

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09539

研究課題名(和文) アンドロゲン依存的転写制御領域の同定と、その領域の変異の前立腺発癌効果の解析

研究課題名(英文) Identification of the enhancer sequences that are controlled by androgen receptor

研究代表者

藤田 潤 (Fujita, Jun)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：50173430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アンドロゲン追加によってeRNA発現が誘導するエンハンサーを2,000箇所以上同定した。うち半分は新規に見つかったものである(新規エンハンサー)。既知のアンドロゲン依存的エンハンサーと新規エンハンサーとのあいだで、エピジェネティックマーカーとの共局在、アンドロゲン受容体結合サイトとの共局在、FOXA1転写因子結合サイトとの共局在に関して、差異はなく、新規エンハンサーも真にアンドロゲン依存的と結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各遺伝子に対して、数個以上のエンハンサーがその発現を制御すると考えられているが、実際にどれだけの数のエンハンサーが存在するか不明である。特に、ホルモンなどの外的刺激によって一過性に活性化されるエンハンサーは不明である。学術的意義は、2,000箇所以上のアンドロゲンによって活性化されるエンハンサーの同定である。社会的意義は、この同定が前立腺癌のホルモン治療抵抗性の機序の解明へ貢献できることである。

研究成果の概要(英文)：We identified more than 2,000 enhancers that eRNA expression was induced by androgen addition. Half of them are newly found (novel enhancers). Differences between known androgen-dependent enhancers and novel enhancers in terms of colocalization with epigenetic markers, androgen receptor binding sites, and FOXA1 transcription factor binding sites We conclude that the novel enhancer is also truly androgen dependent.

研究分野：腫瘍学

キーワード：前立腺癌 アンドロゲン エンハンサー エンハンサーRNA ホルモン治療抵抗性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 前立腺癌の疫学

前立腺がんは、アメリカにおいては男性のがんの中で罹患数は1位、死亡数は2位と最も多いがんのひとつである。日本において、近年、前立腺がんの患者数は大きく増加している。2020~2024年(年平均)には前立腺がん罹患数は105,800人となり、男性がんのうち、第一番目の罹患数になると予測されている

(<https://www.zenritsusen.jp/epidemiology/> より引用)。

(2) 男性ホルモンが前立腺癌を増殖刺激する作用機序

男性ホルモン、アンドロゲンは、前立腺癌の発生を大きく促進する。アンドロゲンは、エンハンサーと呼ばれる300塩基前後の転写制御領域を活性化し、活性化されたエンハンサーがその標的遺伝子を発現制御する。各遺伝子に対して、数個以上のエンハンサーがその発現を制御すると考えられている。

(3) アンドロゲン依存的なエンハンサーに関する未知事項

ゲノム全体にどれだけの数のエンハンサーが存在するか、その全貌は不明である。恒常的に活性化されているエンハンサーは、エピジェネティックマーカー(例、DNase hypersensitivity、ヒストン H3 K27Ac、H3K4me1)により同定された。この手法は、恒常的に活性化されているエンハンサーの同定には有効であるが、ホルモン曝露後すぐに活性化される動的エンハンサーの同定には適さない。したがって、恒常的に活性化されているエンハンサーは比較的よく解析されているが、ホルモンなどの外的刺激によって一過性に活性化されるエンハンサーはよくわかっていない。アンドロゲン依存的なエンハンサーも、未知な点が多い。

(4) ホルモン曝露によって一過性に活性化されるエンハンサーの検出方法(Nuclear RUN-ON)とその問題点、問題の解決法

Enhancer RNA (eRNA) は活性化されたエンハンサーからのみ発現される。eRNAの検出が、一過性に活性化されるエンハンサーを検出するのに最も有力な手法であった。eRNAの半減期は、mRNAの半減期の1/60である。このeRNAを高感度に検出するため、従来、Nuclear RUN-ONと呼ばれる手法が使われた。Nuclear RUN-ONとは、細胞核を単離し、試験管内で転写されたnascent RNA(合成されたRNA)を濃縮しDeep Sequencingする手法である。この手法は、半減期の短いRNAと長いRNAを同じ感度で検出できる長所がある。短所は、細胞核を単離する時に、転写を開始していないRNA polymerase IIを人工的に転写開始させてしまうことである。すなわち、活性化されていないエンハンサーを、活性化されていると間違えて判断することが多いのが、Nuclear RUN-ON手法の弱点である。

Nuclear RUN-ONの問題を克服したのが、京都大学・村川泰裕教授である。教授は、活性化されたエンハンサーからのみ発現されるenhancer RNA (eRNA)を世界最高感度に検出するNET-CAGE手法を開発した(*Nature Genet* 2019, PMID:31477927)。この手法は、RNA polymerase IIと複合体を作っているnascent RNAを、たった2ステップで精製し、それをDeep Sequencingする手法である。この手法を使うことによって、ホルモン添加後にどのタイミング(例、30分後、90分後)で、どんなエンハンサーが活性化されるかを網羅的・超高感度に調べることができるようになった。

(5) ホルモン治療とその問題点

前立腺がんの主な治療法は、手術（外科治療）、放射線治療、内分泌療法（ホルモン療法）、化学療法である。前2者が第一選択である。ホルモン治療は、前立腺局所だけでなく全身に対して癌の抑制が可能である。そのため、局所進行癌または転移性の癌に対し最もよい適応がある。ホルモン療法を行うと、癌は体積が減少するが、完全に無くなることはない。

ほとんどの前立腺癌は、最初はホルモン治療によく反応するが、時間が経つとホルモン治療抵抗性の癌が発生する。ホルモン治療抵抗性のメカニズムはよくわかっていない。想定されるメカニズムの1つは、アンドロゲン応答性エンハンサーの変異である。しかし、アンドロゲン応答性エンハンサーは未解明なものが多く、そこに生じた変異の影響を系統的に調べて解析は無い。

2. 研究の目的

アンドロゲン応答性エンハンサーを新規に1,000箇所以上同定する。

3. 研究の方法

活性化されたエンハンサーからのみ発現される enhancer RNA (eRNA) を世界最高感度に検出する NET-CAGE 手法 (*Nature Genet* 2019, PMID:31477927) を使う(図1)。アンドロゲン応答ヒト前立腺癌細胞、LNCap にアンドロゲンを加え、2、3、4、6、12、24時間後に RNA を抽出し(各時点に3サンプル毎) eRNA と遺伝子プロモーターからの転写物を定量した。我々は、RNA 抽出から転写物定量までを、DNAFORM 社に受託した。

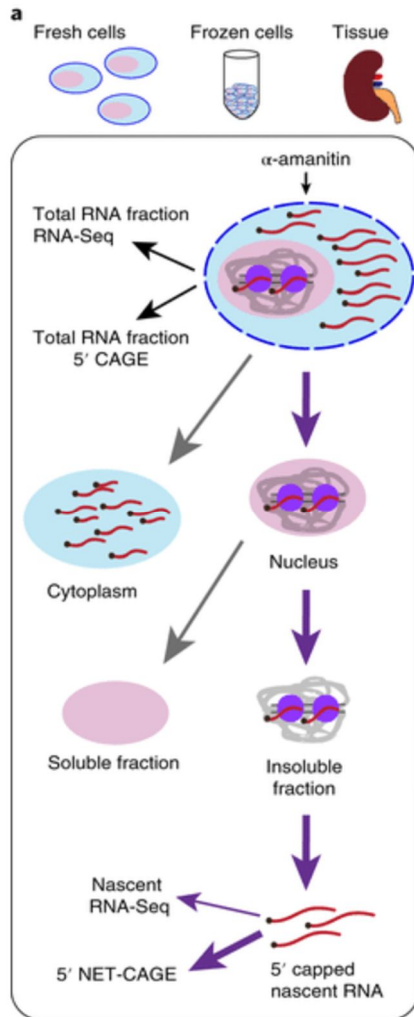


図1 eRNAを検出するNET-CAGE手法

細胞をマイルドな溶解バッファーで処理し、核を単離する。核をさらに尿素溶解バッファーで処理し、安定な RNA-RNAPII-DNA 複合体を含む不溶性画分を単離する。RNA 精製中の転写進行を避けるため、各実験ステップで α -アマンチン(転写の強力な阻害剤)を加える。最後に、クロマチンを消化して新生 RNA を精製する。RNA のうち 5' Cap 構造を含むものを精製し、5' から RNA シークエンスを行う。我々は、核を単離し、それを DNAFORM 社に送った。DNAFORM 社は、以後の実験を RNA シークエンスまで行った。

4. 研究成果

(1) アンドロゲン依存적エンハンサーの新規同定

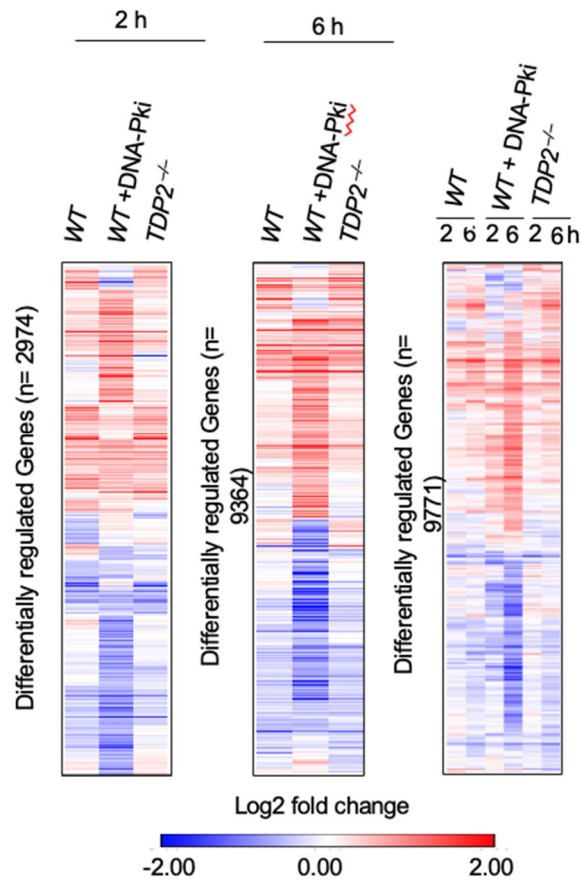


図2 アンドロゲン曝露後、2時間と6時間に発現が上昇もしくは下降した eRNA
 横軸は各 eRNA の発現量比(アンドロゲン曝露前と比べて)を示す。赤線は発現が上昇した eRNA を示し、青線は発現が下降した eRNA を示す。WT は野生型 LNCap 細胞。LNCap 細胞を、TDP2 遺伝子欠損させたり、非相同末端結合阻害剤(DNA-PKi)で処理すると、アンドロゲン曝露によって活性化されるエンハンサーが変化することが分かった。

アンドロゲン追加によって eRNA 発現が誘導するエンハンサーを 2,000 箇所以上同定した(図2)。うち半分は新規に見つかったものである(新規エンハンサー)。既知のアンドロゲン依存的エンハンサーと新規エンハンサーとのあいだで、エピジェネティックマーカーとの共局在、アンドロゲン受容体結合サイトとの共局在、FOXA1 転写因子結合サイトとの共局在に関して、差異はなく、新規エンハンサーも真にアンドロゲン依存的と結論した。FOXA1 転写因子は、アンドロゲン依存的に転写因子として機能するアンドロゲン受容体と同様、アンドロゲン依存的に遺伝子発現を制御する。

4. 研究の意義と将来展望

我々の発見は、アンドロゲンの作用機序の解明に貢献する。今後、ホルモン治療抵抗性の前立腺がんの特異的に見つかる変異を解析する。この解析は、ホルモン治療抵抗性のメカニズムの解明に貢献する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Higashitsuji H, Fujita T, Higashitsuji H, Fujita J.	4. 巻 533
2. 論文標題 Mammalian cold-inducible RNA-binding protein facilitates wound healing through activation of AMP-activated protein kinase.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1191-1197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.10.004	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 Mahmud RA, Ishii K, Lozano BC, Sainz DI, Toi M, Akamatsu S, Fukumoto M, Watanabe M, Takeda S, Ledesma FC, Sasanuma H.	4. 巻 25
2. 論文標題 TDP2 suppresses genomic instability induced by androgens in the epithelial cells of prostate glands.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 450-465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12770.	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上山裕樹、福井智洋、砂田拓郎、木村博子、後藤崇之、小林恭、赤松秀輔
2. 発表標題 CDK12 KOとTP53 KDの組み合わせでは臨床のCDK12 LOF前立腺癌にみられる高悪性を模倣しない
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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
研究 分 担 者	赤松 秀輔 (Akamatsu Shusuke) (20767248)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	武田 俊一 (Takeda Shunichi) (60188191)	京都大学・医学研究科・名誉教授 (14301)	

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