

令和元年6月14日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16787

研究課題名(和文) 前立腺癌における染色体転座の分子機構の解明と新規治療への応用

研究課題名(英文) The elucidation of molecular mechanism of chromosomal translocation in prostate cancer and application to new treatment

研究代表者

永澤 誠之 (Nagasawa, Masayuki)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：30750525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌においてアンドロゲン応答遺伝子であるTMPRSS2と、転写因子であるERG遺伝子の転座は、前立腺癌症例の約50%に認められ、予後規定因子である。今研究では、アンドロゲン受容体(AR)が核内でfociを形成することから、AR fociでTMPRSS2/ERG遺伝子の接近がおこるかを検討した。免疫染色とFISHを組み合わせて、関係性を検討したが、アンドロゲンにてTMPRSS2/ERG両遺伝子の接近はみられず、AR fociへの接近も見られなかった。ARと協調的に働くBRD4が転座に影響するかも検討を行ったが、BRD4阻害薬であるJQ1でも両遺伝子の距離に変化は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により転座の新たなメカニズムを解明できれば、転座の抑制に応用ができる。前立腺癌は多発性かつ、不均一な組織集団であり、ひとつの前立腺内においても転座の有無が混在している。転座が起こっていない領域において転座を抑制することは、前立腺癌、特にCRPC治療において新たな治療法の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Translocation of the androgen response gene TMPRSS2 and the transcription factor ERG gene in prostate cancer is observed in about 50% of prostate cancer cases and is a prognostic factor. In this study, we examined whether or not access to the TMPRSS2 / ERG gene occurs in androgen receptor foci. The combination of immunostaining and FISH was used to examine the relationship, but the approach of the TMPRSS2 / ERG genes was not observed with androgen, nor was the approach to AR foci observed. We also investigated whether BRD4, which works in concert with AR, affects translocation, but there was no change in the distance between the two genes, even with BRD4 inhibitor JQ1. In the future, we will examine the relationship with Ying Yang 1 (YY1) as a factor that binds to AR and induces chromosome looping.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：前立腺癌 TMPRSS2-ERG転座

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍における染色体転座の重要性は古くから認識されており、近年、固形癌においても転座の重要性が示されている。前立腺癌においてアンドロゲン応答遺伝子である TMPRSS2 と、転写因子である ERG 遺伝子の転座は、前立腺癌症例の約 50% に認められ、予後規定因子である。ERG は転座により転写が促進され、タキサン系抗癌剤に対して抵抗性を示すことが報告され、TMPRSS2-ERG 転座と去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)治療の関連が注目されている。

TMPRSS2-ERG 転座にはアンドロゲンレセプター(AR)が関与していることが報告されている。アンドロゲン刺激により、AR が TMPRSS2 と ERG 遺伝子に結合すると、両遺伝子が接近し、そこに DNA 傷害を加えることで転座が誘導される(Lin, Cell 139:1069, 2009)。しかし、AR が両遺伝子を接近させる分子機構については明らかにされておらず、新たな分子機構の解明により新規治療法の開発につながると考えられた。

また AR は、BRD4 という転写伸長に関わる因子と結合し、BRD4 を AR 標的遺伝子にリクルートすることが報告されている(Asangani, Nature. 510: 278, 2014)。BRD4 阻害薬である JQ1 は、AR と BRD4 との結合を阻害することにより、AR と BRD4 を標的遺伝子から解離させることで、AR 標的遺伝子の転写を低下させる。この AR の協調的に働く BRD4 と転座の関係性についても明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は AR が TMPRSS2-ERG 転座を起こすメカニズムを解明し、新規治療へ応用することを目的とする。

また、転座に関わる新たな分子機構として、BRD4 が TMPRSS2- ERG 転座に関与するか明らかにすることを第 2 の目的として、JQ1 を用いて AR による TMPRSS2/ERG 遺伝子の接近と転座が阻害されないか検討する。

### 3. 研究の方法

- 1) Immuno-FISH を用いて TMPRSS2/ERG 遺伝子の接近における AR foci と BRD4 の分子機構を検討する。BRD4 阻害薬 JQ1 による両遺伝子接近の阻害作用について検討する。
- 2) TMPRSS2/ERG 遺伝子の接近における CBP/p300 の分子機構を検討する。CBP/p300 阻害薬 C646 の投与や CBP/p300 のノックダウンを行い、CBP/p300 と TMPRSS2/ERG 転座との関連を明らかにする。
- 3) Immuno-FISH を用いて、転写ファクトリーに TMPRSS2/ERG 遺伝子が接近するか検証する。また転写伸長阻害薬 Flavopiridol による、両遺伝子の接近阻害作用を検討する。
- 4) 前立腺癌に対するエピジェネティック治療として、C646 の転座の阻害効果を検討する。また、JQ1、C646 併用での前立腺癌抑制効果について in vitro、in vivo の実験から検証する。

### 4. 研究成果

本研究では、AR が核内で dot 状の構造体(foci)を形成することに着目し、AR の foci を足場として、両遺伝子の接近が起こるといふ仮説を 3D-DNA FISH を用いて検討する。

まず、TMPRSS2-ERG 転座の誘導を行った。LNCaP にアンドロゲンを加えたのちに、X 線を 50Gy 照射し、RT-PCR を行った。転座した TMPRSS2-ERG 融合遺伝子の mRNA を RT-PCR にて増幅し、sequence を行ったところ、TMPRSS2 1<sup>st</sup> exon と ERG 2<sup>nd</sup> exon の融合を認めた。

次に、TMPRSS2 と ERG 遺伝子の接近と AR の foci 形成との関係について検討を行った。Androgen

free medium を用いて、細胞を培養したのちに、アンドロゲンであるジヒドロテストステロン (DHT)の投与を行い、ARが増加し、核内で dot 状の構造体である foci を形成することを確認した。(図 1)

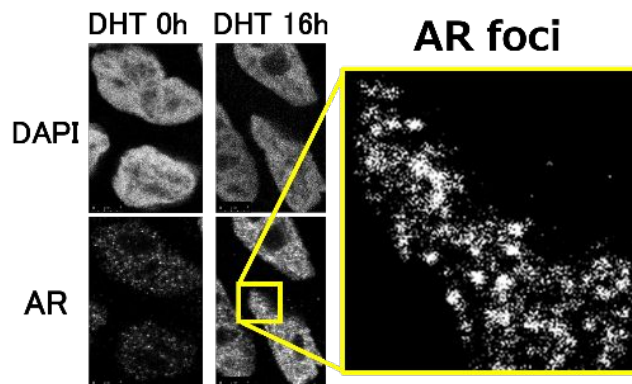


図 1 LNCaP 細胞の AR 免疫染色

続いて、TMPRSS2、ERG の各遺伝子との距離を計測するために、TMPRSS2 遺伝子と ERG 遺伝子を含む DNA プローブを作成し、3D-DNA FISH を行った。また、AR の免疫染色をしたのちに、TMPRSS2 遺伝子と ERG 遺伝子の 3D-DNA FISH を行う、Immuno-FISH 解析を行った。(図 2)

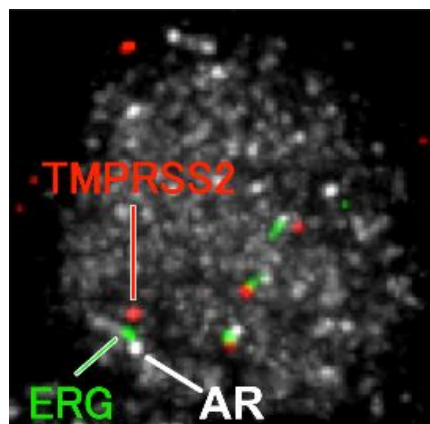


図 2 LNCaP 細胞の Immuno-FISH

TMPRSS2、ERG 遺伝子は同一染色体上に 3Mb 離れて存在している。Immuno-FISH で得られた画像から、解析ソフトを用いて、両遺伝子間の距離の測定を行った。DHT 投与したものと control として ethanol を投与したもので、TMPRSS2/ERG 両遺伝子間の距離に有為な差はみられず、報告されているような DHT による両遺伝子の十分な接近は認められなかった。(図 3)

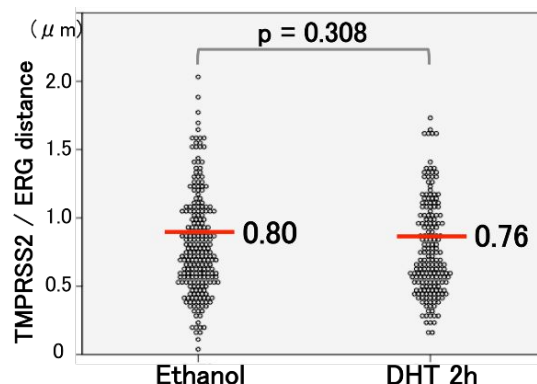


図 3 TMPRSS2/ERG 両遺伝子間の距離

DHT による TMPRSS2/ERG 遺伝子の接近は見られなかったが、AR foci との関係性についても検討を行った。TMPRSS2/ERG 遺伝子それぞれと AR foci との最短距離も測定し、両遺伝子間距離と相関がみられるかについても検討したが、それらに有意な相関は得られなかった。同様の検討を ERG と AR foci との最短距離においても、有意な相関はえられなかった。(図 4)

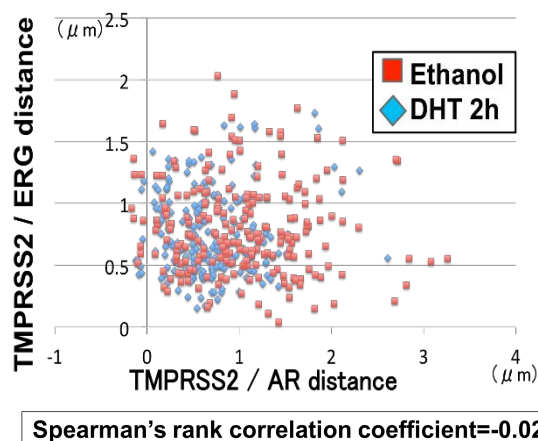


図 4 TMPRSS2/ERG 両遺伝子間の距離と TMPRSS2/AR 距離の相関

DHT 投与に伴う TMPRSS2/ERG 両遺伝子の接近が必要と考えられたため、Double Thymidine block による cell cycle 同調や前立腺癌細胞株 LNCaP の各細胞の cloning を行ったのちに、DHT 投与による TMPRSS2、ERG 遺伝子間の接近の検討を行った。しかしながら、それらの条件下においても、両遺伝子間の接近が得られず、AR foci との関係性も明らかではなかった。

そのため次に、AR 以外の因子が両遺伝子の接近に関わっている可能性を考え、AR と結合し、かつ染色体ルーピングを誘導する因子として Ying Yang 1 (YY1) という転写因子の解析を開始している。薬剤誘導性の YY1 ノックダウンベクターを LNCaP に導入し、今後、YY1 ノックダウンした細胞での TMPRSS2、ERG 遺伝子の距離について検討を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nagasawa M, Kageyama S, Yoshida T, et al. Changes in renal function following nedaplatin-containing chemotherapy in patients with urothelial carcinoma unfit for cisplatin. *Oncol Lett* 2019;17:2551-6.

〔学会発表〕(計 1 件)

第 107 回 日本泌尿器科学会総会(2019/4/20)

転移性ホルモン未治療前立腺癌に対するアビラテロン併用ホルモン治療の初期経験

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：河内 明宏

ローマ字氏名：Akihiro Kawauchi

研究協力者氏名：縣 保年

ローマ字氏名：Yasutoshi Agata

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、研究者個人に帰属されます。