

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09568

研究課題名（和文）神経内分泌前立腺癌におけるMUC1とクロマチンリモデリング因子複合体の意義

研究課題名（英文）Significance of MUC1 and chromatin remodeling factor complexes in neuroendocrine prostate cancer

研究代表者

安水 洋太（Yasumizu, Yota）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：40464854

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）：去勢抵抗性前立腺癌におけるMUC1とmSWI/SNFの働きについて研究した。MUC1が転写因子であるE2F1を介してmSWI/SNFの因子であるBRG1・ARID1Aの発現を制御することを発見した。さらにMUC1がNOTCH1やNANOGの転写調整領域でのBRG1・ARID1Aの発現を制御し、E2F1を介して自己複製能を獲得している結果を得た。これらの結果から、MUC1-E2F1-mSWI/SNF-NOTCH1-NANOG経路が前立腺癌の幹細胞能獲得に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経内分泌前立腺癌（NEPC）への脱分化にTP53やRB1といった癌抑制遺伝子の変異が関与する。そして2nd stepとして転写・翻訳の調整スイッチが入ることで神経内分泌分化が生じる。この転写・翻訳の調整のことをエピジェネティックリプログラミングと呼ぶ。今回、我々はMUC1がSWI/SNFに作用することで、NEPC分化の調整スイッチを担っていることを世界に先駆けて発見した。NEPCは難治性でいまだ治療方法が確立していない。本研究の結果は未知なるNEPCの分子基盤を解明し、NEPCの新規治療戦略確立の一助となる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of MUC1 and mSWI/SNF in castration-resistant prostate cancer. We found that MUC1 regulates the expression of BRG1 and ARID1A, which constitute mSWI/SNF through the transcription factor E2F1. Furthermore, we found that MUC1 regulates the expression of BRG1 and ARID1A in the transcription regulatory regions of NOTCH1 and NANOG through E2F1 and acquires self-renewal ability. These results suggested that the MUC1-E2F1-mSWI/SNF-NOTCH1-NANOG pathway is involved in stem cell acquisition of prostate cancer.

研究分野：神経内分泌前立腺癌

キーワード：神経内分泌前立腺癌 SWI/SNF BRG1 ARID1A

1. 研究開始当初の背景

本邦における前立腺癌の罹患数は近年男性の癌の第1-3位と上昇傾向にある。米国においては死亡数男性第2位であり、生活習慣の欧米化に伴い本邦でも更なる増加が懸念される。前立腺癌有転移症例においては、主にアンドロゲン遮断療法 (androgen deprivation therapy: ADT) が施行される。ADTは当初は奏効するものの、次第にアンドロゲン非依存性増殖能を獲得し、去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer: CRPC) となる。CRPCではアンドロゲンレセプター (AR) の変異や組織内アンドロゲン産生を認めADT抵抗性を示すが、依然としてAR経路が機能している。その結果エンザルタミド等のAR経路阻害剤 (Androgen receptor pathway inhibitor: ARPI) が有効性を示す。ARPIは進行性前立腺癌患者の全生存期間を改善したが、一方でARPIに抵抗性を示すAR非依存性前立腺癌を浮き彫りとした。その一つが神経内分泌前立腺癌 (Neuroendocrine prostate cancer: NEPC) である。偶発的に発生したNEPCの頻度は数%と報告されている。大半は、ARをターゲットとした治療を受ける過程で、CRPCからNEPCへと進展する。NEPCに対する有効な治療方法はなく、新規治療戦略の確立のためその分子基盤の解明は急務である。

2. 研究の目的

近年、癌抑制遺伝子であるTP53、RB1あるいはPTENに変異が生じた後に、SOX2/BRN2やN-Mycなどの転写因子が働くことでNEPCへの脱分化が生じると報告されている (Park et al, Science 2018)。しかし、NEPCの公開された臨床データベースをみると、SOX2/BRN2/N-Mycの増幅は10~20%にとどまり、転写因子の増幅だけではすべてを説明することは難しい。他に転写を亢進させる要因があると考えるのは必然である。Mucin1 (MUC1)は上皮細胞の表面に存在する2量体の糖タンパク質で、種々の癌において過剰発現する。MUC1は核内でARやNFkB、カテニン等といった転写因子を介して癌の進展に関与する (Kufe D et al, Oncogene, 2013)。申請者らは、MUC1がMycを介してSOX2やBRN2を活性化することで前立腺癌のNEPCへの脱分化の一端を担っている事を世界で初めて解明し、報告した (Yasumizu Y et al, Nature Communications 2019)。さらにMUC1がSWI/SNF (Switch/sucrose nonfermenting) やNuRD (Nucleosome remodeling and deacetylase) といったクロマチンリモデリング因子と核内で複合体を形成し、その働きを制御していることを突き止めた (Hata T, Yasumizu Y et al, Cancer Research 2019)。これらの複合体はヒストンとDNAの構造変換を引き起こし、転写因子がDNAに作用するのを制御する。本研究では、MUC1が複数のクロマチンリモデリング因子と巨大な複合体を形成しDNA上で働くことに着目し、MUC1-クロマチンリモデリング因子複合体の制御によるNEPCの新規治療戦略の確立を目的とする。

3. 研究の方法

CRPC細胞株であるC4-2Bをアンドロゲン除去環境下で培養し、LNCaP-AI細胞を樹立した。LNCaP-AI細胞はC4-2Bと比較してMUC1及び神経内分泌マーカーの高発現を認め、NEPC細胞株として用いた (Figure1)。また、AR陰性CRPC細胞株であるDU-145細胞と、ATCCから入手可能なNEPC細胞株であるNCI-H660細胞株を使用した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

MUC1は前立腺癌細胞株におけるBRG1/ARID1Aの発現を制御する

我々はMUC1が前立腺癌の神経内分泌分化に関与することを報告してきた。mSWI/SNFは発生および発癌におけるクロマチンリモデリングにおいて機能する。今回去勢抵抗性前立腺癌 (Castration-resistant prostate cancer: CRPC) におけるMUC1とmSWI/SNFの働きについて研究した。Tet on/offシステムを用いてCRPC細胞株LNCaP-AIにおけるMUC1発現を抑制した所、mSWI/SNFの構成因子であるBRG1やARID1Aの発現は抑制された (Figure 1-A)。DU-145やNCI-H660でも同様の結果であった。MUC1ネガティブ前立腺細胞株LNCaPにMUC1を導入するとBRG1やARID1Aの発現は亢進した (Figure1-B)。

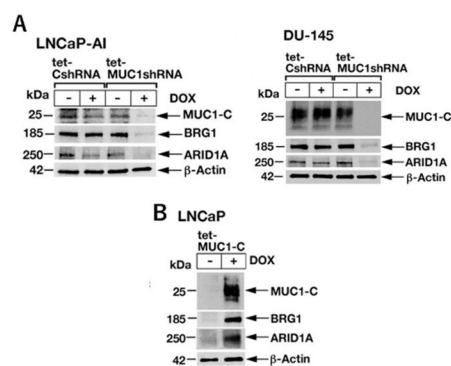


Figure1 MUC1は前立腺癌細胞におけるBRG1/ARID1Aの発現を制御する

MUC1は転写因子E2F1と核内で結合してBRG1/ARID1Aの発現を調整する

MUC1 は転写因子として働かないため、他の転写因子が関与することが示唆された。過去に MUC1 が E2F1 依存性メカニズムで EZH2 を活性化することが報告されている。今回 E2F1 に着目した。E2F1 の抑制は LNCaP-AI における BRG1 や ARID1A の発現を抑制した。核内の免疫沈降法を用いて MUC1 をプルダウンしたところ、サンプル内に E2F1 の発現を認めた。DU-145 でも同様の結果であった。BRG1 と ARID1A のプロモーター領域での MUC1 と E2F1 についてクロマチン免疫沈降法を用いて評価した。BRG1 と ARID1A のプロモーター領域における E2F1 結合部位に MUC1 の発現が亢進していた。この結果は、核内で MUC1 と E2F1 が結合し、BRG1 や ARID1A の発現調整を行うことを示唆した (Figure2)。

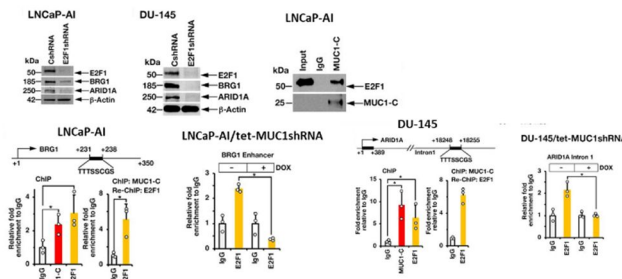


Figure2
MUC1はE2F1と核内で結合してBRG1/ARID1Aの発現を調整する

MUC1 は BRG1/ARID1A を介して NOCTH1 経路の制御・NANOG 発現の制御を行う既存のデータベースでは、CRPC と比較して NEPC で BRG1・ARID1A の発現の亢進を認める。

MUC1・mSWI/SNF 軸の NEPC 分化への関与について評価した。NOTCH1 が神経内分泌分化に関与することが報告されている。LNCaP-AI において MUC1 の抑制によって NOTCH1 発現が抑制された。DU145 や NCI-H660 でも同様の結果であった (Figure3-A)。さらに神経内分泌分化における NOTCH1 の働きについて追及した。クロマチン免疫沈降を行い、癌幹細胞

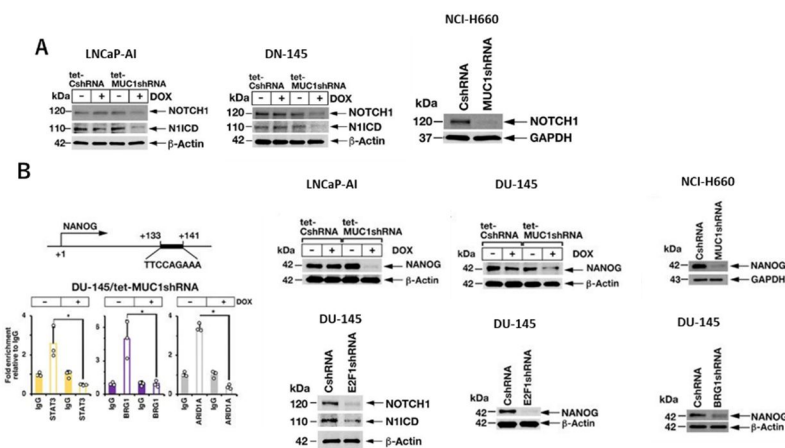


Figure3
MUC1はBRG1/ARID1Aを介してNOTCH1経路の制御・NANOGの発現の制御を行う

化に関与する NANOG のエンハンサー領域に BRG1/ARID1A が結合していることを突き止めた。エンハンサー上の BRG1/ARID1A は MUC1 の抑制によって有意に減少した。MUC1 の抑制によって NANOG の発現は抑制された (Figure3-B)。MUC1 は E2F1 を介して mSWI/SNF 複合体に作用し、神経内分泌分化の一端を担っていることが示唆された。

MUC1 は BRG1/ARID1A を介して前立腺癌の幹細胞能を制御する

NANOG は幹細胞能獲得に必要とされるタンパクである。MUC1 抑制による前立腺癌の自己複製能力について検討した。スフィアアッセイの結果、MUC1・E2F1・BRG1・ARID1A の抑制は LNCaP-AI におけるスフィア形成を抑制した。DU-145 でも同様の結果であった。また NOTCH1 や NANOG の抑制もスフィア形成を抑制した。これらの結果から、前立腺癌において MUC-E2F1-BRG1/ARID1A-NOTCH1-NANOG 経路介して幹細胞能を獲得していることが示唆された (Figure4)

(2) 得られたの国内外における位置づけとインパクト
NEPC への脱分化において様々な因子が影響を及ぼす。一つは TP53 や RB1 といった癌抑制遺伝子の変異である。これらの遺伝子変異は、肺腺癌が肺小細胞癌に脱分化するときや、膀胱尿路上皮癌が膀胱小細胞癌に脱分化するときの引き金になる。しかし、TP53 と RB1 変異は NEPC 分化の必要十分条件ではない。TP53・RB1 の 2 本鎖の遺伝子異常があった場合においても半数以上は CRPC のままである。1st step である TP53 と RB1 の変異の後、2nd step として転写・翻訳の調整スイッチが入ること NEPC 分化が生じる。この転写・翻訳の調整のことをエピジェネティックリプログラミング

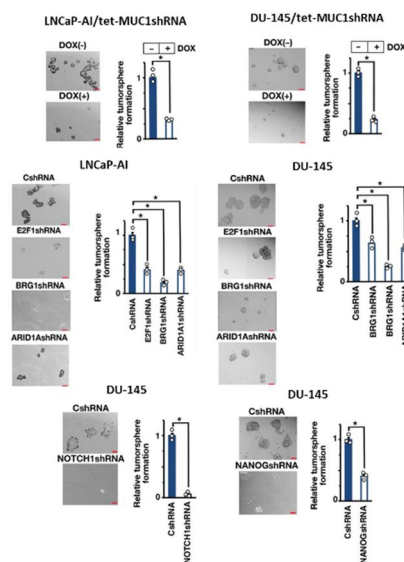


Figure4
MUC1はBRG1/ARID1Aを介して前立腺癌の幹細胞能を制御する

と呼ぶ。リプログラミングのスイッチングは、しばしばドライバー経路（前立腺癌においては AR axis）の抑制がトリガーとなる。SOX2 や BRN2 などの転写因子の増幅もエピジェネティックリプログラミングの一種である。申請者らも、MUC1 による SOX2 や BRN2 の発現制御に着目し、MUC1 MYC BRN2 の経路が NEPC 脱分化に寄与することを報告した。他にもヒストンのメチル化に関与する EZH2 が N-myc と作用して NEPC 分化に関与すること報告されている。NEPC に対する SWI/SNF の影響は世界的に着目されている。我々は MUC1 と核内で結合するタンパクを追及する過程で SWI/SNF に到達し今回の研究結果を得たが、別グループも SWI/SNF に着目しインパクトの高い報告がなされている (Cyrta J et al, Nat Commun 2020, 11(1), 5549)。SWI/SNF の制御によって NEPC 分化の、本研究の結果は未だ解決していない NEPC の新規治療戦略確立の一助となる。

(3) 今後の展望

申請者はこれまでに糖タンパクの一種である MUC1 が cMyc-BRN2 を介して前立腺癌の神経内分泌分化の一端を担っている事を解明し、報告した (Yasumizu Y et al, Nature Communications, 2020)。さらに今回、別経路として MUC1 が E2F1 と協調してクロマチンリモデリング因子である SWI/SNF を活性化し神経内分泌分化を誘導することを突き止めた。一方で、実臨床では MUC1 だけでは説明できない NEPC 表現型が存在することを経験している。進行性前立腺癌の一部は MUC1 強陽性に関わらず神経内分泌マーカーは陰性である。AR 関連タンパク陰性・神経内分泌マーカー陰性の前立腺癌をダブルネガティブ前立腺癌 (Double negative prostate cancer: DNPC) と呼ぶが、MUC1 強陽性の前立腺癌は一部 DNPC に分化している。神経内分泌癌の一種である小細胞肺癌では、cMyc-NeuroD1 が脱分化を引き起こし、NE マーカー陽性となる ASCL1 陽性小細胞肺癌から NE マーカー陰性の NeuroD1 陽性小細胞肺癌へと形質転換する (Mollaoglu G, Cancer Cell 2017)。MUC1 が NEPC から DNPC への形質転換に関与している可能性がある。MUC1 の未知なるメカニズムについて更に追及していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	小坂 威雄 (Kosaka Takeo) (30445407)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	

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