

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03793

研究課題名（和文）進行性前立腺がんにおける転写因子OCT1の治療抵抗性獲得機序の解明とその臨床応用

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism of Transcription Factor OCT1 in Acquiring Therapeutic Resistance in Advanced Prostate Cancer

研究代表者

大日方 大亮（OBINATA, Daisuke）

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：20624886

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,700,000円

研究成果の概要（和文）：前立腺がん進行の中核をなすアンドロゲン受容体(AR)シグナル経路に影響する転写協調因子OCT1のメカニズム解明について、遺伝的に均一な前立腺癌細胞株を用いた検討に加え、臨床検体から新たに樹立したヘテロジニアスな多剤耐性進行性前立腺がん組織株2株(AR陽性株・陰性株)を用いて検討した。遺伝子網羅解析を行い、組織株2種に発現しているOCT1標的遺伝子を同定し、その中で前立腺癌の進行に重要なOCT1標的遺伝子を複数見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺がんはアンドロゲンが枯渇した環境下においても、アンドロゲン受容体とそれを標的遺伝子領域に誘導する転写因子を活用し、積極的に染色体や代謝経路を変異活性化させることで、低アンドロゲン状態での生存能力を獲得していることがこれまでの研究で判明している。今回転写因子OCT1がアンドロゲン受容体が存在しない前立腺癌で単独でアンドロゲン応答遺伝子を発現させ、さらに細胞の形質をより未分化なものへ転化させる遺伝子発現を促進させていることを見出した。同意電子群を標的とすることで前立腺癌の悪性化を防止できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of OCT1, a transcriptional regulator that influences the androgen receptor (AR) signaling pathway, we investigated the role of OCT1 in the progression of prostate cancer using homogenous prostate cancer cell lines. In addition, two patient derived xenografts established from multi-drug resistant, advanced prostate cancer (AR-positive and AR-resistant) were used in this study. Gene coverage analysis was performed to identify OCT1 target genes expressed, and several OCT1 target genes were found to be important for prostate cancer progression.

研究分野：泌尿器科

キーワード：前立腺癌 アンドロゲン受容体 転写因子 OCT1

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺がんの増殖・進展は主に男性ホルモン(アンドロゲン)並びに核内受容体であるアンドロゲン受容体(AR)、それに続く AR シグナル経路により制御されている。そのため男性ホルモンを抑制する外科的あるいは薬剤による去勢術は、転移を有する進行性前立腺がんに対する有効な治療であるが、耐性が誘導され、去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)と呼ばれる難治の致死性がんへと移行する。しかし、CRPC は低アンドロゲンの環境下においても AR シグナル経路が引き続き活性化していることが判明している。AR シグナル経路の活性化維持のメカニズムとして 1)AR の発現増幅などによる活性の増強、2)アンドロゲンを必要としない AR 変異体の出現、3)AR とは別の核内受容体が AR シグナル経路を乗っ取ること、4)AR を取り巻く転写協調因子の異常活性化があげられる(Obinata et al. *Cancers*, 2017)。特に転写協調因子に関しては前立腺がんの進行に伴い AR を調節する転写因子群が大きく変化し、従来 AR 転写協調因子と見なされていなかったがん遺伝子 MYC が CRPC においてのみ AR 転写協調因子として作用することが以前から知られている(Sharma et al. *Cancer Cell*, 2013)。私たちは、Oct1 が AR 陽性前立腺がん細胞を増殖させ、また早期前立腺がん患者の生命予後に影響を与えることを世界に先駆けて見だして以降(Obinata et al. *Int J Cancer*, 2012)、Oct1 の AR 転写協調因子としての特性について研究を行ってきた。AR 陽性前立腺がん細胞 LNCaP において、Oct1 は AR 標的遺伝子の一つである ACSL3 を最も強く発現させることを発見し(Obinata et al. *Oncogene*, 2016)、この ACSL3 は CRPC 治療薬の一つであるアピラテロンの耐性に関与する遺伝子 AKR1C3 の発現誘導を行っていることを突き止めた(Migita et al. *Cancer Sci*, 2017)。続いて、AR 陽性 CRPC モデルである 22Rv1 細胞における OCT1 標的遺伝子のゲノムワイド解析により、LNCaP 細胞とは異なる別の標的遺伝子群として、Aniline-Actin binding protein (ANLN) や DLG-Associated protein 5 (DLGAP5) など細胞周期促進により PC 細胞の増殖を促進させることが確認された(Takayama et al. *Endocrinology* 2019, Yamamoto et al. *Cancer Sci* 2019)。これらのデータは、OCT1/AR 複合体が標的とする一連の遺伝子は PC 進行とともに変化するという仮説を提起している。一方、前立腺神経内分泌癌(NEPC)は悪性度の高い特徴を有しているものの前立腺癌患者の約 1%と非常に稀な組織型である。しかし、長期去勢療法の選択的圧力により、最終的に NEPC あるいはダブル(AR および NE マーカー)陰性の前立腺癌(DNPC)が発生することがある。DNPC は、AR 阻害剤で治療された患者の約 36%に発生すると報告がある一方で、AR 陰性の表現型への腫瘍の移行における OCT1 の役割はまだ知られていない。AR 陰性前立腺癌細胞株である PC3 と DU145 は AR 陰性 CRPC を再現するが、CRPC の異質性を網羅するものではない。この課題に対処するため、homogeneous な細胞株とは異なり、patient derived xenograft (PDX)と呼ばれる元の組織と遺伝的特性・多様性がほぼ同一で極めて高い再現性を有し、迅速な薬剤感受性スクリーニング(Explant)用培養から 3 次元細胞培養(Organoid)まで幅広い培養系に応用することができる画期的な研究マテリアルが注目されている。私たちはこれまでに、多剤耐性耐性を持つ CRPC 症例から新しい AR 陰性 PDX を確立している。

### 2. 研究の目的

Oct1 が AR 転写協調因子として前立腺がんでは作用していることは判明しているが、多剤耐性へ遺伝的に「進化・変性」した CRPC における働きはわかっていない。本研究では AR 転写協調因子 Oct1 が、どのような作用を実臨床において担っているのか新たに樹立した多剤耐性 CRPC 組織由来の培養系を用いてそのメカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)多剤耐性 AR 陰性前立腺がん PDX を用いて Oct1 ならびにアセチル化ヒストン抗体による免疫沈降法(ChIP)と次世代シーケンサーにて網羅解析(ChIP-Seq)を行い、結合領域をマッピングする。ChIP-seq は、Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて先行研究同様に行った。

(2)結合のシグナルスコアは Model-based analysis of ChIP-seq を用いて算出した。結合部位の閾値は  $P < 1.0e-4$  に設定された。データセットは、Integrative Genome Viewer を用いて調べた。

(3)結合部位の上流および下流 1000 kb 以内にある遺伝子は、Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool (GREAT) version 4.0.4 で抽出し、OCT1 標的遺伝子の候補とした。この標的遺伝子群を in-silico によるパスウェイ解析を行った。

(4)この標的遺伝子の発現状況を検討するために先ほどの AR 陰性 PDX、AR 陰性前立腺癌細胞株 PC3、AR 陽性前立腺癌細胞 LNCaP、去勢抵抗性前立腺癌細胞 22Rv1 を用いて発現状況を確認した。

(5)発現が PC3、AR 陰性 PDX で有意に認められている遺伝子に関して、オンラインデータベースならびに当施設の前立腺癌組織検体での発現状況を検討し、より重要な遺伝子(OCT1 標的候補遺伝子)を絞り込んだ。

(6)OCT1 標的候補遺伝子を特異的に抑制する siRNA を投与、または PCDNA プラスミドに OCT1 を組み込み一過性発現させた PC3 の遺伝子発現、遊走能ならびに増殖能を検討した。

(7)ヌードマウスに PC3 を接種し、前述の siRNA を投与することによる腫瘍サイズの変化を検討した。

#### 4. 研究成果

(1)AR 陰性 CRPC における OCT1 結合部位の ChIP-seq による同定

多剤耐性 AR 陰性前立腺がん PDX 内に存在する OCT1 結合領域は、MACS ソフトウェアを用い、検出した。これらのうち、508 の領域が Ach3K27 に富む領域と重複していた。HOMER プログラムにより、上位 2 つのモチーフは OCT ファミリー結合モチーフに関連していることが示され、OCT ファミリー結合モチーフを持つゲノム配列に OCT1 が直接結合することが示唆された。この ChIP-seq データと我々の過去のデータ (GSE123565、GSE146886) を用いて、AR 陽性 22Rv1 細胞と比較して、多剤耐性 AR 陰性前立腺がん PDX では AR および他の Oct1/AR 標的遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域でヒストンのアセチル化と OCT1 結合の減少が観察された。一方、NEPC マーカーである SRY-Box 転写因子 2 (SOX2) のゲノム領域では高いアセチル化が観察され、AR 陽性から AR 陰性への移行に伴う転写プログラムおよび Oct1 標的の変化が示唆された。

(2)RNA-seq データを用いた AR 陰性 CRPC における推定 OCT1 制御遺伝子の同定

多剤耐性 AR 陰性前立腺がん PDX において、ACSL3 および OCT1 の発現を免疫組織化学的に検討した。OCT1 は強く発現していたが、ACSL3 は弱く発現していた。そこで、多剤耐性 AR 陰性前立腺がん PDX の Ach3K27 ChIP-seq データにより、高発現の OCT1 標的遺伝子を検討した。さらに、Rank Ordering of Super-Enhancers (ROSE) 解析により、従来のエンハンサーよりも強い活性を有する推定スーパーエンハンサー領域を特定した。Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool (GREAT) バージョン 4.0.4 を用いて、推定スーパーエンハンサー領域とオーバーラップする OCT1 制御遺伝子を同定した。これらの遺伝子の mRNA 量を調べるために、私たちが以前に報告した RNA-seq データ (Lawrence, Obinata et al. Eur Urol, 2018) を使用し、発現上位 20 個の遺伝子を抽出した。これらの遺伝子について Metascape 解析により遺伝子オントロジー (GO) 解析を行ったところ、神経細胞の増殖に関与する遺伝子群が有意に濃縮していることが見出された。そこで、これらの OCT1 標的遺伝子の中から、前立腺癌進行の鍵となる因子を同定することを試みた。この中で 2 つの遺伝子 SNTB1 および PFN2 に着目した。OCT1 を一過性に過剰発現された PC3 で、SNTB1 と PFN2 の発現上昇が認められた。

(3) SNTB1 および PFN2 の組織学的特徴

Oncomine を用いて前立腺癌組織における SNTB1 および PFN2 の遺伝子発現を解析した。これら 2 つの遺伝子の発現量は、原発巣よりも骨転移巣で高いことがわかった。続いて、CRPC 臨床組織における PFN2 および SNTB1 の免疫組織化学的解析を自験例の組織を用いて免疫組織化学を行った。その結果、NEPC を含むほとんどの AR 陰性 PC 組織で SNTB1 および PFN2 タンパク質が陽性に発現していることが明らかになった。

(4) SNTB1 および PFN2 の前立腺癌細胞における働き

これら 2 つの遺伝子の発現変化が AR 陰性 CRPC 細胞の増殖および遊走に及ぼす影響を調べるため、PC3 および DU145 に、SNTB1 および PFN2 を標的とする siRNA (siSNTB1 および siPFN2) をトランスフェクトした。これらの siRNA は、DU145 細胞および PC3 細胞において内因性 SNTB1 および PFN2 の発現を有意に減少させることを確認した。siSNTB1 および siPFN2 を導入した PC3 および DU145 細胞は、siNegative Control を導入した細胞と比較して、増殖に明らかな変化を示さなかった。しかし、両細胞株において、遊走の有意な減少が見られた。一方、OCT1 を一過性に発現させると、PC3 細胞の遊走が増加することが示された。

これらの遺伝子の in vivo での役割を調べるために、雄のヌードマウスにおける PC3 細胞の異種移植片に、siPFN2、siSNTB1、または siNegative Control を注射した。in vitro の結果と同様に、採取した腫瘍標本の qRT-PCR および免疫組織化学は、腫瘍における PFN2 および SNTB1 の両方の発現レベルが、各 siRNA によって減少したことを示した。siSNTB1 処理した腫瘍は、siNegative Control で処理した腫瘍と同様の成長速度を有していたが、siPFN2 で処理した腫瘍では、腫瘍体積の有意な減少が見られた。

(5) 結論

我々は AR 陰性前立腺癌において重要な役割を果たすと想定される 2 つの OCT1 標的遺伝子を同定した。多剤耐性前立腺癌細胞における OCT1 の標的シグナルが網羅的に同定され、神経内分泌腫瘍化への機能を担っていることが示唆された。OCT1 制御機構を抑制させることは多様な遺伝的特性を持つ有転移 CRPC への新たな治療戦略として有望と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Obinata Daisuke, Lawrence Mitchell G., Takayama Kenichi, Choo Nicholas, Risbridger Gail P., Takahashi Satoru, Inoue Satoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Recent Discoveries in the Androgen Receptor Pathway in Castration-Resistant Prostate Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 581515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2020.581515	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
1. 著者名 Hori Yutaro, Obinata Daisuke, Funakoshi Daigo, Sakurai Fuminori, Yoshizawa Tsuyoshi, Matsui Tsuyoshi, Mochida Junichi, Yamaguchi Kenya, Takahashi Satoru	4. 巻 25
2. 論文標題 Preoperative CT volumetry of estimated residual kidney for prediction of postoperative chronic kidney disease in patients with renal cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 315 ~ 321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-020-01984-8	査読の有無 有
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 Irie Yuki, Obinata Daisuke, Tsukada Jitsuro, Arakawa Shigeyuki, Kadotani Masaya, Hori Yutaro, Yoshizawa Tsuyoshi, Mochida Junichi, Yamaguchi Kenya, Takahashi Satoru	4. 巻 15
2. 論文標題 Successful lymphatic embolization using N-butyl-2-cyanoacrylate for postoperative lymphorrhea in a patient with renal pelvic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Radiology Case Reports	6. 最初と最後の頁 2139 ~ 2143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.radcr.2020.08.051	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 Obinata D, Suzuki S, Yamanaka Y, Yoshizawa T, Mochida J, Yamaguchi K, Takahashi S.	4. 巻 52
2. 論文標題 Low reduction of prostate volume is a significant predictor of prostate cancer at subsequent biopsy in patients with dutasteride: A retrospective study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Andrologia	6. 最初と最後の頁 13810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/and.13810.	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 Fernandes RC, Toubia J, Townley S, Hanson AR, Dredge BK, Pillman KA, Bert AG, Winter JM, Iggo R, Das R, Obinata D; MURAL investigators, Sandhu S, Risbridger GP, Taylor RA, Lawrence MG, Butler LM, Zoubeidi A, Gregory PA, Tilley WD, Hickey TE, Goodall GJ, Selth LA	4. 巻 5
2. 論文標題 Post-transcriptional Gene Regulation by MicroRNA-194 Promotes Neuroendocrine Transdifferentiation in Prostate Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 108585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108585.	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

1. 著者名 Obinata D, Funakoshi D, Takayama K, Hara M, Niranjan B, Teng L, Lawrence MG, Taylor RA, Risbridger GP, Suzuki Y, Takahashi S, Inoue S.	4. 巻 12
2. 論文標題 OCT1-target neural gene PFN2 promotes tumor growth in androgen receptor-negative prostate cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 6094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10099-x	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8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大日方大亮, 高山賢一, 鈴木稯, Lawrence Mitchell, Taylor Renea, Sandhu Shahneen, Risbridger Gail, 高橋悟, 井上聡
2. 発表標題 患者由来多剤耐性去勢抵抗性前立腺癌細胞におけるOCT1の役割
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大日方大亮, Mitchell Lawrence, Renea Taylor, Shahneen Sandhu, 藤原恭子, 高山賢一, 井上聡, 高橋悟, Gail Risbridger
2. 発表標題 多剤耐性去勢抵抗性前立腺癌に対するAR転写強調因子 (OCT1) 標的薬剤の有効性検討
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Obinata D
2. 発表標題 Recent Discoveries in the Androgen Receptor Pathway in Prostate cancer
3. 学会等名 18th International Prostate Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Obinata D
2. 発表標題 Epigenetic regulation of OCT1 in castration resistant prostate cancer cells
3. 学会等名 11th Eurasian Uro-Oncology Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Obinata D, Takayama KI, Funakoshi D, Lawrence M, Taylor R, Sandhu S, Risbridger G, Inoue S
2. 発表標題 Identification of OCT1 target genes involved in progression of castration-resistant AR-null prostate cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大日方大亮
2. 発表標題 治療抵抗性メカニズムから見た転移性前立腺癌治療Update
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大日方大亮, Lawrence Mitchell, 高山賢一, 高橋悟, 井上聡
2. 発表標題 去勢抵抗性前立腺癌に関するアンドロゲン受容体転写協調因子
3. 学会等名 第36回前立腺シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大日方大亮, 高山賢一, Mitchell Lawrence, Renea Taylor, Shahneen Sandhu, 船越大吾, 藤原恭子, Gail Risbridger, 高橋悟, 井上聡
2. 発表標題 多剤耐性去勢抵抗性前立腺癌におけるオクタマー転写因子(OCT1)による発現調節機構の検討
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
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	井上 聡  (INOUE Satoshi)  (40251251)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長   (82674)	
研究分担者	高橋 悟  (TAKAHASHI Satoru)  (50197141)	日本大学・医学部・教授   (32665)	
研究分担者	高山 賢一  (TAKAYAMA Kenichi)  (50508075)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・専門副部長   (82674)	

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
研究協力者	船越 大吾  (Funakoshi Daigo)		
研究協力者	山本 慎一郎  (Yamamoto Shinichiro)		

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			
オーストラリア	Monash University			