

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16725

研究課題名(和文) 前立腺癌におけるAR及びFOXA1を介したエピジェネティックな発癌分子機構の解明

研究課題名(英文) Identification of epigenetic mechanisms of prostate tumorigenesis through AR and FOXA1

研究代表者

佐藤 広明 (Sato, Hiroaki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50813250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌におけるアンドロゲン受容体 (AR) を軸としたエンハンサー活性化による遺伝子発現制御機構から、発癌に寄与するエピゲノム制御共因子としてBRD4が重要な役割を担うことを同定した。去勢抵抗性獲得においてはAR非依存的な異常エンハンサー活性化機構が深く関与していることを同定し、この異常活性化をエピジェネティックに制御する治療戦略としてヒストンメチル化酵素DOT1Lの阻害が有用である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌の発癌ならびに去勢抵抗性獲得の分子機構について、エピゲノムの観点から解析を行なった。近年ゲノム解析手法の発達によりゲノムを主軸においた研究が盛んである一方、エピゲノムを主軸に置いた研究は不十分であり、我々の研究によりエピゲノムの観点から新規知見が得られた点で学術的意義が高いと考えられる。また、エピジェネティック阻害による治療戦略の可能性を示した点では、社会的に克服すべき治療抵抗性病態である去勢抵抗性前立腺癌に対する臨床応用へと繋がる、大きな社会的意義を有していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We focused on androgen receptor (AR) and its transcriptional role through enhancer activation. As an epigenetic co-factor of AR, we identified that BRD4 played a critical role for prostate carcinogenesis. Furthermore, we identified aberrant enhancer activation, which was independent of AR, in acquisition of castration resistance. We showed that inhibition of histone methyltransferase DOT1L might be a novel therapeutic strategy through regulating aberrant enhancer activation.

研究分野：泌尿器悪性腫瘍

キーワード：前立腺癌 がんエピゲノム 去勢抵抗性 アンドロゲン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において前立腺癌は男性罹患数上位の癌腫で、長寿大国である本邦において今後も罹患患者数増加が見込まれる、喫緊の対策が必要な最重要の悪性腫瘍の一つである。前立腺癌はアンドロゲン依存性であることが古くから知られており、アンドロゲン除去療法 (ADT) は現在も全身治療の第一選択である。ADT は初期には非常に有効であるものの、のちに治療抵抗性である去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) に移行することが臨床的に問題となっている。

ADT の作用機序はアンドロゲンの供給阻止、あるいは、アンドロゲンとアンドロゲン受容体 (AR) との結合阻害であり、いずれもアンドロゲン・AR 間を標的とした治療戦略である。アンドロゲンと結合した AR は核内移行し、標的領域のクロマチンに結合し標的遺伝子発現を制御する。AR・クロマチン結合の際にはパイオニア転写因子 FOXA1 がクロマチンを開くことが知られているものの、FOXA1・AR・クロマチン間で生じている分子機構については十分に解明されていない。AR・クロマチン間を標的とした発癌分子機構の解を解明することは、ADT の限界を克服する新規の治療標的の発見につながり前立腺癌に対する新たな治療戦略の礎になることが期待される。

また、前立腺癌に関する分子機構の解明においては、ゲノム異常に基づくジェネティックな発癌・治療抵抗性・予後との関係性は多数報告されているものの、エピジェネティックな制御機構に関する研究は限定的である。そのため、エピゲノム異常を標的とする分子機構解明は独自性が高く既存治療とは異なる視点から有効な新規治療戦略につながることを期待される。

## 2. 研究の目的

本研究は、FOXA1・AR・クロマチン結合の際に生じているヒストン修飾をはじめとしたエピゲノム変化や、これらを引き起こすエピゲノム修飾因子ならびに転写因子の機能を解明し、前立腺癌におけるエピジェネティックな発癌分子機構・治療抵抗性獲得機構を同定し、新規治療標的の発見につなげることを目的とする。臨床的に限界が問題となっている ADT の作用機序よりも下流の分子機構に着目し、かつ、エピゲノム異常を標的とすることで、臨床応用への基礎をなすことを目指す。

## 3. 研究の方法

ADT 感受性前立腺癌細胞株として LNCaP、CRPC 細胞株として LNCaP 派生の LNCaP95 を主として用いた。CRPC 細胞株は検証用として VCaP、22Rv1 も使い、また、神経内分泌前立腺癌細胞株として PC3、DU145 も検証に用いた。

転写因子・共因子 (AR, FOXA1, BRD4)、各種ヒストン修飾 (H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, H3K79me2)、ならびに RNA ポリメラーゼ II (pan-pol II, S5P-pol II, S2P-pol II) に対する ChIP-seq を上述の細胞株に対してアンドロゲン刺激やエピゲノム阻害剤などの各種薬剤投与前後で施行した。また、同様の条件下に RNA-seq も施行し、エピゲノム情報とトランスクリプトーム情報の網羅的な統合解析を行なった。

統合解析から発癌あるいは治療抵抗性獲得に関与する、FOXA1・AR 標的あるいは非標的遺伝子群と近傍の特異的エピゲノム変化を抽出した。抽出された遺伝子群に対して GO 解析, GSEA 解析, pathway 解析などの *in silico* 解析を行い候補遺伝子の絞り込みを行なった。またエピゲノム変化が生じているクロマチン領域に対して motif 解析を行い、同領域に作用する転写因子を探索した。絞り込みを経た標的遺伝子や転写因子・エピゲノム修飾因子について、shRNA あるいは siRNA を用いたノックダウンや特異的阻害剤投与による機能解析を行なった。

これら *in vitro* 解析を検証するために、公共データベースに登録されている臨床検体を用いた解析データや、千葉大学医学部附属病院泌尿器科において採取された前立腺組織 (癌部ならびに非癌部) の解析を加え、臨床の正当性ならびに妥当性の検討を行なった。

## 4. 研究成果

### (1) FOXA1・AR による発癌分子機構の探索

LNCaP に対して 5 $\alpha$ DHT 刺激前後の RNA-seq と、同条件下での AR, H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac に対する ChIP-seq を実施した。AR 結合領域の大半は H3K4me1 (+), H3K4me3 (-), H3K27ac (+) のエンハンサー領域であり、同領域の motif 解析からは FOXA1 が有意に抽出された。FOXA1 に対する ChIP-seq を同条件にて追加し統合解析したところ、AR 結合領域 (n = 41, 813) と FOXA1 結合領域 (n = 49, 912) のうち 33, 143 領域が重複しており、この重複領域近傍遺伝子の GO 解析からは発癌に関与することが示唆される遺伝子群が有意に抽出された (e.g. “Positive regulation of cell proliferation”;  $-\log_{10}(P) = 6.1$ , “Pathways in cancer”;  $-\log_{10}(P) = 5.2$ )。

エンハンサー活性に着目し、アセチル化ヒストンを読み取り転写コンプレックスを誘導する BET タンパクの代表である BRD4 の ChIP-seq も同条件下に追加した。BRD4 の結合領域 17, 184 個は、34.8%が FOXA1 (+)/AR (+), 53.3%が FOXA1 (-)/AR (-) の領域であり、それぞれ大半がエン

ハンサー領域、プロモーター領域であるという特徴的な2群に大別された(図1)。また、BRD4(+)/FOXA1(+)/AR(+ )のエンハンサー領域近傍遺伝子群はGO解析で癌関連遺伝子を有意に含有し、かつ、5 $\alpha$ DHT刺激後に有意な発現上昇を認めた( $P = 4.88 \times 10^{-21}$ )。一方で、BRD4(+)/FOXA1(-)/AR(-)のプロモーター領域近傍遺伝子群はGO解析で正常細胞機能維持に関する遺伝子群を有意に含有し、5 $\alpha$ DHT刺激前後でその発現に有意な変動は認めなかった( $P = 0.02$ )。

これらの結果から、FOXA1結合エンハンサー領域、AR結合エンハンサー領域のそれぞれに対する特異的なクロマチン結合阻害が新規治療戦略へとつながる可能性が示唆された。現在、同領域に対するピロール・イミダゾールポリアミド(PIP)合成に着手し、その投与が与える変化を今後追加検討し、FOXA1・AR・クロマチン間で生じている発癌分子機構の詳細解明予定である。

## (2) AR-V7 特異的標的遺伝子の同定

LNCaP 派生 CRPC 細胞株である LNCaP95 は、チャコール処理血清を用いたアンドロゲンフリー培地でも増殖可能であり、リガンド非依存性に転写活性を有する AR-V7 を発現している。AR-V7 は CRPC における予後不良因子であることが臨床的に報告されているが、単なる予後マーカーであるのか、悪性化ドライバーであるのか、議論は尽きていない。そこで我々は、(1)と同条件にて LNCaP95 に対する RNA-seq と ChIP-seq (AR, H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac) を施行し、両細胞株での AR/AR-V7 結合領域ならびにヒストン修飾変化・遺伝子発現変化をゲノムワイドに解析を行なった。

LNCaP95 におけるアンドロゲンフリーでの AR-V7 結合領域 ( $n = 399$ ) のうち、LNCaP での AR 結合領域と重複する領域は 377 箇所であり、22 箇所が AR-V7 特異的結合領域として同定された。この 399 領域の近傍遺伝子 ( $n = 496$ ) の遺伝子発現状況を両細胞株のアンドロゲンフリー下 RNA-seq にて比較したところ、78 個の発現変動遺伝子が抽出され、うち 4 個が AR-V7 特異的結合領域近傍の遺伝子であった(図2)。さらに shRNA を用いて AR-V7 特異的ノックダウン細胞株を樹立し、AR-V7 特異的標的遺伝子の更なる絞り込みを行なったところ、4 遺伝子のうち最も発現低下が著しかった *SLC3A2* を同定した。また AR との共通標的(リガンド非依存的に AR-V7 も標的とする) 74 遺伝子のうち最も発現低下が著しかった *NUP210* を同定した。

*SLC3A2* の臨床的意義を検討するため、公共データベースによる遺伝子発現状況を比較した。Grasso ら (*Nature*, 2012) のデータからは、正常前立腺、未治療前立腺癌に比し、CRPC において *SLC3A2* の発現が有意に上昇していた。TCGA のデータからは、AR-V7 高発現組織では低発現組織に比較して *SLC3A2* が有意に高発現であることが示された。同様の解析を *NUP210* でも行なったところ、CRPC あるいは AR-V7 高発現組織において、その遺伝子発現が有意に高いことが示された(図3)。

両遺伝子の機能解析を行なうべく、siRNA によるノックダウンにて細胞増殖、細胞周期、アポトーシス、細胞老化の変化を検討した。*SLC3A2* のノックダウンにより、WST-8 アッセイにて細胞増殖が有意に抑制されていた。細胞周期解析では、G1 期での有意な細胞周期停止を認め、アポトーシス解析では顕著なアポトーシス誘導を認めた。また、SA- $\beta$ -Gal 染色では有意な細胞老化誘導を認めた(図4)。同様の解析を *NUP210* の siRNA ノックダウンでも実施したところ、類似の解析結果が得られた。

以上の結果から、AR-V7 特異的標的遺伝子である *SLC3A2*、ならびに、AR との共通標的遺伝子

図1. FOXA1, AR 結合領域のゲノムワイド解析

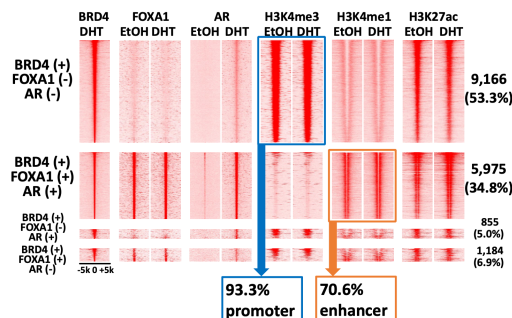


図2. AR-V7 特異的標的遺伝子の同定

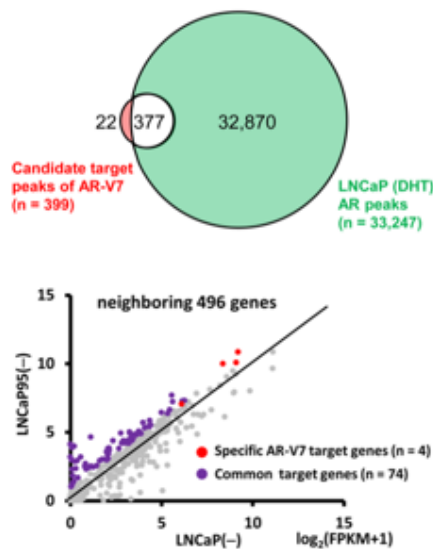
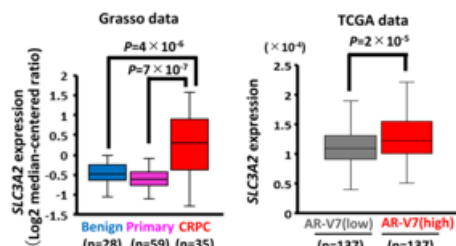


図3. 臨床組織検体における *SLC3A2* の発現



である *NUP210* の両遺伝子は、CRPC の治療抵抗性・悪性化において重要な機能を有することが示された。AR-V7 が単なる予後マーカーではなく、悪性化に寄与するドライバー因子であることを示した重要な新規知見であり、国際誌 *Translational Oncology* に掲載された (Sugiura, Sato, et al. *Transl Oncol.*, 2021)。

(3) エンハンサー制御変化に伴う去勢抵抗性獲得機構の同定

(1), (2) で得られた知見から、我々は前立腺癌の治療抵抗性獲得過程におけるエンハンサー制御の変化が生じているのではないかという仮説を立てた。とくにエンハンサー集簇から定義され、細胞運命決定や発癌・癌の治療抵抗性獲得に大きな影響を与えることが近年報告されている (Whyte WA, et al. *Cell*, 2013., Loven J, et al *Cell*, 2013., Hnisz D, et al. *Cell*, 2013) スーパーエンハンサー (SE) に着目し (図 5)、その CRPC における意義の検討を行なった。

まず、H3K27ac の ChIP-seq データを基に、LNCaP と LNCaP95 の SE をそれぞれ抽出し、SE 領域とその近傍遺伝子群の重複関係と特徴を検討した。LNCaP からは 1,073 領域の SE と 1,747 個の近傍遺伝子が、LNCaP95 からは 1,183 領域の SE と 1,947 個の近傍遺伝子が抽出された。これら SE 近傍遺伝子と、AR, FOXA1, BRD4 が結合しエンハンサー標的として支配する遺伝子 (AR 標的) とを比較したところ、LNCaP では約 6 割が合致する一方で、LNCaP95 では合致率はわずか 25.3% に留まった (図 6)。同様の傾向は臨床組織検体の遺伝子発現プロファイルからも確認され、SE 近傍遺伝子群に Grasso らのデータを適合しクラスタリング解析したところ、CRPC で遺伝子発現が上昇している群の AR 標的との一致率はわずか 17.6% であった。

この結果から、前立腺癌は ADT 感受性から CRPC へと移行する際に、その SE 制御様式が AR 依存的状态から AR 非依存的状态へと変遷していることが推測された。これを実証するため、AR の共因子として機能する BET タンパク BRD4 を阻害剤 JQ1 ならびに shRNA によるノックダウンにて抑制すると、LNCaP では顕著な細胞増殖抑制とアポトーシス誘導が認められた一方で、LNCaP95 では軽度の細胞周期 G1 停止を認めるのみでアポトーシスは誘導されなかった。また、BRD4 阻害により発現上昇する遺伝子の中で、CRPC における AR 非依存 SE 近傍遺伝子には、重要な癌パスウェイ関連遺伝子が有意に含まれていた (図 7)。

次に AR 非依存 SE を制御する転写因子を探索するため、SE 領域から motif 解析によって候補転写因子群を抽出し、siRNA スクリーニングによる絞り込みを行なった。少なくとも ELK1, SP1, ならびに SP2 の 3 つの転写因子が AR 非依存 SE 制御に関与しており、CRPC における複雑な SE 形成機構の一端が明らかとなった。

これまでの結果から、ADT 感受性前立腺癌は AR がマスター転写因子として主たる SE 制御を担っている一方、CRPC では AR のみでない複数転写因子群による複雑な SE 制御下にあることが判

図 4. *SLC3A2* の各種機能解析

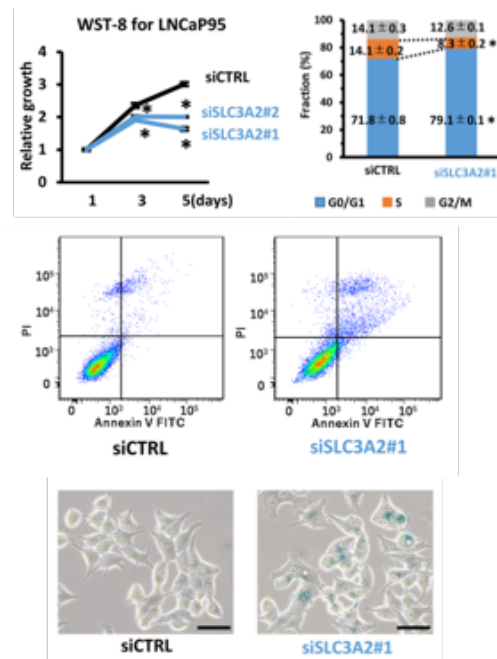


図 5. スーパーエンハンサー (SE) の概念

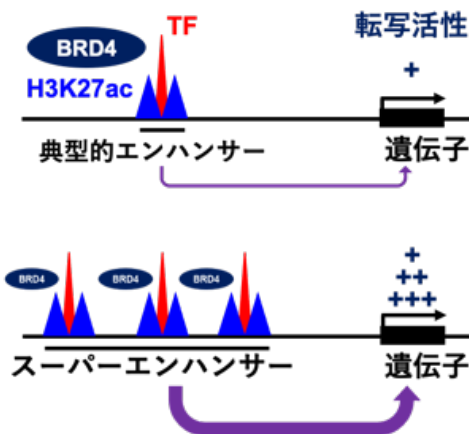
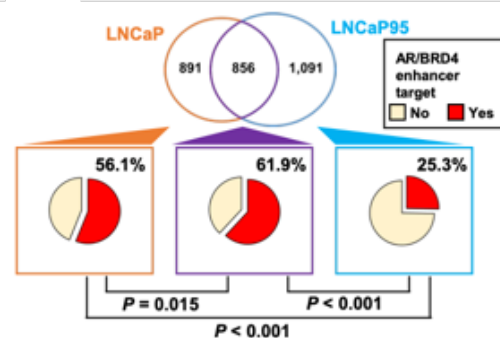


図 6. SE 近傍遺伝子と AR 標的との合致率比較





明した。我々はSEの転写活性亢進状態に着目し、転写伸長に参与するエピゲノム修飾因子 DOT1L に注目した。DOT1LはCRPCにおいてその遺伝子発現が有意に上昇しており、そのエピゲノム修飾であるH3K79メチル化状態をH3K79me2に対するChIP-seqにて評価したところ、SE近傍遺伝子群で有意に高い修飾状態であった。DOT1L選択的阻害剤EPZ5676をLNCaP95に投与すると、H3K79me2は顕著に消退し、有意な細胞増殖抑制・細胞周期G1期停止・アポトーシス誘導を認めた(図8)。

さらに、JQ1とEPZ5676投与下でのRNAポリメラーゼIIに対するChIP-seq解析から、BRD4は転写開始点に対して強く作用する一方でDOT1Lは転写集結点に対して強く作用することが判明し、異なる分子機構で転写制御を担うことから独立した治療標的となることが示唆された。それぞれの薬剤投与下のトランスクリプトーム解析から、CRPCにおいて亢進している癌ホーモマーク遺伝子群を併用により相補的に抑制することが判明し、細胞増殖アッセイからは相乗的な増殖抑制効果を呈することが判明した(図9)。

以上の結果から、CRPCにおける治療抵抗性獲得機構としてAR非依存的SEが深く関与していることが同定され、また、DOT1LがCRPCに対するエピゲノム修飾制御を介した新規治療標的となり得ることが明らかとなった。今後の前立腺癌治療発展への礎となる新規知見であり、現在学術誌へ投稿中である(Sato, et al. in preparation)。

図7. BRD4阻害によるAR非依存的SEの検証

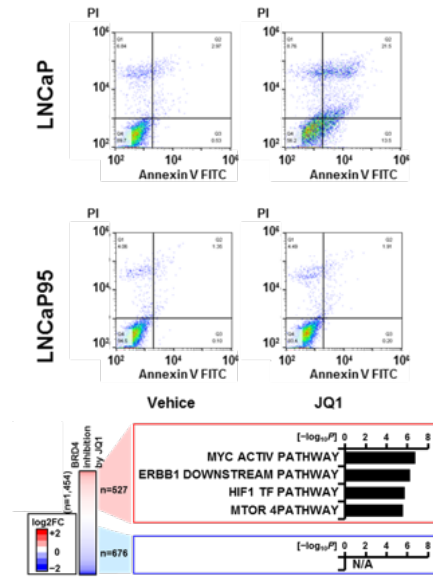


図8. DOT1LのCRPCにおける機能解析

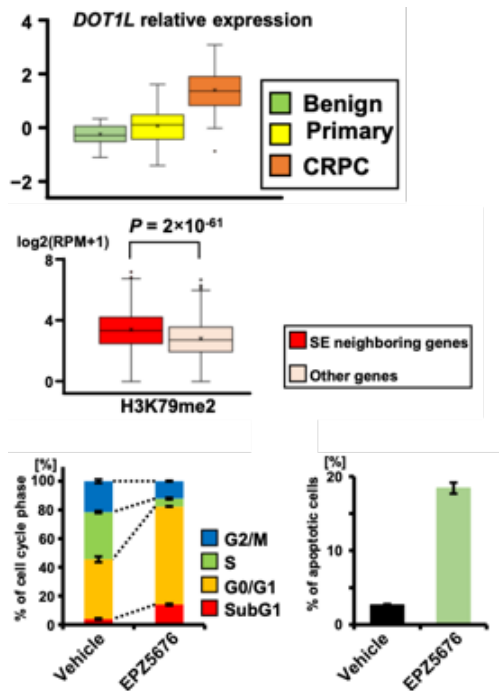
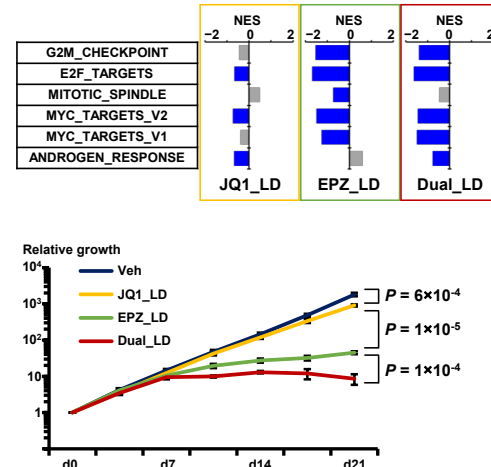


図9. DOT1L阻害の新規治療戦略としての可能性検討



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugiura M, Sato H, Okabe A, Fukuyo M, Mano Y, Shinohara K, Rahmutulla B, Higuchi K, Maimaiti M, Kanesaka M, Imamura Y, Furihata T, Sakamoto S, Komiya A, Anazai N, Kanai Y, Luo J, Ichikawa T, Kaneda A	4. 巻 14 (1)
2. 論文標題 Identification of AR-V7 downstream genes commonly targeted by AR/AR-V7 and specifically targeted by AR-V7 in castration resistant prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transl Oncol.	6. 最初と最後の頁 100915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2020.100915	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Sugiura M, Sato H, Kanesaka M, Imamura Y, Sakamoto S, Ichikawa T, Kaneda A	4. 巻 28 (2)
2. 論文標題 Epigenetic modifications in prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Urol	6. 最初と最後の頁 140-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14406	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐藤広明, 金田篤志	4. 巻 272 (1)
2. 論文標題 がんのエピゲノム異常	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 32-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Alagarswamy K, Shinoahara K, Takayanagi S, Fukuyo M, Okabe A, Rahmutulla B, Yoda N, Qin R, Shiga N, Sugiura M, Sato H, Kita K, Suzuki T, Nemoto T, Kanda A	4. 巻 9 (50)
2. 論文標題 Region-specific alteration of histone modification by LSD1 inhibitor conjugated with pyrrole-imidazole polyamide	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 29316-29335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25451	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐藤広明、杉浦正洋、金坂学斗、岡部篤史、福世真樹、今村有佑、坂本信一、小宮顕、金田篤志、市川智彦
2. 発表標題 異常エンハンサー制御を介したエピゲノム阻害剤の前立腺癌治療への応用
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Sato, Masahiro Sugiura, Manato Kanesaka, Atsushi Okabe, Masaki Fukuyo, Yusuke Imamura, Shinichi Sakamoto, Akira Komiya, Tomohiko Ichikawa, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Aberrant AR-independent Super-enhancer activation in Castration Resistant Prostate Cancer.
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤広明、杉浦正洋、金坂学斗、岡部篤史、福世真樹、今村有佑、坂本信一、小宮顕、金田篤志、市川智彦
2. 発表標題 スーパーエンハンサー制御を介したエピゲノム阻害剤の前立腺癌治療への応用
3. 学会等名 第28回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤広明、杉浦正洋、岡部篤史、福世真樹、今村有佑、坂本信一、小宮顕、金田篤志、市川智彦
2. 発表標題 前立腺癌におけるFOX A1・AR・クロマチン修飾を介したエピジェネティックな発癌分子機序の同定
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Sato, Masahiro Sugiura, Manato Kanesaka, Atsushi Okabe, Masaki Fukuyo, Yusuke Imamura, Shinichi Sakamoto, Akira Komiya, Tomohiko Ichikawa, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Dual inhibition of BRD4 and DOT1L as an epigenetic treatment strategy for prostate cancer
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤広明、杉浦正洋、金坂学斗、岡部篤史、福世真樹、今村有佑、坂本信一、小宮顕、金田篤志、市川智彦
2. 発表標題 去勢抵抗性獲得に寄与する異常エンハンサー活性化の同定と、エピゲノム修飾阻害によるその制御
3. 学会等名 第35回前立腺シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤広明、杉浦正洋、金坂学斗、岡部篤史、福世真樹、今村有佑、坂本信一、小宮顕、市川智彦、金田篤志
2. 発表標題 エピジェネティック阻害剤による治療モデル (前立腺癌)
3. 学会等名 日本薬学会第139年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroaki Sato, Masahiro Sugiura, Manato Kanesaka, Atsushi Okabe, Masaki Fukuyo, Yusuke Imamura, Shinichi Sakamoto, Akira Komiya, Tomohiko Ichikawa, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Epigenetic regulation of oncogenic transcription mediated by aberrantly activated enhancers in prostate cancer
3. 学会等名 AACR ANNUAL MEETING 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 佐藤広明、杉浦正洋、金坂学斗、岡部篤史、福世真樹、今村有佑、坂本信一、小宮顕、金田篤志、市川智彦
2. 発表標題 CRPCにおける異常エンハンサーがもたらす癌遺伝子転写活性化とエピゲノム阻害によるその制御
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	金田 篤志  (Kaneda Atsushi)  (10313024)	千葉大学・大学院医学研究院・教授   (12501)	
連携研究者	松坂 恵介  (Matsusaka Keisuke)  (40610150)	千葉大学・医学部附属病院・准教授   (12501)	

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
---------	---------