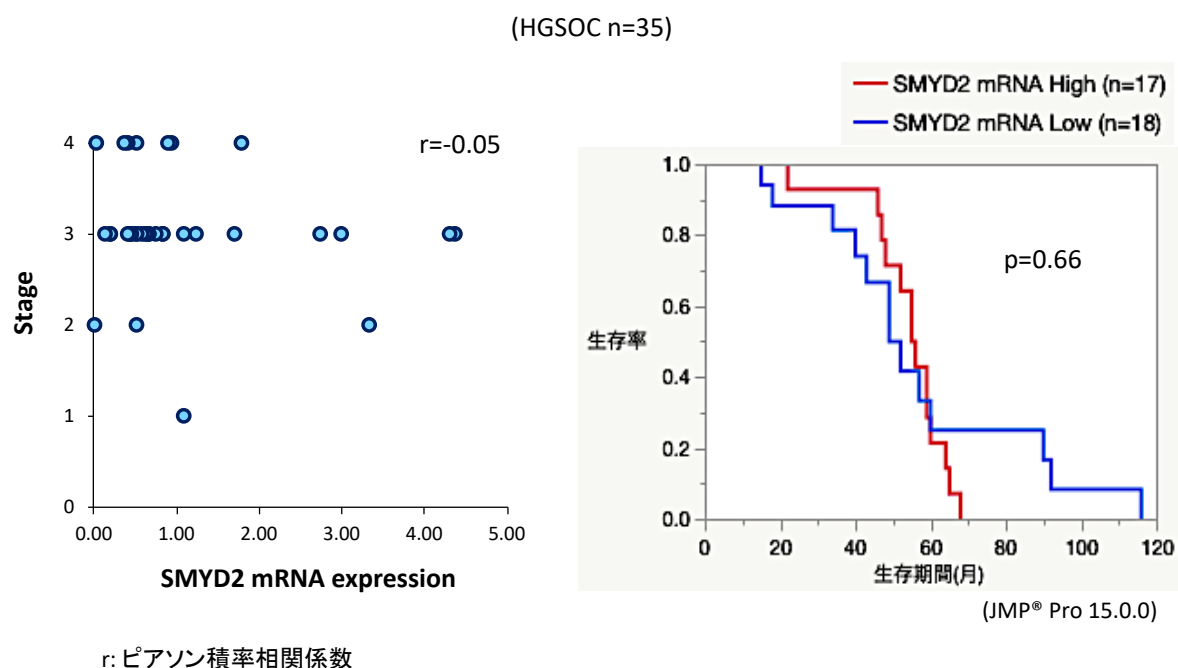


図 18) SMYD2 mRNA 発現量とステージとの相関分析および全生存期間分析

HGSOC 新鮮凍結検体 (n=35) を使用した SMYD2 mRNA 発現量との比較では、ステージと相関を認めず、全生存期間との間に有意差は認められなかった。r: ピアソンの積率相関係数

No.	年齢	Stage	OS (月)	SMYD2 mRNA 発現量比	IHCスコア
1	47	3	54	4.38	4
2	72	3	47	4.31	8
3	65	2	60	3.34	5
4	69	3	55	3.00	6
5	74	3	58	2.76	5
6	58	4	58	1.79	7
7	54	3	51	1.71	7
8	53	3	64	1.25	7
9	63	1	45	1.11	5
10	60	3	55	1.10	5
11	78	4	22	0.95	7
12	60	4	47	0.92	5
13	75	3	NA	0.85	4
14	43	3	67	0.84	8
15	40	3	NA	0.76	5
16	76	3	NA	0.67	7
17	47	3	64	0.67	7
18	60	3	15	0.65	
19	63	3	49	0.65	4
20	62	3	52	0.59	
21	80	4	NA	0.54	6
22	44	3	18	0.54	4
23	68	2	89	0.52	
24	38	3	40	0.53	6
25	40	3	60	0.47	
26	63	3	43	0.46	6
27	51	3	NA	0.45	6
28	49	3	NA	0.42	6
29	40	4	34	0.42	
30	39	4	91	0.39	8
31	49	3	48	0.22	7
32	43	3	56	0.20	7
33	76	3	115	0.16	6
34	65	4	NA	0.04	6
35	72	2	NA	0.02	3

NA: Not Available

表 2) HGSOC 臨床検体情報

BRCA 変異情報は入手困難であった。

HGSOC の FFPE 切片において、SMYD2 蛋白が発現亢進している

治療歴のない HGSOC の FFPE 切片を使用した免疫組織化学染色にて、SMYD2 の発現レベルを解析した。染色強度 (IS) を 4 段階に分類した (図 19)。

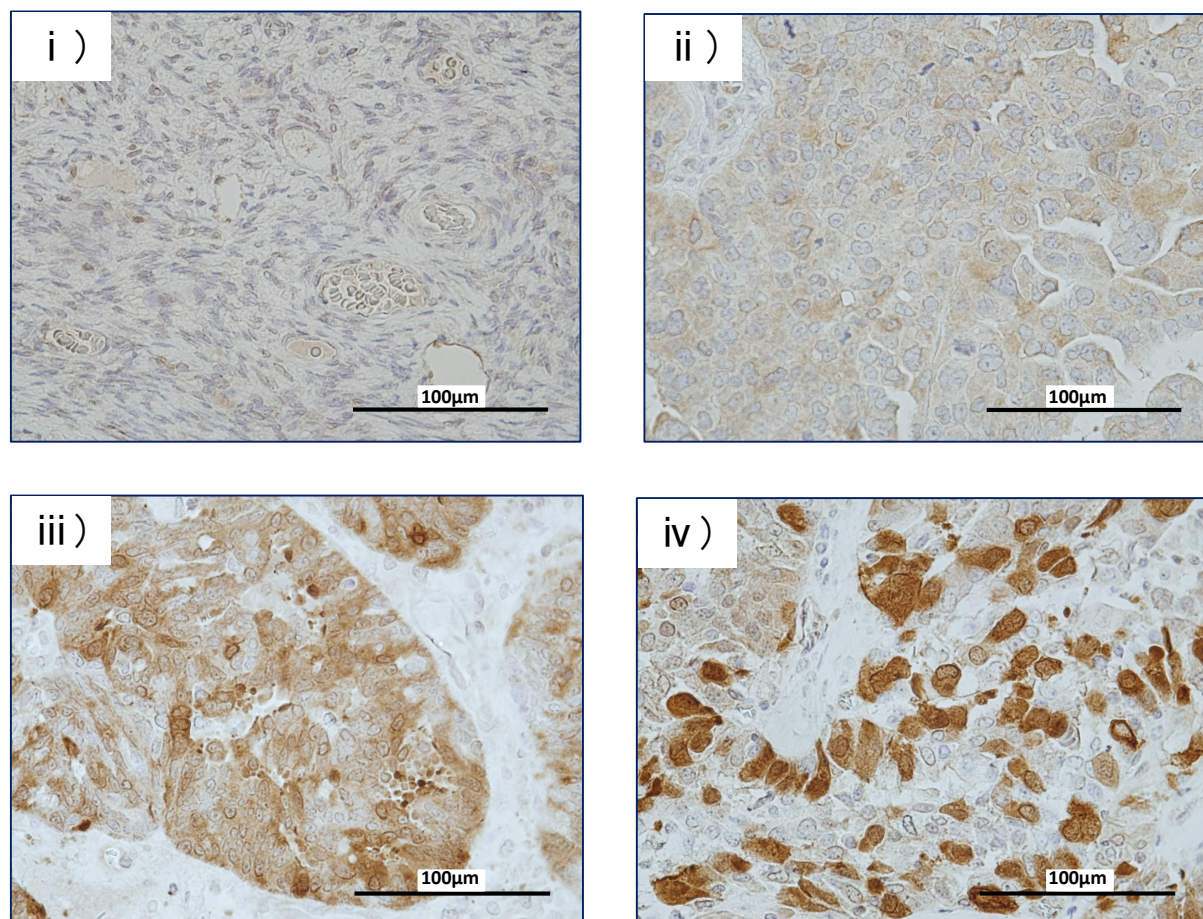


図 19) 免疫組織化学染色 (IHC) による SMYD2 の発現解析

i) 正常卵巣 (染色なし)、ii) HGSOC (弱)、iii) HGSOC (中)、IV) HGSOC (強)
SMYD2 は細胞質に局在しており、4 段階に染色強度 (IS) を分類した。

IHC スコアを、占有率 (PS) と染色強度 (IS) の合計による Allard スコアにより算出した。HGSOC (n=30) の IHC スコアの内訳を表 3 に示す。

IHCスコア	PS	IS	n (%)
3	2	1	1 (3)
4	3	1	3 (10)
	2	2	1 (3)
5	4	1	3 (10)
	3	2	3 (10)
6	5	1	3 (10)
	4	2	5 (17)
	3	3	1 (3)
7	4	3	4 (13)
	5	2	3 (10)
8	5	3	3 (10)

表 3) HGSOC (n=30) の IHC スコアの PS と IS の内訳

IHC スコア (Allard スコア) : PS+IS

PS (占有率) : Proportion Score (スコア 0: 0%, スコア 1: < 1%, スコア 2: <10%, スコア 3: <33%, スコア 4: <67%, スコア 5: > 67%)

IS (染色強度) : Intensity Score (スコア 0: 染色なし, スコア 1: 弱, スコア 2: 中等度, スコア 3: 強)

IHC スコアにて評価した結果、正常卵巣 (n=6) では全症例が陰性で、HGSOC (n=30) では 25 症例が陽性であり、HGSOC において SMYD2 蛋白の有意な発現亢進が認められた (p<0.0001) (表 4)。

	SMYD2 発現 (%)		p-value
	陰性 (n=11)	陽性 (n=25)	
正常卵巣 (n=6)	6 (100.0)	0 (0)	<0.0001
HGSOC (n=30)	5 (16.7)	25 (83.3)	

表 4) IHC における SMYD2 発現のまとめ

陰性 : IHC スコア 0-4 陽性 : IHC スコア 5-8

SMYD2 蛋白発現量とステージの相関関係、全生存期間との間に有意差を認めない

SMYD2 蛋白発現量とステージおよび全生存期間を比較した結果、ステージと相関を認めず、全生存期間との間に有意差は認められなかった（図 20、表 2）。

(HGSOC n=30)

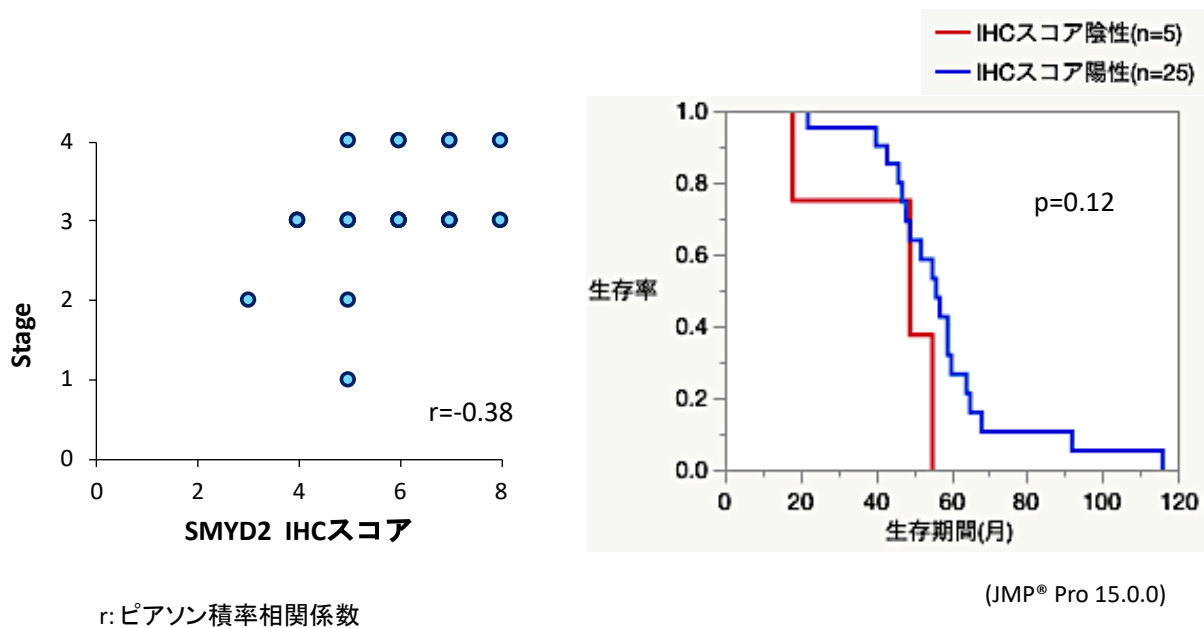


図 20) SMYD2 mRNA 発現量とステージとの相関分析および全生存期間分析

HGSOC FFPE 切片 (n=30) を使用した SMYD2 蛋白発現量との比較では、ステージと相関関係を認めず、全生存期間との間に有意差は認められなかった。r: ピアソンの積率相関係数

SMYD2 ノックダウンは HGSOC 細胞の増殖を抑制しアポトーシスを誘導する

HGSOC における SMYD2 の細胞増殖への関与を調べるため、HGSOC 細胞株である JHOS3

細胞と KURAMOCHI 細胞を使用し、siRNA によるノックダウン実験を行った。

リアルタイム qPCR 法およびウェスタンブロット法により siRNA による SMYD2 のノックダウンを確認した (図 21)。

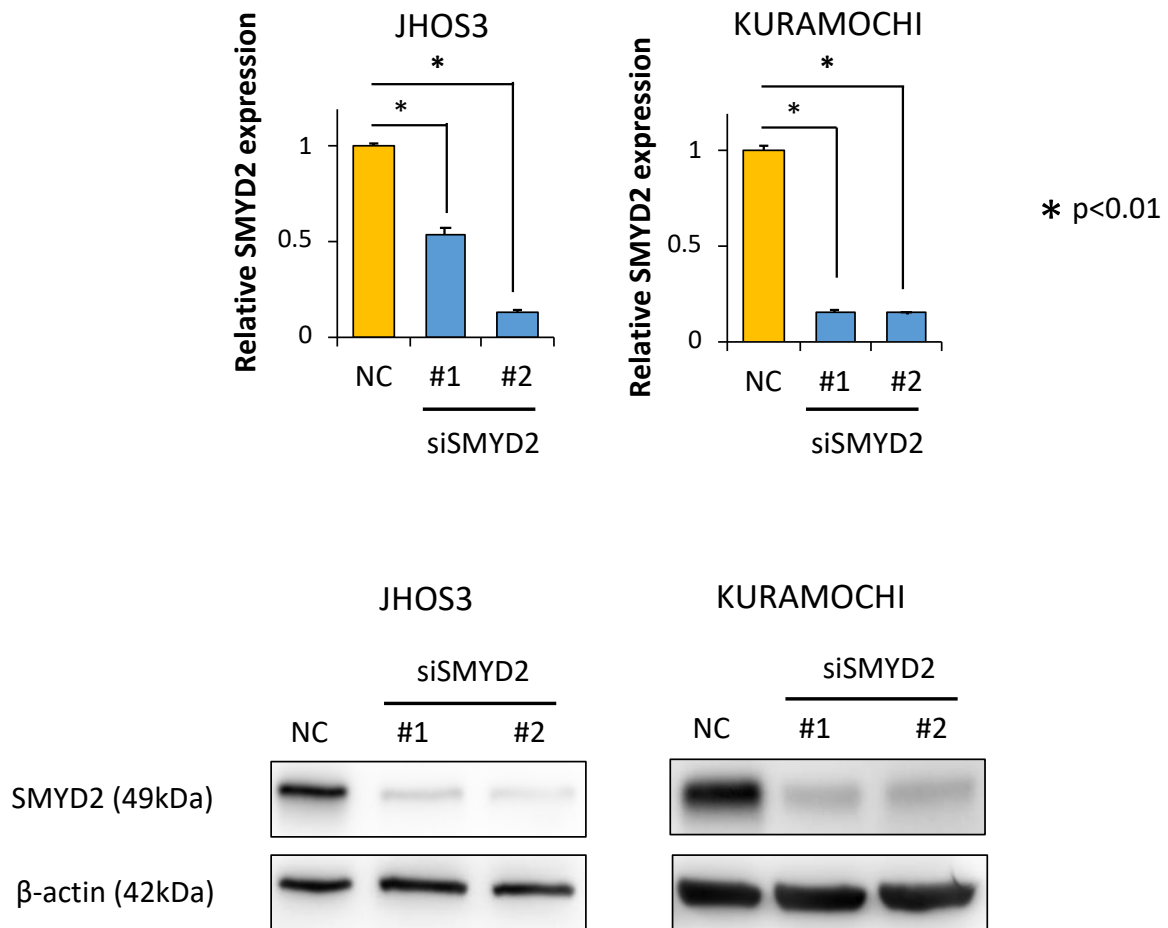


図 21) siRNA により SMYD2 をノックダウンした JHOS3 細胞と KURAMOCHI 細胞による SMYD2 の発現解析 (上:リアルタイム qPCR 法、下:ウェスタンブロット法)
JHOS3 細胞と KURAMOCHI 細胞に対して、siRNA による SMYD2 のノックダウンを確認した。Triplicate で行った実験データを平均値 \pm SD で示した。

細胞生存アッセイを行った結果、SMYD2 をノックダウンした JHOS3 細胞と KURAMOCHI 細胞において、有意な細胞増殖抑制が認められた ($p < 0.01$) (図 22)。

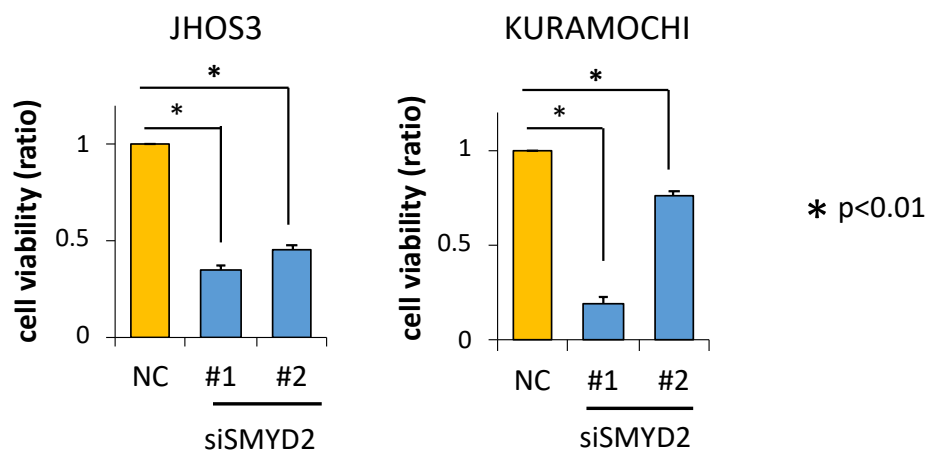


図 22) siRNA による SMYD2 ノックダウン後の細胞生存アッセイ

JHOS3 細胞と KURAMOCHI 細胞に対して、siRNA による SMYD2 のノックダウンを行った結果、有意な細胞増殖抑制が認められた ($p < 0.01$)。Triplicate で行った実験データを平均値 \pm SD で示した。

この細胞増殖抑制が細胞周期に与える影響を調べるため、フローサイトメトリーによる FACS (fluorescence-activated cell sorting) 解析を行った結果、SMYD2 をノックダウンした JHOS3 細胞および KURAMOCHI 細胞において Sub-G1 期の細胞数の有意な増加が認められた ($p < 0.01$) (図 23)。

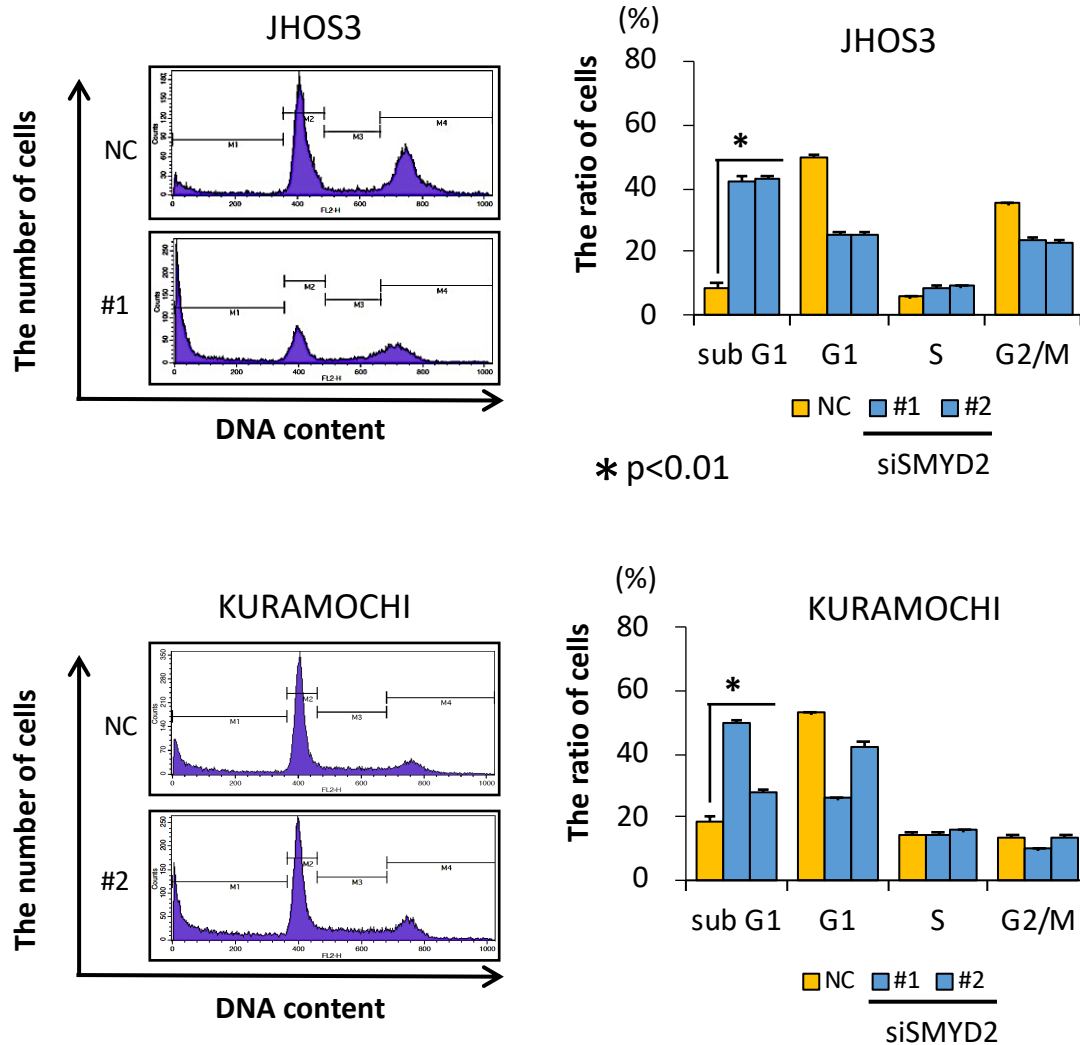


図 23) siRNA による SMYD2 ノックダウン後の細胞周期解析

JHOS3 細胞と KURAMOCHI 細胞に対して、siRNA による SMYD2 のノックダウンを行った結果、Sub-G1 期の細胞数の有意な増加が認められた ($p < 0.01$)。Triplicate で行った実験データを平均値 \pm SD で示した。

また、ウェスタンブロット法の結果、SMYD2 をノックダウンした JHOS3 細胞および KURAMOCHI 細胞において cleaved PARP の検出が認められた (図 24)。

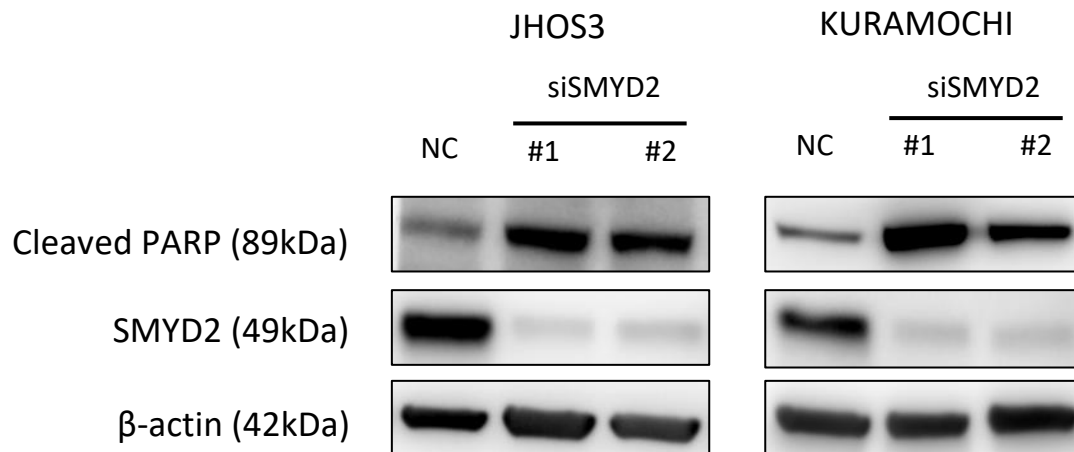


図 24) siRNA による SMYD2 ノックダウン後のウェスタンブロット法

JHOS3 細胞と KURAMOCHI 細胞に対して、siRNA による SMYD2 のノックダウンを行った結果、cleaved PARP の出現が認められた。

これらの結果から、SMYD2 のノックダウンにより、JHOS3 細胞および KURAMOCHI 細胞

の増殖抑制およびアポトーシス誘導が認められた。

SMYD2 選択的阻害剤 (LLY-507) は HGSOC 細胞の増殖を抑制しアポトーシスを誘導する

HGSOC 細胞株 9 種類に対して濃度勾配をつけて LLY-507 単剤療法による細胞生存アッ

ッセイを行った結果、dose-dependent な細胞増殖抑制が認められた (図 25)。

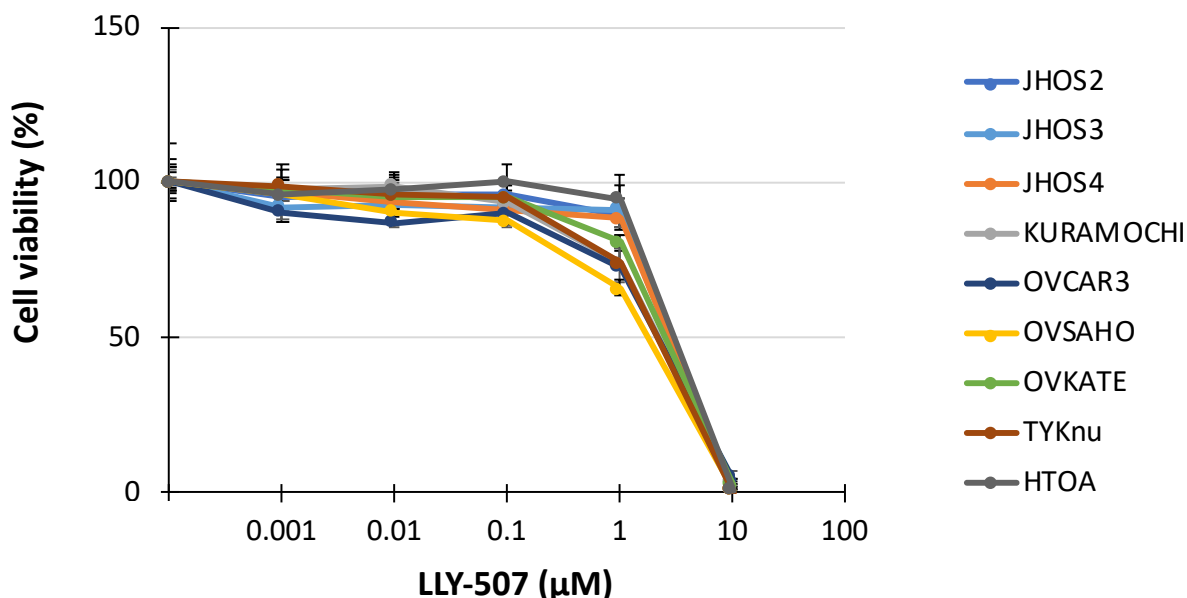


図 25) LLY-507 単剤療法による細胞生存アッセイ

LLY-507 単剤療法による細胞生存アッセイにて、dose-dependent な細胞増殖抑制が認められた。Triplicate で行った実験データを平均値±SD で示した。

IC50 値 (50% Inhibition Concentration) は、1.77-2.90 μM の範囲であった (表

5)。

cell line	JHOS2	JHOS3	JHOS4	KURAMOCHI	OVCAR3	OVSAHO	OVKATE	TYKnu	HTOA
IC50 (μM)	2.8	2.83	2.73	2.2	2.11	1.77	2.51	2.14	2.9

表 5) LLY-507 単剤療法による IC50 値

この細胞増殖抑制が細胞周期に与える影響を調べるため、フローサイトメトリーに

よる FACS (fluorescence-activated cell sorting) 解析を行った結果、LLY-507 療法

を行った JHOS3 細胞および KURAMOCHI 細胞において Sub-G1 期の細胞数の有意な増加が認められた ($p < 0.01$) (図 26)。

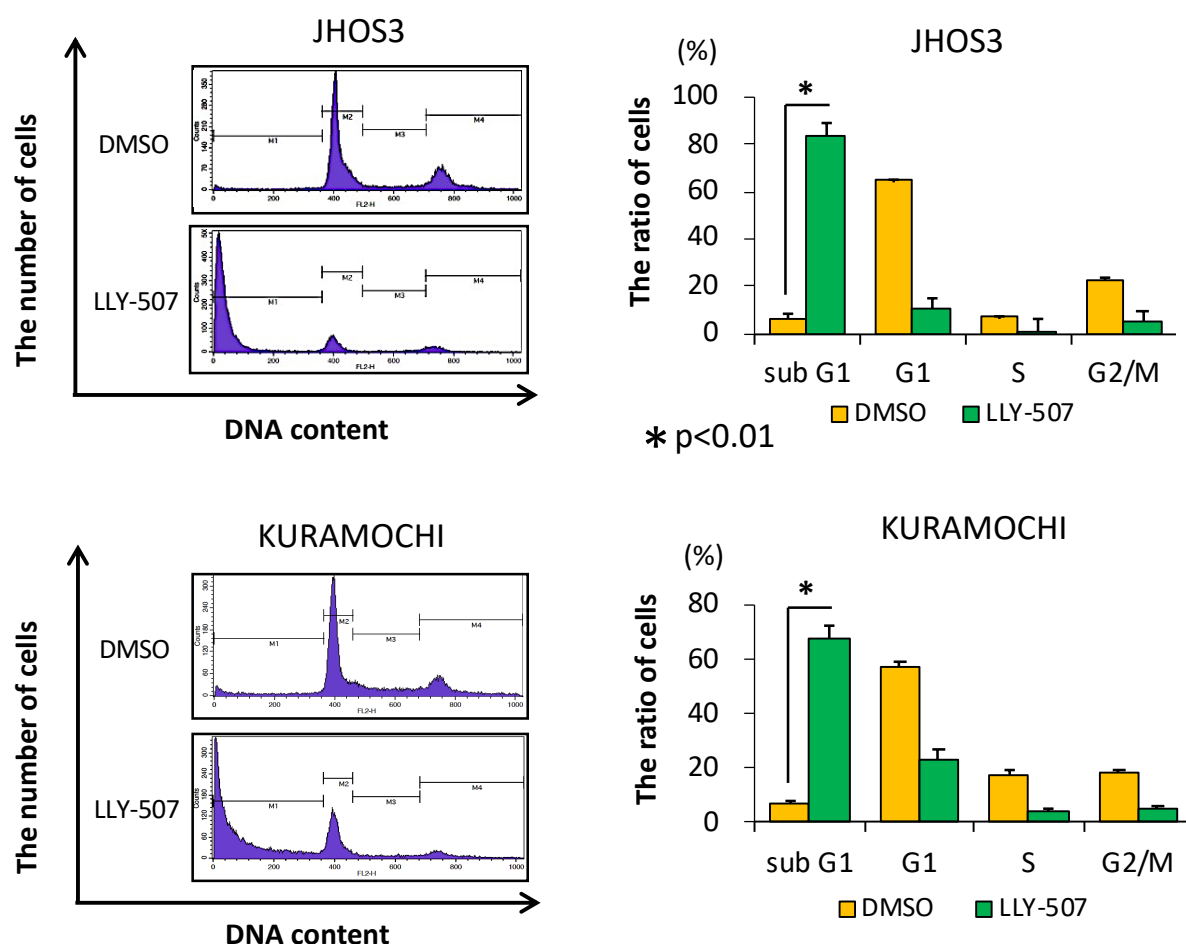


図 26) LLY-507 単剤療法による細胞周期解析

JHOS3 細胞と KURAMOCHI 細胞に対して、LLY-507 単剤療法を行った結果、Sub-G1 期の細胞数の有意な増加が認められた ($p < 0.01$)。Triplicate で行った実験データを平均値 \pm SD で示した。

また、ウェスタンブロット法の結果、LLY-507 単剤療法を行った JHOS3 細胞および KURAMOCHI 細胞において、cleaved PARP の検出が認められた (図 27)。

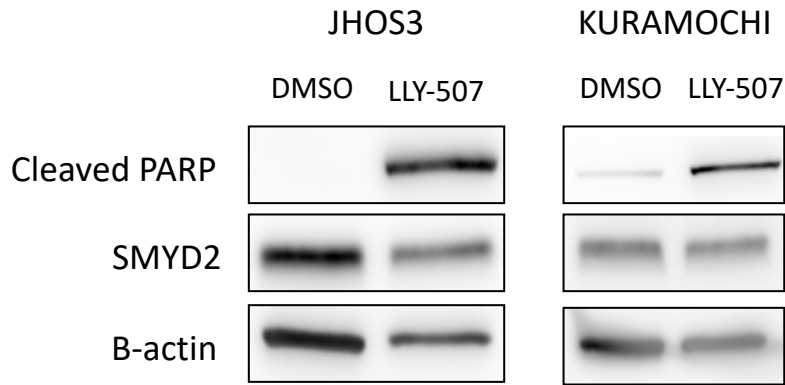


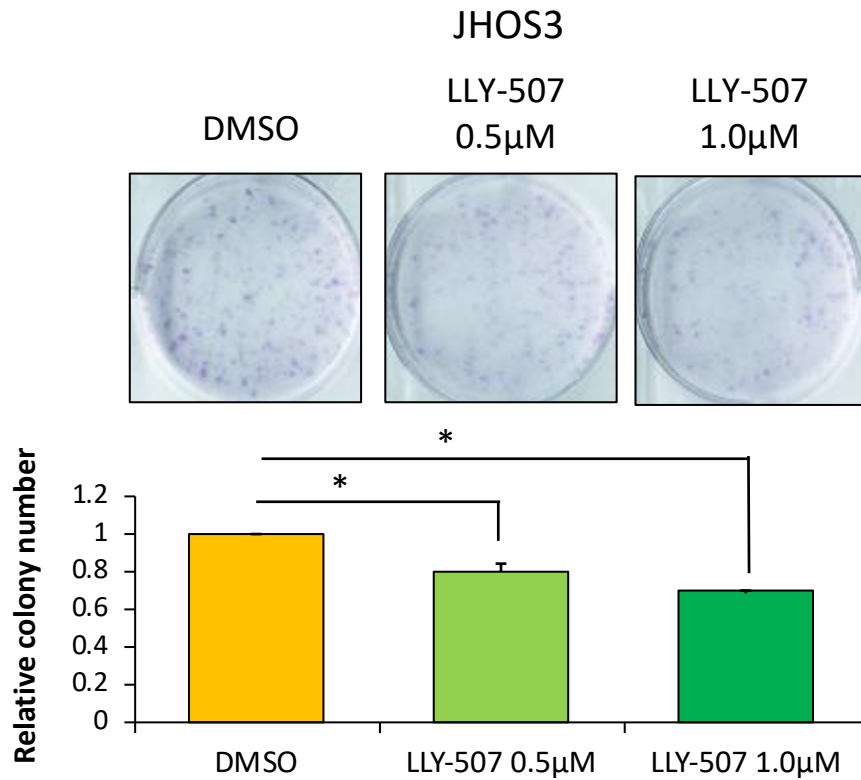
図 27) LLY-507 単剤療法によるウェスタンブロット法

JHOS3 細胞と KURAMOCHI 細胞に対して、LLY-507 単剤療法を行った結果、cleaved PARP の出現が認められた。

これらの結果から、LLY-507 単剤療法により、JHOS3 細胞および KURAMOCHI 細胞の増殖抑制およびアポトーシス誘導が認められた。

LLY-507 はコロニー形成を抑制する

JHOS3 細胞および KURAMOCHI 細胞に LLY-507 単剤療法を行ったコロニー形成試験において、dose-dependent なコロニー形成の抑制が認められた (図 28)。



* p<0.01

** p<0.05

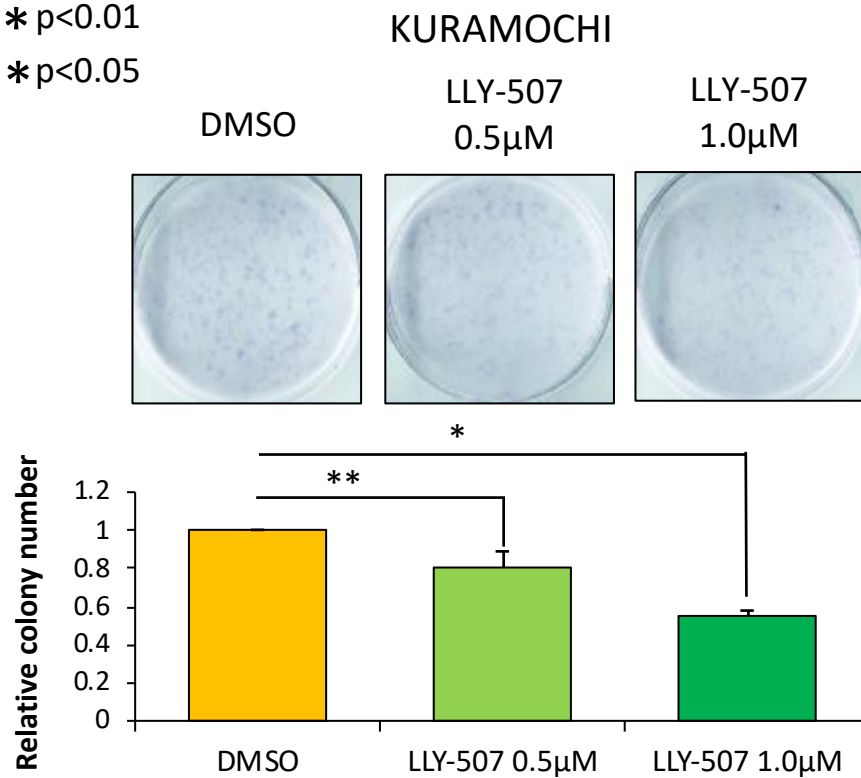
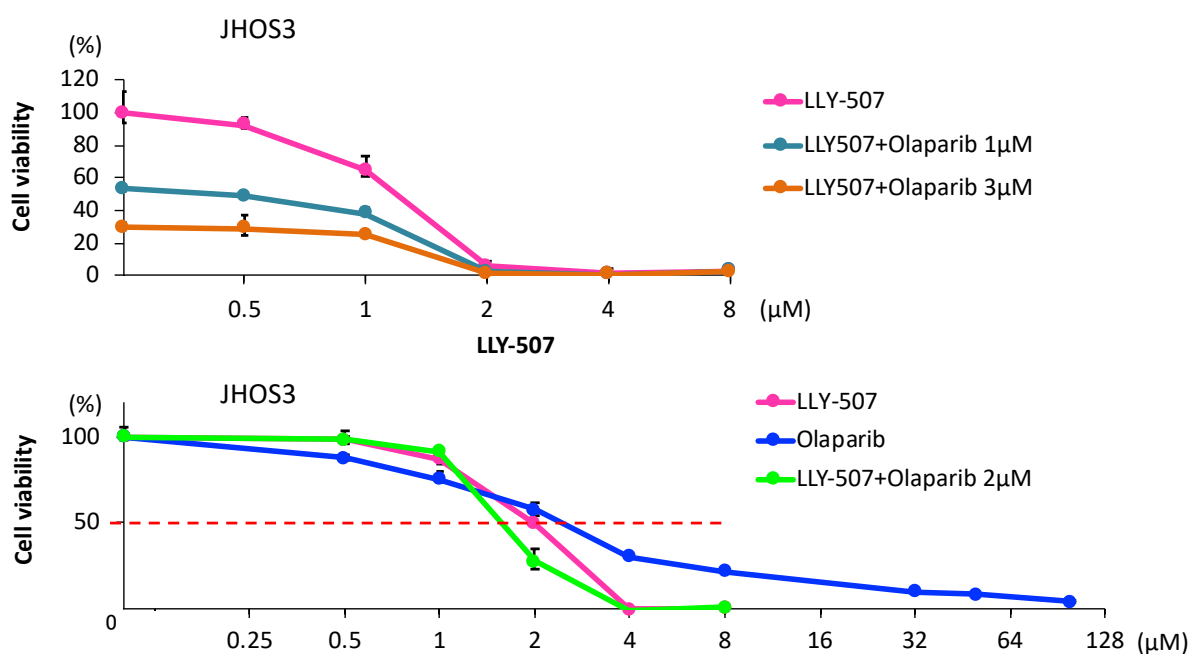


図 28) LLY-507 単剤療法を行ったコロニー形成試験

LLY-507 単剤療法を行った結果、dose-dependent なコロニー形成の抑制が認められた。Triplicate で行った実験データを平均値 \pm SD で示した。

LLY-507 と PARP 阻害剤(オラパリブ)の併用効果が認められた

卵巣癌の分子標的薬である PARP 阻害剤(オラパリブ)と LLY-507 の併用による細胞生存アッセイおよびコロニー形成試験を行った。細胞生存アッセイ (図 29) では、オラパリブ単剤の細胞増殖抑制は不十分だが、LLY-507 との併用により相加効果が認められた。また、コロニー形成試験 (図 30) においても、有意なコロニー形成抑制が認められ ($p < 0.01$)、LLY-507 とオラパリブの併用による相加効果が認められた。



	IC50 (μM)			Combination Index
	LLY-507	Olaparib	LLY507+Olaparib	
LLY-507+Olaparib 2μM	1.946	2.467	1.554	0.811

図 29) LLY-507 とオラパリブの併用による細胞生存アッセイ

オラパリブ単剤では細胞増殖抑制は不十分だが (下)、LLY-507 との併用にて相加効果が認められた (上・下)。

Triplicate で行った実験データを平均値±SD で示した。Olaparib : オラパリブ

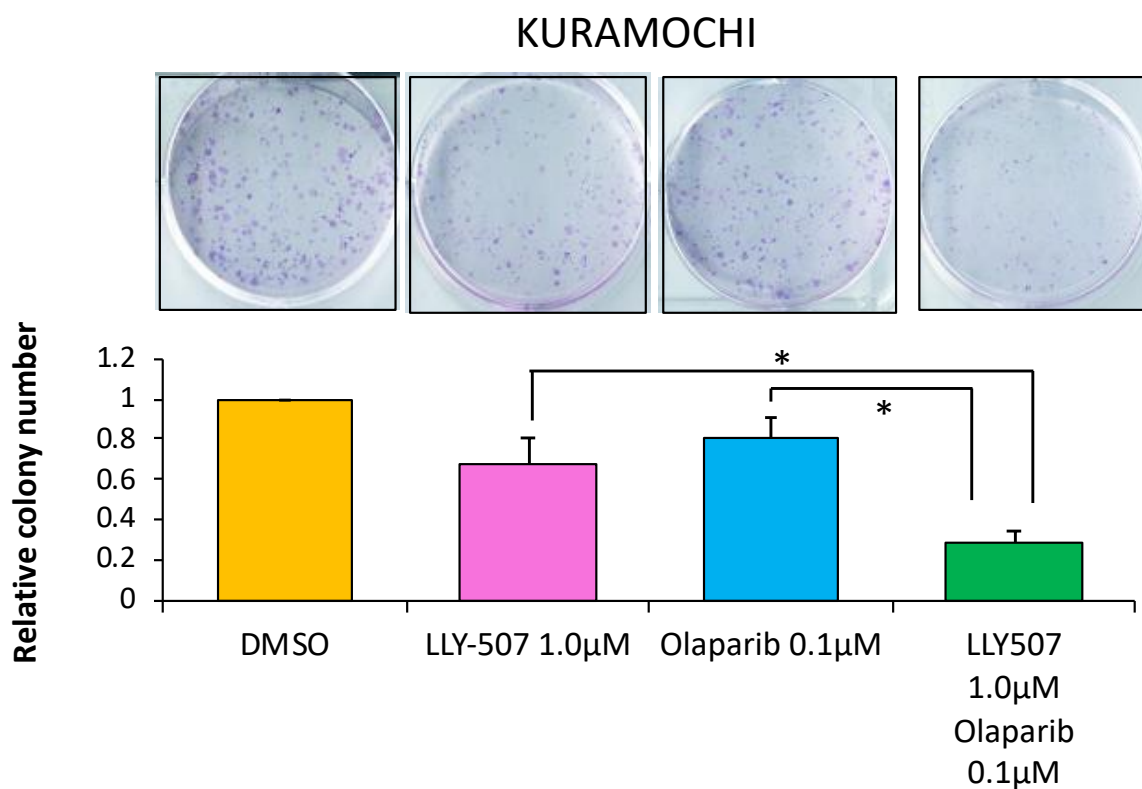
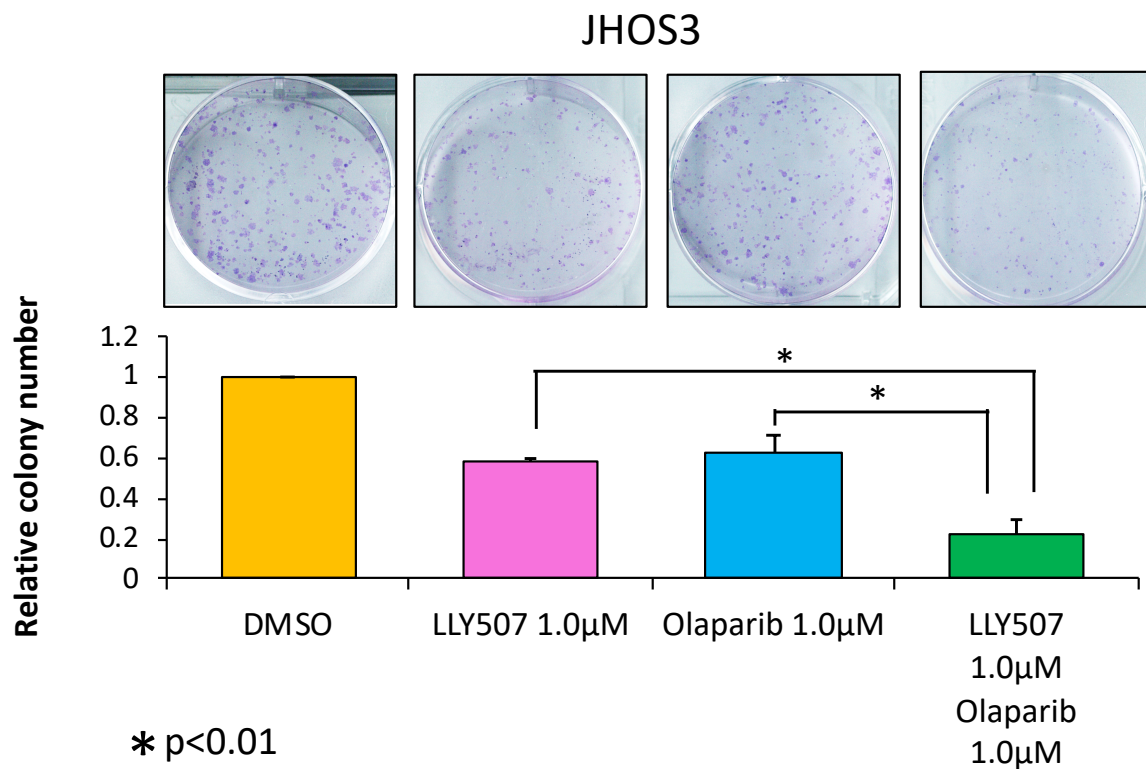


図 30) LLY-507 とオラパリブの併用によるコロニー形成試験

LLY-507 とオラパリブの併用にて有意なコロニー形成の抑制が認められ(p<0.01)、相加効果が認められた。Triplicate で行った実験データを平均値±SD で示した。

考察

PARP阻害剤のオラパリブは、BRCA遺伝子変異やHRDを有する卵巣癌およびプラチナ製剤感受性再発卵巣癌に対する維持療法として承認されている。オラパリブの作用機序は、PARP1のカタリティックドメインに結合することによりPARP1活性を低下させてDNA修復を阻害し、HRDを有するがん細胞のDNA損傷を蓄積して合成致死を誘導する。SMYD2は、PARP1の528番目のリシン基をメチル化することでPARP1を活性化することが報告されており[83]、LLY-507によるSMYD2の選択的阻害がPARP1活性を低下させる可能性が示唆される。本研究では、HGSOCに対してSMYD2が新規治療標的になり得るか、LLY-507が新規治療戦略となり得るか検証を行った。

まず、HGSOC臨床検体におけるSMYD2の発現解析を行った結果、SMYD2の有意な発現亢進が認められた($p < 0.01$) (図17、表4)。SMYD2の発現が亢進している細胞の方が、DNA傷害に伴う酸化ストレスに対してよりPARPが活性化することが報告されており[83]、HGSOCにおいて、SMYD2の発現亢進によりPARP1が活性化されやすい状態にあることが示唆された。SMYD2の発現量とStageに相関を認めず、また、全生存期間との間に有意差が認められなかったが(図18、図20)、n数を増やした検証が必要であると考えられる。HGSOCはその約半数にHRD、約15-20%にBRCA1/2変異が認められ、本研究では、HGSOC細胞株でBRCA1変異を有するJHOS3細胞およびBRCA2変異を有するKURAMOCHI細胞を使用した。JHOS3細胞、KURAMOCHI細胞に対して、siRNAによりSMYD2をノックダウンおよびLLY-507によりSMYD2を選択的に阻害した結果、有意な細胞増

殖抑制およびアポトーシス誘導が認められ ($p < 0.01$) (図22-28)、抗腫瘍効果が確認された。卵巣癌患者に対してオラパリブ400mg/日で投与した場合の血漿濃度は、A2780細胞に対してオラパリブ20 μ Mを添加することとほぼ同等であるとされており [107]、細胞生存アッセイ (図29) でのオラパリブ単剤による細胞増殖抑制は不十分ではあるが、LLY-507との併用によりオラパリブの細胞増殖抑制の増強が認められ、また、コロニー形成試験 (図30) にて有意なコロニー形成抑制 ($p < 0.01$) が認められ、LLY-507とオラパリブの併用により相加効果が認められた。

LLY-507とオラパリブの併用は、LLY-507によるSMYD2の阻害からのPARP1のメチル化の低下に引き続いてPARP1の活性が低下したことにより、オラパリブによるPARP1の抑制が増強した可能性が示唆された (図31)。

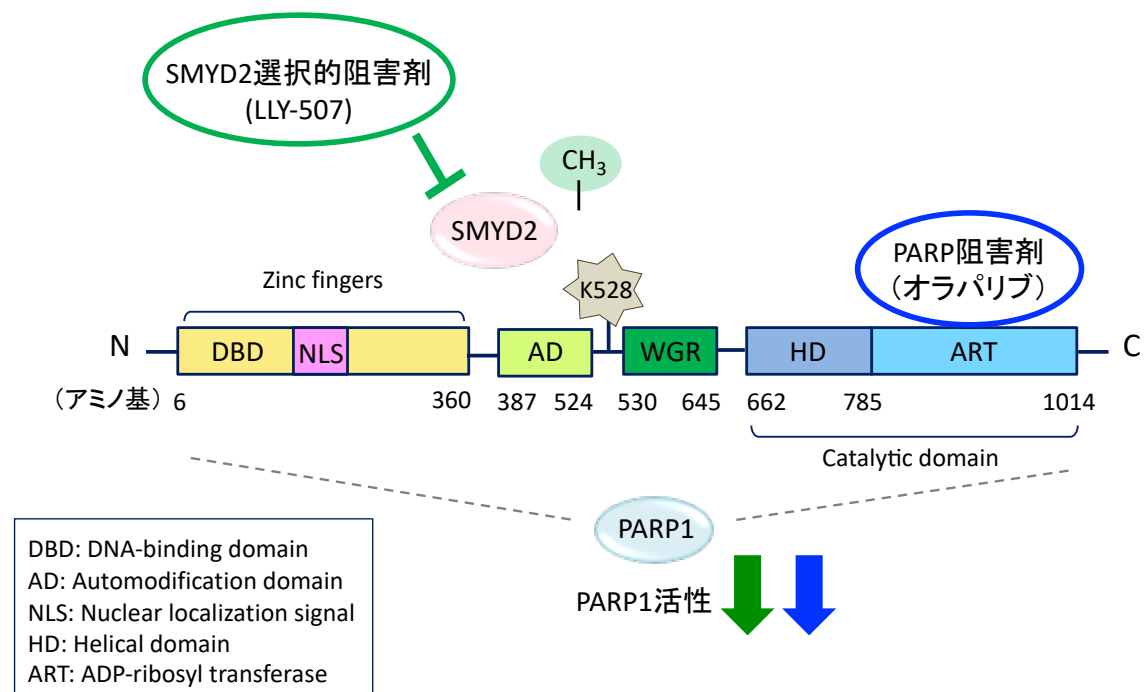


図31) LLY-507とオラパリブの併用によりPARP1の活性低下が増強する
 LLY-507はオラパリブのPARP1抑制を増強する可能性が考えられる。
 PARP1 ドメイン構造 [27]、オラパリブの結合部位 [28]

そして、LLY-507とオラパリブの併用によりPARP1の抑制が増強した結果、BRCA遺伝子変異を有するHGSOC細胞株（JHOS3細胞、KURAMOCHI細胞）の合成致死への誘導を増強した可能性が示唆された（図32）。

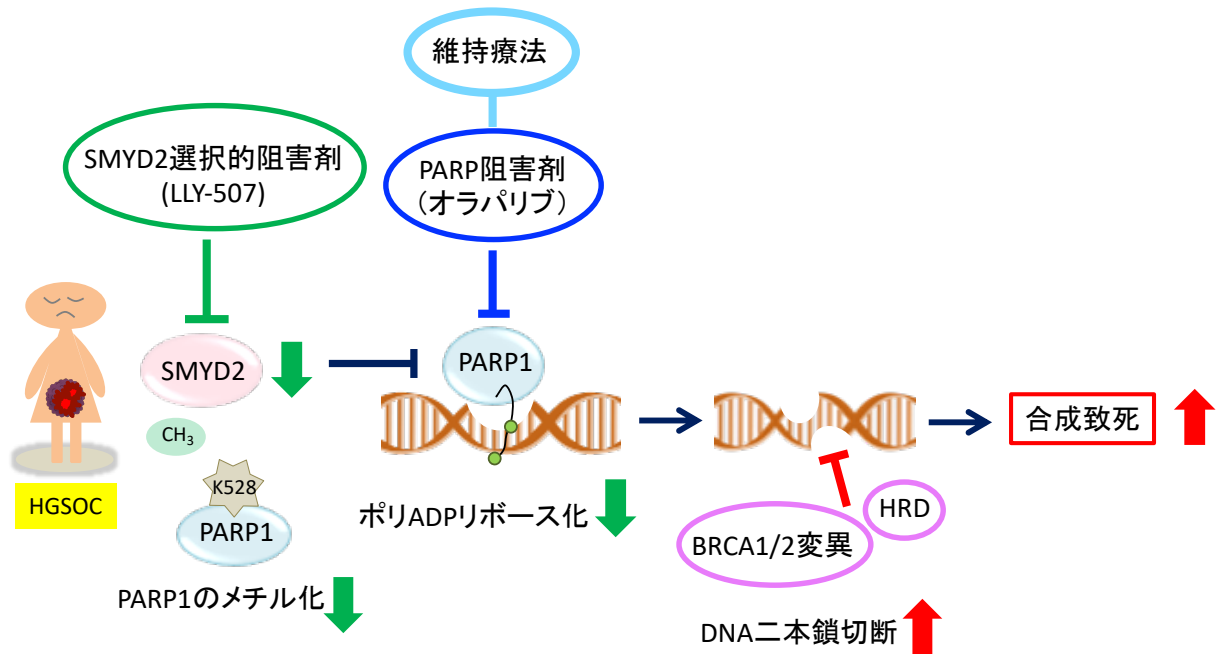
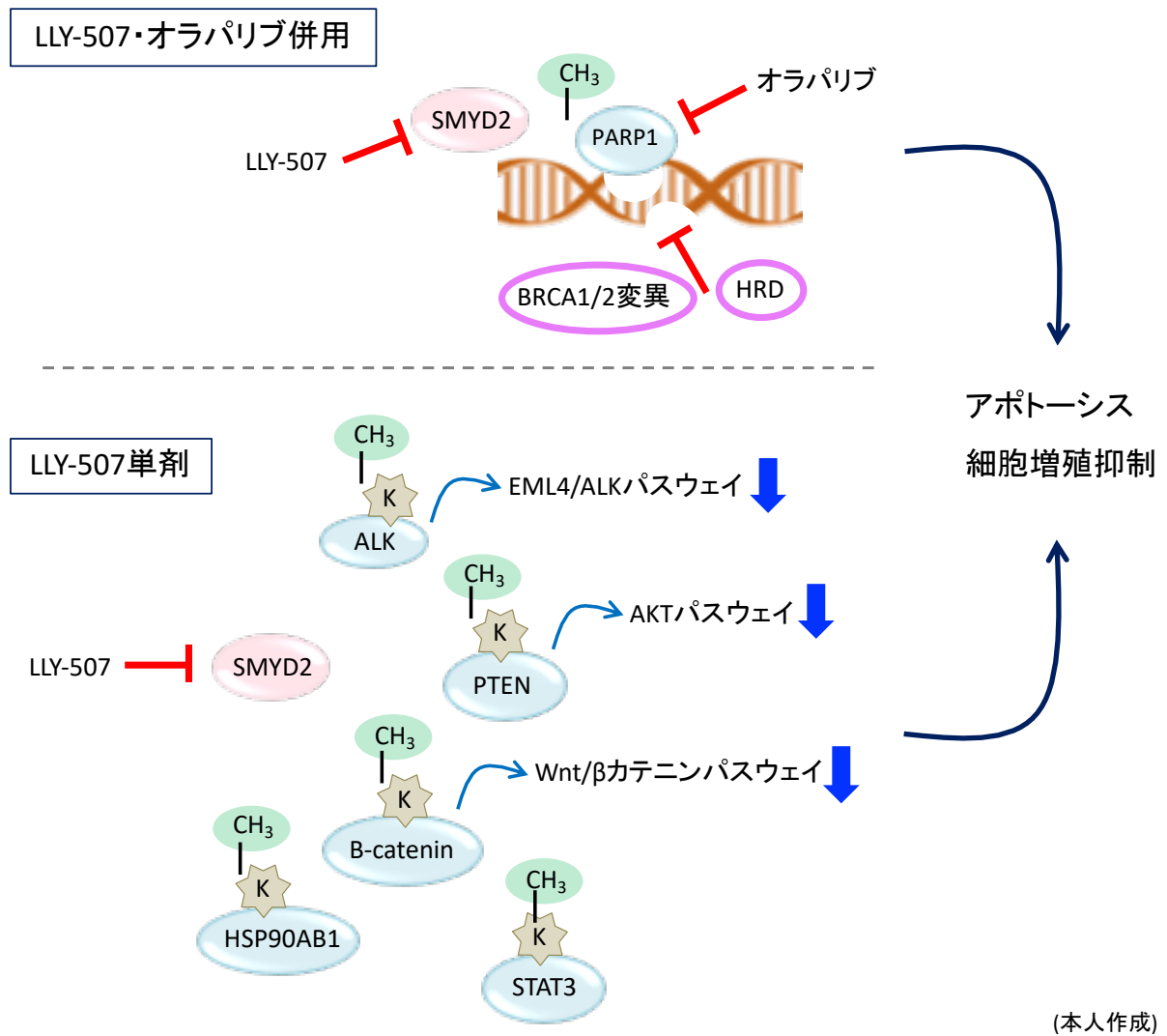


図32) HRD・BRCA遺伝子変異を有するHGSOCにおけるLLY-507とオラパリブの併用効果
HRD・BRCA遺伝子変異を有するHGSOCに対するLLY-507とオラパリブの併用療法は、合成致死への誘導が増強されたことが示唆された。

しかしながら、PARP1の528番目のリシン基のメチル化を検出する抗体の入手が困難であり、LLY-507によりPARP1の528番目のリシン基のメチル化の減少がLLY-507とオラパリブの併用による相加効果と連動することをウェスタンブロット法にて検証することができなかったため、LLY-507によるPARP1の阻害が本実験の相加効果のメカニズムであることを証明できず、本研究の限界である。

p53変異ありとp53変異なしの胃癌細胞を使用してsiRNAによりSMYD2をノックダウンした際にも細胞増殖抑制が認められたことが報告されており[100のFig. 2]、また、p53およびBRCA遺伝子変異を有さない卵巣明細胞癌細胞株においても、LLY-507により有意な細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導が報告されていることから[97]、LLY-507単剤療法による抗腫瘍効果のメカニズムにp53やBRCAの経路が主要な役割を果たしていないと考えられ、本実験のLLY-507とオラパリブの併用療法による相加効果のメカニズムは、p53やBRCAの経路を介さないLLY-507単剤による抗腫瘍効果に加えて、BRCA遺伝子変異を有するHGSOC細胞株（JHOS3細胞、KURAMOCHI細胞）におけるLLY-507とオラパリブの併用による合成致死の誘導の増強によるものであると考えられる。現時点では、本研究以外にLLY-507とオラパリブの併用を行った報告はみられないため、p53やBRCA変異を有さない細胞でのLLY-507とオラパリブの併用効果を検証することは今後の課題である。

LLY-507単剤療法による抗腫瘍効果のメカニズムとして、Wnt/ β カテニンパスウェイ[93]の抑制やPTENを活性化することによるAKTパスウェイの抑制[88]、EML4/ALKパスウェイの抑制[86]などが関与している可能性や、細胞増殖を促進するHSP90A1やSTAT3が抑制されたことなどが考えられる。SMYD2によるヒストンのメチル化（H3K4me1, H3K36me2）は転写活性に働くが、Sin3A/HDAC複合体[79]との相互作用やマクロファージへの作用[80]の報告がみられる程度で、その機能は現状では解明に至っていない。



(本人作成)

図33) LLY-507による抗腫瘍効果のメカニズム

本実験のLLY-507とオラパリブの併用療法による相加効果のメカニズムは、LLY-507単剤による抗腫瘍効果に加えて、BRCA遺伝子変異を有するHGSOC細胞株におけるLLY-507とオラパリブの併用による合成致死の誘導の増強であると考えられる。

本研究では、正常卵管上皮の検体採取が技術的に困難であったため、臨床検体を使用したSMYD2の発現解析に正常卵巣をコントロールとして使用したが、正常卵管上皮を採取していくことも今後の課題である。

また、本研究は、HGSOCに対して、LLY-507単剤療法、もしくはLLY-507とオラパリブの併用療法が新規治療戦略となり得る可能性を示唆した報告としては初めてではあ

るが、in vivoの検証が不可欠である。卵巣癌患者検体をマウスに移植して皮下もしくは卵巣腫瘍を形成したPDXマウスモデルによるin vivoな検証を行うことも今後の課題である。

癌細胞において、SMYD2によるPARPの活性化が、DNA傷害によるアポトーシスシグナルからの逃避に寄与することや[108]、反対に、PARP1の阻害が癌細胞に対してDNA傷害性薬剤や放射線治療への感受性を増強する可能性[83]が報告されており、LLY-507によるSMYD2の選択的阻害が、DNA傷害性薬剤や放射線治療への感受性の改善に寄与する可能性が示唆され、予後の改善に直結するという点において、検証すべき今後の重要な課題であると考えられる。

本研究は、in vitroの結果のみであり併用効果は可能性に過ぎず、臨床応用に向けたさらなるin vivoな検証が必要ではあるが、SMYD2選択的阻害剤（LLY-507）が卵巣癌に対する新規エピゲノム治療薬となり得る可能性、既存の化学療法・維持療法の効果を上乘せする可能性、薬剤・放射線感受性を高める可能性が示唆される。

謝辞

本研究の遂行において、曾根献文先生、織田克利先生、浜本隆二先生、金子修三先生、小松正明先生、和田美紅先生、本城晴紀先生、川田淑子先生、児嶋真千子先生、大木慎也先生、佐藤雅和先生、浅田佳代先生、田口歩先生、宮坂亜希先生、谷川道洋先生、長阪一憲先生、松本陽子先生、平池修先生、大須賀穰先生、藤井知行先生より、多大な御指導・御支援を賜りましたことを深く感謝致します。

引用文献

- [1] Bray F, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68:394-424.
- [2] Rosendhal M, et al. Restaging and survival analysis of 4036 ovarian cancer patients according to the 2013 FIGO classification for ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancer. Int J Gynecol Cancer. 2016;26:680-687.
- [3] LC Peres, et al. Invasive epithelial ovarian cancer survival by histotype and disease stage. J Natl Cancer Inst. 2019;111:60-68.
- [4] Stephanie L, et al. Epithelial Ovarian Cancer: Evolution of Management in the Era of Precision Medicine. CA CANCER J CLIN. 2019;69:280-304.
- [5] 榎本隆之. 日本産科婦人科学会婦人科腫瘍委員会報告. 第59回治療年報. 日産婦誌 2018;70:1372-1444.
- [6] 国立がん研究センターがん対策情報センター がん登録・統計. (2020)
http://gdb.ganjoho.jp/graph_db/
- [7] 榎本隆之. 日本産科婦人科学会婦人科腫瘍委員会報告. 第59回治療年報. 日産婦誌 2018;70:1372-1444.
- [8] 卵巣がん・卵管癌・腹膜癌治療ガイドライン 2020年版、金原出版

- [9] 榎本隆之. 日本産科婦人科学会婦人科腫瘍委員会報告. 2017年度患者年報. 日産婦誌 2019;71:669-724.
- [10] R. J. Kurman. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Annals of Oncology* 24 (Supplement 10): x16-x21, 2013
doi:10.1093/annonc/mdt463.
- [11] Labidi-Galy SI, et al. High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. *Nat Commun.* 2017;8:1093.
- [12] Lee, Y. et al. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J. Pathol.* 211, 26-35 (2007).
- [13] Kindelberger DW, et al. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvicserous carcinoma : evidence for a causal relationship. *Am. J. Surg. Pathol.* 31, 161-169 (2007).
- [14] Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011 Jun 29;474(7353):609-15.
doi:10.1038/nature10166.
- [15] Ksenija N, et al. Targeting DNA repair: the genome as a potential biomarker. *J Pathol* 2018; 244: 586-597.

- [16] Walsh T, et al. Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:12629–12633.
- [17] Karoline B K, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*. 2017 Jun 20;317(23):2402–2416. doi: 10.1001/jama.2017.7112.
- [18] Nasim M, et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *Cancer Inst*. 2013 Jun 5;105(11):812–22. doi: 10.1093/jnci/djt095.
- [19] Collins N, et al. Absence of methylation of CpG dinucleotides within the promoter of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 in normal tissues and in breast and ovarian cancers. *BrJ Cancer* 1997; 76: 1150-1156.
- [20] MS Piver, et al. Treatment of ovarian cancer at the crossroads: 50 years after single-agent melphalan chemotherapy. *Oncology (Williston Park)*. 2006;20:1156, 1158.
- [21] Eric L, et al. The effect of maximal surgical cytoreduction on sensitivity to platinum-taxane chemotherapy and subsequent survival in patients with advanced ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 108 (2008) 276-281

[22] Karam A, et al. Fifth Ovarian Cancer Consensus Conference of the Gynecologic Cancer InterGroup: first-line interventions. *Ann Oncol.* 2017;28:711-717.

[23] MK Wilson, D Aoki, et al. Fifth Ovarian Cancer Consensus Conference of the Gynecologic Cancer InterGroup: recurrent disease. *Ann Oncol.* 2017;28:727-732.

[24] McGee J, et al. Fifth Ovarian Cancer Consensus Conference: individualized therapy and patient factors. *Ann Oncol.* 2017;28:702-710.

[25] <https://www.astrazeneca.co.jp/media/press-releases/2020/2020122802.html>

[26] <https://www.takeda.com/ja-jp/announcements/2020/parp2/>

[27] Jennine M.D, et al. PARP-1 Activation Requires Local Unfolding of an Autoinhibitory Domain. *Molecular Cell* 60, 755-768, December 3, 2015.

[28] Levani Z, et al. Structural basis for allosteric PARP-1 retention on DNA breaks. *Science* 368, eaax6367 (2020). DOI: 10.1126/science.aax6367.

[29] Junko M, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res*; 72(21) November 1, 2012.

[30] Michèle R, et al. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer* 10: 293-301 (2010). doi:10.1038/nrc2812.

- [31] Thomas H. The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: Clearing up the misunderstandings. *Molecular Oncology* (2011) 387–393. doi:10.1016/j.molonc.2011.07.001.
- [32] Helleday T, et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Rev Cancer*. 2008;8:193–204.
- [33] Murai J, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Res*. 2012;72:5588–5599.
- [34] Gelmon KA, et al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol* 2011;12:852–861. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21862407>.
- [35] Elit L, et al. Palliative systemic therapy for women with recurrent epithelial ovarian cancer: current options. *Onco Targets Ther* 2013;6:107–118. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23459506>.
- [36] Suh DH, et al. Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2014. *J Gynecol Oncol* 2015;26:156–167. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25872896>.

[37] Pujade-Lauraine E, et al. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017;18:1274-1284. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28754483>.

[38] Fong PC, et al. Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol* 2010;28:2512-2519. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20406929>.

[39] Ledermann J, et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med* 2012;366:1382-1392. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22452356>.

[40] National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology: ovarian cancer version 1. 2020 (https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/ovarian.pdf).

[41] AstraZeneca. Lynparza (olaparib) tablets, for oral use: prescribing information. 2018 (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/208558s0011b1.pdf).

- [42] MR Mirza, et al. Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer. *N Engl J Med* 2016;375:2154-2164.
- [43] MR Mirza, et al. Niraparib plus bevacizumab versus niraparib alone for platinum-sensitive recurrent ovarian cancer (NSGO-AVANOVA2/ENGOT-ov24): a randomised, phase 2, superiority trial. *Lancet Oncol* 2019; 20: 1409-19
- [44] Christoph P, et al. Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer. *Nat Rev Genet* 14: 765-780. doi:10.1038/nrg3554
- [45] Stephen B, et al. A decade of exploring the cancer epigenome—biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 11: 726-734. doi:10.1038/nrc3130
- [46] Jones P. A. & Baylin S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev. Genet.* 3, 415-428 (2002).
- [47] Jones P. A. & Baylin S. B. The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683-692 (2007).
- [48] Esteller M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 358, 1148-1159 (2008).

- [49] Y Saito, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9, 435-443 (2006).
- [50] Luger K, et al. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol* 2005; 15: 188-196.
- [51] B.D. Strahl, et al. The language of covalent histone modifications, *Nature* 403 (2000) 41e45. <https://doi.org/10.1038/47412>.
- [52] Greer EL & Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Rev. Genet.* 13, 343-357 (2012).
- [53] Xi Zhang, et al. Emerging roles of lysine methylation on non-histone proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* (2015) 72:4257-4272. DOI 10.1007/s00018-015-2001-4.
- [54] Kyle K, et al. Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. *Nat Rev Mol Cell Bio* 16: 5-17. doi:10.1038/nrm3915.
- [55] Black JC, et al. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol Cell* 2012; 48: 491-507.
- [56] Wagner EJ, et al. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 115-126.

- [57] Kwangbeom Hyun, et al. Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp & Mol Medi* (2017) 49, e324; doi:10.1038/emm.2017.11.
- [58] Paik WK, et al. Historical review: the field of protein methylation. *Trends Biochem. Sci.* 32, 146-152 (2007).
- [59] Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* (2002) 12(2):198-209 4.
- [60] Zhou VW, et al. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Rev. Cancer* 12, 7-18 (2011).
- [61] Bannister AJ & Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381-395 (2011)
- [62] RJ Sims 3rd, et al. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* (2003) 19(11):629-639 5.
- [63] Martin C, et al. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2005) 6(11):838-849.
- [64] Sabbattini P, et al. An H3K9/S10 methyl-phospho switch modulates Polycomb and Pol II binding at repressed genes during differentiation. *Mol. Biol. Cell.* 25, 904-915 (2014).

- [65] Levy D. et al. Lysine methylation of the NF- κ B subunit RelA by SETD6 couples activity of the histone methyltransferase GLP at chromatin to tonic repression of NF- κ B signaling. *Nature Immunol.* 12, 29-36 (2011).
- [66] Xie Q, et al. Methylation-mediated regulation of E2F1 in DNA damage-induced cell death. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 31, 139-146 (2011).
- [67] Botuyan MV, et al. Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* 127, 1361-1373 (2006).
- [68] Dhayalan A, et al. Specificity analysis-based identification of new methylation targets of the SET7/9 protein lysine methyltransferase. *Chem. Biol.* 18, 111-120 (2011).
- [69] Kwak YT, et al. Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol. Cell* 11, 1055-1066 (2003).
- [70] Rho J, et al. Arginine methylation of Sam68 and SLM proteins negatively regulates their poly(U) RNA binding activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 466, 49-57 (2007).
- [71] Swiercz R, et al. Ribosomal protein rpS2 is hypomethylated in PRMT3-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 282, 16917-16923 (2007).

- [72] Carr SM, et al. Interplay between lysine methylation and Cdk phosphorylation in growth control by the retinoblastoma protein. *EMBO J.* 30, 317-327 (2011).
- [73] Martin G, et al. Arginine methylation in subunits of mammalian pre-mRNA cleavage factor I. *RNA* 16, 1646-1659 (2010).
- [74] Mazur PK, et al. SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer. *Nature* 510, 283-287 (2014).
- [75] Lu R & Wang G, G Tudor. A versatile family of histone methylation 'readers' . *Trends Biochem. Sci.* 38, 546-555 (2013).
- [76] Gayatri S & Bedford MT. Readers of histone methylarginine marks. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 702-710 (2014).
- [77] Musselman CA, et al. Towards understanding methyllysine readout. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1839: 686-693.
- [78] M Abu-Farha, et al. The tale of two domains: proteomics and genomics analysis of SMYD2, a new histone methyltransferase. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7, 560-572.
- [79] MA Brown, et al. Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase

that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Mol. Cancer* 5 (2006) 26. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-26>.

[80] Xu G, et al. The histone methyltransferase Smyd2 is a negative regulator of macrophage activation by suppressing interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α) production. *J. Biol. Chem.* 290(9), 5414-5423 (2015).

[81] J Huang, et al. Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation, *Nature* 444 (2006) 629e632. <https://doi.org/10.1038/nature05287>.

[82] HS Cho, et al. RB1 methylation by SMYD2 enhances cell cycle progression through an increase of RB1 phosphorylation. *Neoplasia*, 14, 2012, 476e486. <https://doi.org/10.1593/neo.12656>.

[83] L Piao, et al. The histone methyltransferase SMYD2 methylates PARP1 and promotes poly(ADP-ribosyl)ation activity in cancer cells, *Neoplasia* 16 (2014) 257e264. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.03.002>.

[84] R Hamamoto, et al. SMYD2-dependent HSP90 methylation promotes cancer cell proliferation by regulating the chaperone complex formation, *Cancer Lett.* 351 (2014) 126e133. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.05.014>.

- [85] X Zhang, et al. Regulation of estrogen receptor α by histone methyltransferase SMYD2-mediated protein methylation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110,17284-17289 (2013).
- [86] R Wang, et al. Effects of SMYD2-mediated EML4-ALK methylation on the signaling pathway and growth in non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.* 108 (2017) 1203e1209. <https://doi.org/10.1111/cas.13245>.
- [87] Xiaolan D, et al. Critical roles of SMYD2-mediated b-catenin methylation for nuclear translocation and activation of Wnt signaling. *Oncotarget* 8 (2017) 55837e55847, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19646>.
- [88] M Nakakido, et al. Dysregulation of AKT pathway by SMYD2-mediated lysine methylation on PTEN, *Neoplasia* 17 (2015) 367e373. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2015.03.002>.
- [89] N Reynoird, et al. Coordination of stress signals by the lysine methyltransferase SMYD2 promotes pancreatic cancer. *Genes Dev.* 2016 Apr 1;30(7):772-85. doi: 10.1101/gad.275529.115.
- [90] LX Li, et al. Lysine methyltransferase SMYD2 promotes triple negative breast cancer progression, *Cell Death Dis.* 9 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0347-x>.

- [91] Hannah N, et al. LLY-507, a Cell-active, Potent, and Selective Inhibitor of Protein-lysine Methyltransferase SMYD2. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 290, NO. 22, pp. 13641-13653, May 29, 2015.
- [92] Yi Z, et al. Regulation of EZH2 by SMYD2-Mediated Lysine Methylation Is Implicated in Tumorigenesis. Cell Reports 29, 1482-1498, November 5, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.004>.
- [93] Fanchao M, et al. SMYD2 suppresses APC2 expression to activate the Wnt/ β -catenin pathway and promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer.
- [94] Chen, A. PARP inhibitors: its role in treatment of cancer. Chin. J. Cancer 30, 463-471 (2011).
- [95] R Hamamoto, et al. Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis, Nat Publ. Gr. 15 (2015) 110-124. <https://doi.org/10.1038/nrc3884>.
- [96] L Yan, et al. Inhibition of SMYD2 suppresses tumor progression by down-regulating microRNA-125b and attenuates multi-drug resistance in renal cell carcinoma. Theranostics. 2019, Oct, 22;9(26):8377-8391. doi:10.7150/thno.37628.

- [97] M Kojima, et al. The histone methyltransferase SMYD2 is a novel therapeutic target for the induction of apoptosis in ovarian clear cell carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2020 Nov;20(5):153. doi: 10.3892/ol.2020.12014.
- [98] JJ Sun, et al. SMYD2 promotes cervical cancer growth by stimulating cell proliferation. *Cell Biosci.* 2019 Sep 18;9:75. doi:10.1186/s13578-019-0340-9.
- [99] S Komatsu, et al. Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 30, 1139-1146 (2009).
- [100] S Komatsu, et al. Overexpression of SMYD2 contributes to malignant outcome in gastric cancer. *Br. J. Canc.* 112 (2015)357-364.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2014.543>.
- [101] LHT Sakamoto, et al. SMYD2 is highly expressed in pediatric acute lymphoblastic leukemia and constitutes a bad prognostic factor. *Leuk Res.* 2014 Apr;38(4):496-502. doi: 10.1016/j.leukres.2014.01.013.
- [102] Shan-Ru Z, et al. Positive Expression of SMYD2 is Associated with Poor Prognosis in Patients with Primary Hepatocellular Carcinoma. 2018; 9(2): 321-330. doi: 10.7150/jca.22218.

- [103] S Ooki, et al. Oncogenic histone methyltransferase EZH2: a novel prognostic marker with therapeutic potential in endometrial cancer, *Oncotarget* 8 (2017) 40402e40411, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16316>.
- [104] T Fukuda, et al. The anti-malarial chloroquine suppresses proliferation and overcomes cisplatin resistance of endometrial cancer cells via autophagy inhibition, *Gynecol. Oncol.* 137 (2015) 538e545. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.03.053>.
- [105] YLi, et al. Elevated expression of CXC chemokines in pediatric osteosarcoma patients, *Cancer* 117 (2011) 207e217, <https://doi.org/10.1002/cncr.25563>.
- [106] SH Jang, et al. High EZH2 protein expression is associated with poor overall survival in patients with luminal a breast cancer, *J B Can*19(2016)53e60. <https://doi.org/10.4048/jbc.2016.19.1.53>.
- [107] A Vaidyanathan, et al. ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells *Br J Cancer.* 2016 Aug 9;115(4):431-41. doi: 10.1038/bjc.2016.203.
- [108] Peralta-Leal A, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in carcinogenesis: potential role of PARP inhibitors in cancer treatment. *Clin Transl Oncol* 10, 318-323 (2008).