

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09162

研究課題名(和文)新規ROR 転写共役因子を標的とした去勢抵抗性前立腺癌免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of immunotherapy for castration resistant prostate cancer targeting a novel cofactor of RORgamma

研究代表者

高橋 さゆり (Takahashi, Sayuri)

東京大学・医科学研究所・特任講師

研究者番号：40313217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：RORgamma (RAR-related orphan receptor- $\gamma$ )はIL-6、TGF- $\beta$ とともにnaive T cellがhelper T cell 17(Th17)へ分化するのに必須の核内受容体であるが機能は未知である。我々は核内受容体ROR $\gamma$ がCRPCの治療標的になりうると仮定し、ROR $\gamma$ の転写活性に必須となる転写共役因子を同定し機能を解析した。ROR $\gamma$ の共役転写因子としてESS2遺伝子を同定した。ESS2遺伝子が前立腺癌組織において核内でNFkB/CHD1と結合しクロマチンリモデリングを制御、TNF、CCL2等の標的遺伝子の発現を調整し癌の増殖に働くことを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)に対して種々の治療薬が臨床応用されているもののCRPCに至り死亡する症例数は本邦でも年間12,000例と多く、治療成績の改善には副作用の少ない新規治療薬の開発が望まれる。今回我々が同定した新規ESS2遺伝子は前立腺癌症例の9割以上に高発現していることが分かり治療ターゲットとして適切である。機能解析によりESS2遺伝子が前立腺癌増殖に強く作用することが証明された。また作用機序として細胞のクロマチンリモデリング因子に作用し増殖を制御することが分かった。このESS2を阻害する薬剤が前立腺癌の新規治療薬として治療成績の改善に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We screened ESS2 gene as a novel cofactor of ROR gamma. We evaluated the involvement of the transcriptional coregulator ESS2 in prostate cancer. ESS2-knockdown PC3 cells dramatically inhibited proliferation in tumor xenografts in nude mice. Microarray analysis revealed that ESS2 regulated mRNA levels of chromodomain helicase DNA binding protein 1 (CHD1)-related genes and other cancer-related genes, such as PPAR- $\alpha$ , WNT5A, and TGF- $\beta$ , in prostate cancer. ESS2 knockdown reduced nuclear factor (NF)-kB/CHD1 recruitment and histone H3K36me3 levels on the promoters of target genes (TNF and CCL2). Tamoxifen-inducible ESS2-knockout mice showed delayed prostate development with hypoplasia and disruption of luminal cells in the ventral prostate.

研究分野：泌尿器科学関連

キーワード：前立腺癌 ROR ESS2

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌はアンドロゲン遮断療法によく反応するが、数年後には多くが CRPC (去勢抵抗性前立腺癌)となる。CRPC に対しては、エンザルタミド、アピラテロン等の新規のホルモン治療薬やカバジタキセル等の抗がん薬が開発された。しかし副作用により投与困難な症例や、治療に反応せず死亡に至る症例も多く、副作用が少ない新規の治療薬の開発が急務である。

近年、癌治療における免疫療法が着目されている。特に臨床応用されて間もない免疫チェックポイント阻害剤は、種々の癌において有効性が期待される薬剤である。しかし前立腺癌における免疫療法の研究は進んでおらず、また免疫チェックポイント阻害剤は無効であったという報告が多い。

申請者らは、これまで CRPC で多く同定される AR 点変異 T877A を前立腺のみに組織時期特異的に発現できるコンディショナルマウスを作成し、Wnt5a 蛋白が前立腺癌を増悪させることを明らかにした。Wnt5a は、胎生期の発生・形態形成に関わる必須の蛋白で、成体での発現は知られていなかったが、ヒト前立腺癌組織では Wnt5a が発現していることを確認し、その臨床的意義を裏付けた。このメカニズムの詳細を分析し、間質細胞の Wnt5a は IL6、TGF $\beta$ 2、INF $\gamma$ 、TNF、EGF、IGF2 等の炎症性サイトカインの分泌を促進し、これらのサイトカインが前立腺癌細胞を増殖させることを解明した。これらの知見から、IL6、TGF $\beta$ 2、INF $\gamma$ 、TNF 等の炎症性サイトカインを抑制することが、CRPC に対する新規の治療標的となりうると考えた。一方、2015 年に Huang らは、CD4+細胞から Th17 細胞への分化には核内受容体 ROR $\gamma$  (RAR-related orphan receptor- $\gamma$ ) の発現が必須であることを報告した。分化した Th17 細胞は IL6、TGF $\beta$ 、TNF 等のケモカインを産出し炎症を惹起する。つまり、ROR $\gamma$  を阻害しケモカイン産生を抑制することで、CRPC の進行を抑制できる可能性がある。これに対して、申請者らは飛行時間質量分析計 (TOF/MS) にて ROR $\gamma$  の転写共役因子として ESS2 蛋白を同定した。そこで本研究では、ROR $\gamma$  阻害の CRPC に対する作用機序を明らかにするとともに ESS2 抗体薬の創薬を行い、CRPC に対する新規免疫療法の開発を進めたい。

### 2. 研究の目的

ROR $\gamma$  は 2000 年に発見された核内レセプターで、これが炎症性サイトカインを分泌する Th15 細胞の分化に必須であることが Nature 誌に報告されたのは 2015 年のことである。申請者は世界に先駆けて Wnt5a ノックアウトマウスを用いて炎症性サイトカインと前立腺癌増悪のメカニズムを解明、報告してきた。まだ前立腺癌と ROR $\gamma$  の関連に着目した研究は報告されていない。ROR $\gamma$  を介した前立腺癌の増殖機構が明らかとなり、われわれがスクリーニングした ROR $\gamma$  の共役転写因子である ESS2 の抗体を用いて CRPC に対する新規薬剤の開発につなげることが研究の目的である。

### 3. 研究の方法

「ヒト前立腺癌患者における ESS2 の発現と前立腺癌患者の統計学的解析」

臨床的背景が明らかな患者の前立腺組織を用いて、ESS2 の蛋白および RNA 発現を測定し、発現率や CRPC との関連、悪性度、予後等リスク因子との関連を統計学的に解析する。

#### 「前立腺癌細胞における ESS2 遺伝子の機能解析」

アンドロゲン依存的な LNCaP 細胞株や AR 発現のない PC3 細胞株などを用いて、ESS2 をノックダウンし細胞応答を解析する。また DHT リガンドを投与し AR シグナルとのクロストークを解明する。ESS2 は機能未知の遺伝子であるため、ノックダウン安定細胞株の RNA 抽出を行いマイクロアレイにて網羅的に ESS2 の標的遺伝子の同定を行い、ESS2 の ROR 複合共役因子以外の機能を検索する。また蛋白を抽出し Western Blotting 法により ROR、IL6、TGF、INF、TNF 等の炎症性サイトカインの発現の変化を評価し、免疫系へ及ぼす影響を調べる。

#### 「ESS2flox マウスを用いた *vivo* における ROR の機能解析」

ESS2flox マウスと CMV-Cre マウスを交配し、ESS2 ノックアウトヘテロマウスを作成、または ESS2flox マウスと前立腺特異的に Cre を発現する PSA-Cre マウスと交配し、前立腺組織をサンプリング、形態学的評価、病理組織学的評価を行う。また免疫染色法や *in situ* ハイブリダイゼーション法などにより生体における ROR、炎症性サイトカインの発現の変動を調べる。また ESS2 ノックアウトヘテロマウスの他臓器における形態学的解析や採血による生化学的検査を行い ESS2 遺伝子の生体での機能を検索する。

#### 「*vivo* における ESS2 の前立腺癌増殖への作用の検証」

ESS2 ノックダウン前立腺癌細胞安定株を作成する。その前立腺癌細胞株をヌードマウスの前立腺に移植しコントロール前立腺癌細胞株の移植片と比較し癌増殖への影響を評価する。その組織片の病理や RNA 発現を評価する。

#### 4. 研究成果

ROR を発現し IL17a 遺伝子を誘導可能な 68-41 細胞を大量培養し、ROR 抗体を用いて精製。飛行時間質量分析計 (TOF/MS) 施行、ROR の新規転写共役因子を同定、胸腺低形成 (DiGeorge) 症候群 / 22q11.2 欠失症候群の欠損領域に存在する機能未知タンパク質 ESS2 に着目した。Human Protein Atlas で ESS2 は各正常組織および癌組織に ubiquitous に発現、患者前立腺検体を用いた免疫染色で特に前立腺癌組織で強く発現していた (n=20)

生体での ESS2 の機能を確認するため ESS2 ノックアウトマウスを Cre-loxP システムを用いて作出した。ESS2KO マウスは胎児致死であった。生後タモキシフェンを投与し ESS2 KO マウスを得た。前立腺を 16 週齢でサンプリングし計量した。コントロールと KO マウスの体重、外見は同様であったが前立腺は低形成であった。VP の HE 染色を施行、KO マウスの腺細胞は核が小さく細胞形成が未熟であった。

各前立腺癌細胞株において ESS2 抗体染色施行、PC3 で発現が強かった。ESS2shRNA レンチウイルスを PC3 細胞に導入 ESS2 ノックダウン安定株を樹立、RT-PCR、Western blotting で確認した。MTT アッセイでノックダウンにより増殖抑制がみられた。アクチン (赤)、DAPI (青) で二重染色したところノックダウン細胞で突起が多く伸びており構造変化が認められた。

ESS2 ノックダウン PC3 細胞とコントロール細胞をヌードマウス背部に移植した。ノックダウン移植片は増殖が著しく阻害され、Ki67 染色で陽性細胞が減少した。

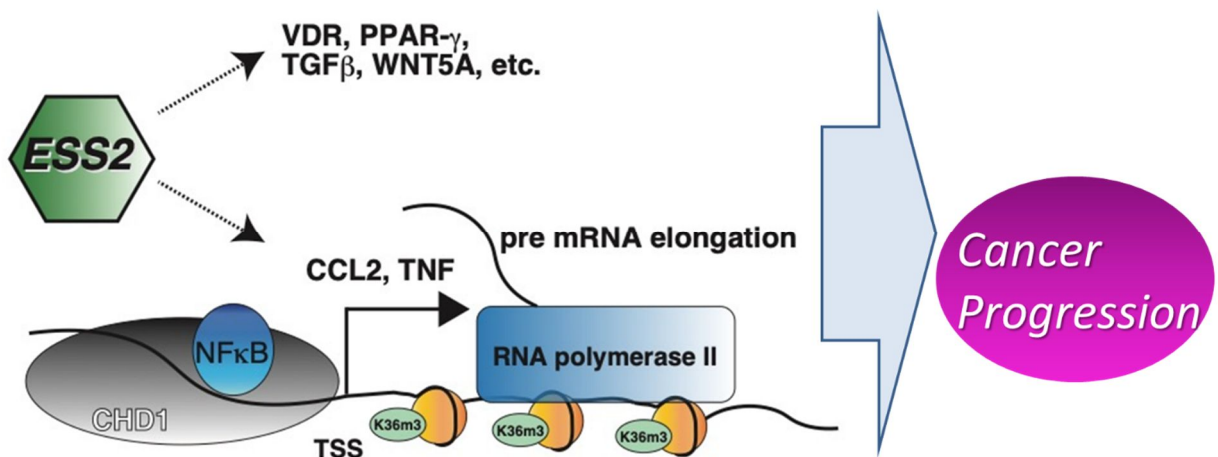
ESS2 の蛋白精製施行。ESS2 は染色体構造維持に関するクロマチンリモデリング因子 BAZ1 やリン酸化酵素 RSK2 と相互作用があった。スプライソソームに含まれる蛋白 Sart-1 と ESS2 を蛍光免疫染色施行、ESS2 はスプライソソームと共局在していた。ESS2 がクロマチンリモデリングに作用することが示された。

ESS2 ノックダウン細胞をコントロールとともに RNA 抽出、Gene Set Enrichment Analysis 施行。インターロイキン群、染色体凝集、レチノイン酸細胞内応答、染色体凝集、細胞周期に関わる遺伝子群が変動した。

qPCR、Western Blotting で ESS2 は核内受容体 PPAR、VDR の mRNA 発現を抑制、TGF pathway を制御した。ESS2 ノックダウンで TNF、CCL2 の発現が抑制された。そこで ChIP アッセイを行ったところ ESS2 が TNF、CCL2 プロモーター上の NFκB/CHD1 結合を制御することで細胞増殖を制御することが明らかになった。

CHD1(Chromodomain-Helicase DNA-binding 1) はメチル化修飾ヒストンと結合する chromo domain を持つ生命維持に必須のクロマチン構造変換因子であり、さらに NFκB と相互作用し、前立腺癌の増殖を制御することが知られている (Zhao, D. etc. Nature 2017 Feb 23;542(7642):484-488)。

われわれが新規スクリーニングした機能未知の ESS2 遺伝子が核内で NFκB/CHD1 と結合しクロマチンリモデリングを制御、TNF、CCL2 等の標的遺伝子の発現を調整し癌の増殖に働くことを解明した。前立腺癌に多く発現する ESS2 は去勢抵抗性前立腺癌の新規治療薬のターゲットとなりうることを見出した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Takada I †, Hidano S †, Takahashi S †, Ogawa H, Tsuchiya M, Yokoyama A, Sato S, Ochi H, Nakagawa T, Kobayashi T, Nakagawa S, Makishima M | 4. 巻<br>298(9)       |
| 2. 論文標題<br>Transcriptional coregulator Ess2 controls survival of post-thymic CD4+ T cells through the Myc and IL-7 signaling pathways              | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biological Chemistry  | 6. 最初と最後の頁<br>102342 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-            |

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高橋さゆり  |
| 2. 発表標題<br>核内受容体ROR の新規転写共役因子ESS2阻害は細胞周期を制御し去勢抵抗性前立腺癌の増殖を抑制する |
| 3. 学会等名<br>第109回日本泌尿器科学会総会                                    |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高橋さゆり   |
| 2. 発表標題<br>核内受容体ROR を軸とした前立腺癌分子細胞メカニズムの探究～泌尿器科におけるダイバーシティ～ |
| 3. 学会等名<br>あきた女性泌尿器科医の会（招待講演）                              |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高橋さゆり  |
| 2. 発表標題<br>Analysis of Molecular Mechanisms of Castration Resistant Prostate Cancer |
| 3. 学会等名<br>The 30th Seoul Urological Symposium（招待講演）（国際学会）                          |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高橋 さゆり, 久米 春喜, 中川 徹                      |
| 2. 発表標題<br>新規ROR 転写共役因子ESS2遺伝子の同定および前立腺癌増悪のメカニズムの解明 |
| 3. 学会等名<br>第69回日本泌尿器科学会中部総会                         |
| 4. 発表年<br>2019年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高橋 さゆり, 山田幸央, 久米 春喜, 中川 徹                     |
| 2. 発表標題<br>核内受容体ROR の新規転写共役因子ESS2は染色体凝縮・分裂を制御し前立腺癌を増悪させる |
| 3. 学会等名<br>日本泌尿器腫瘍学会第5回学術集会                              |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高橋 さゆり                           |
| 2. 発表標題<br>去勢抵抗性前立腺癌基礎研究の紹介                 |
| 3. 学会等名<br>第3回TKC Urological Seminar (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2019年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高橋さゆり                                     |
| 2. 発表標題<br>去勢抵抗性前立腺癌に対する新規ROR 転写共役因子を標的とした免疫療法の開発の試み |
| 3. 学会等名<br>第4回日本泌尿器腫瘍学会                              |
| 4. 発表年<br>2018年                                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高橋さゆり                         |
| 2. 発表標題<br>新規ROR 転写共役因子を標的とした前立腺癌免疫療法の開発 |
| 3. 学会等名<br>第28回泌尿器科分子・細胞研究会              |
| 4. 発表年<br>2019年                          |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高橋さゆり                                    |
| 2. 発表標題<br>去勢抵抗性前立腺癌に対する 新規ROR 転写共役因子を標的とした 免疫療法の開発 |
| 3. 学会等名<br>第107 回日本泌尿器科学会総会                         |
| 4. 発表年<br>2019年                                     |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>高橋さゆり                     |
| 2. 発表標題<br>前立腺癌における新規ESS2遺伝子の役割      |
| 3. 学会等名<br>日本アンドロロジー学会第41回学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2022年                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Sayuri Takahashi   |
| 2. 発表標題<br>Cell-cell communication and signaling on prostate cancer             |
| 3. 学会等名<br>Researchinstitute of Innovative Medicine 5th Anniversary（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高橋さゆり                        |
| 2. 発表標題<br>去勢抵抗性前立腺癌に対するエピジェネティクス創薬への挑戦 |
| 3. 学会等名<br>第132回TEUS (招待講演)             |
| 4. 発表年<br>2023年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高橋さゆり、高田伊知郎、中川徹、久米春喜   |
| 2. 発表標題<br>ESS2 controls prostate cancer progression through recruitment of chromodomain helicase DNA binding porotein1 |
| 3. 学会等名<br>第110回日本泌尿器科学会総会  |
| 4. 発表年<br>2023年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

| 6. 研究組織   |  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-----------|--|--------------------------------|-----------------------|----|
| 研究<br>分担者 | 小林 隆志<br><br>(Kobayashi Takashi)<br><br>(30380520) | 大分大学・医学部・教授<br><br><br>(17501) |                       |    |
|           | 中川 徹<br><br>(Nakagawa Tohru)<br><br>(40591730)     | 帝京大学・医学部・教授<br><br><br>(32643) |                       |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|