

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09572

研究課題名(和文) 前立腺癌AR-V7標的遺伝子の同定を目的とした網羅的エピゲノム解析

研究課題名(英文) Comprehensive epigenomic analysis to identify AR-V7 target genes in prostate cancer

研究代表者

今村 有佑 (Imamura, Yusuke)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10568629

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)：前立腺癌の治療として去勢抵抗性前立腺癌にいたる分子機構の一つにアンドロゲン受容体(Androgen Receptor;AR)のリガンド結合部位が欠失したAndrogen Receptor Splicing Variant7 (AR-V7)の異常発現が注目されているがAR-V7の役割については不明な点が多い。AR-V7標的遺伝子の解明およびCRPCに対する新たな治療戦略を目的とし、次世代シーケンサーを用いたRNA-seq法、ChIP-seq法により遺伝子発現およびAR、AR-V7結合部位、ヒストン修飾変化の統合解析を行い、AR-V7下流標的遺伝子を網羅的に同定、下流標的遺伝子の機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

去勢抵抗性前立腺癌におけるAR-V7発現は、AR増幅などとならびホルモン抵抗性の重要な機序の一つであるが、ARと共通する下流標的、ARとは異なる独自の下流標的など詳細な解明がなされておらず、その標的治療が未開発である。CRPCに対する新規ホルモン治療薬や抗がん剤治療薬が現在、臨床応用されているが、新たな治療抵抗性の獲得や副作用がしばしば問題となり、新たな治療戦略の確立が急務である。AR-V7の結合領域や周辺のエピゲノム変化、発現変化の統合的かつ網羅的解析によりこれまでとは全く異なる新たな治療戦略につながる可能性を有していたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：One of the molecular mechanisms leading to CRPC is the aberrant expression of Splicing Variants, specifically Androgen Receptor Splicing Variant 7 (AR-V7), in which the ligand-binding site of the androgen receptor (AR) is deleted. To elucidate the target gene of AR-V7 and to develop a new therapeutic strategy for CRPC, we have performed RNA-seq and ChIP-seq using a next-generation sequencer. We performed integrated analysis of gene expression, AR binding sites, AR-V7 binding sites, and histone modification changes by RNA-seq and ChIP-seq using next-generation sequencers to comprehensively identify downstream target genes of AR-V7 and their regulation, and to analyze the function of downstream target genes.

研究分野：泌尿器悪性腫瘍

キーワード：前立腺癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

男性の癌罹患数予測において前立腺癌は罹患数1位、死亡数第6位に位置する(国立がん研究センター統計 <http://ganjoho.jp/>)。また米国においても2017年男性罹患数予測1位、死亡数予測3位であり[Rebeccaら, *CA:Cancer J Clin*, 2017]、世界でも増加の一途をたどりその対策が喫緊の課題となっている悪性腫瘍である。

前立腺癌の治療としてアンドロゲン除去療法が初期には有効であるが、去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)への進行が臨床的問題である。CRPCにいたる分子機構の一つにアンドロゲン受容体(Androgen Receptor; AR)のリガンド結合部位が欠失したSplicing Variants、特にAndrogen Receptor Splicing Variant7 (AR-V7)の異常発現が注目されているがAR-V7の役割については不明な点が多い。

AR-V7陽性患者は陰性例と比較し、AR標的新規治療薬のPSA奏効率、PSA無増悪生存期間、全生存期間が著明に短縮しており、AR-V7検出と治療抵抗性との関連が知られている[Emmanuelら, *N Engl J Med*, 2014]。しかしながら、AR-V7の発生機序、標的遺伝子、ARとの相違点等を含め解明されていない。またARはテストステロンと結合し核内に移動、ゲノム標的領域に結合しco-factorなどをリクルートして下流遺伝子の転写を制御する。一方、AR-V7の転写様式はARと異なり、テストステロン欠乏状態においても核内に移行し転写を制御できる可能性が示唆されている。現在AR-V7特異的な治療は世界的に存在しない[Jinら, *Asian J Urol*, 2016]。現状では、ホルモン療法と抗がん剤治療による併用療法が施行されているが効果は限定的であり重篤な副作用を認める場合も多い。

### 2. 研究の目的

本研究課題の目的はCRPCにおけるAR-V7の役割をゲノムワイドに解析することで、AR-V7がCRPCにおよぼす網羅的なエピゲノム変化およびAR-V7標的遺伝子を解明し、新規治療標的の発見につなげることである。

AR-V7発現は、AR増幅などとならびホルモン抵抗性の重要な機序の一つであるが、ARと共通する下流標的、ARとは異なる独自の下流標的など詳細な解明がなされておらず、その標的治療が未開発である。本研究では、AR-V7によるクロマチン制御と下流標的遺伝子制御に着目し、がんの先駆的エピゲノム研究を進める分子腫瘍学(金田篤志教授)と共同で、AR-V7発現による去勢抵抗性獲得に至る分子機構の全容を解明し新たなCRPC治療戦略を設立するための本態解明を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、次世代シーケンサーを用いてRNA-seq法、ChIP-seq法により遺伝子発現およびAR結合部位、AR-V7結合部位、ヒストン修飾変化の統合解析を行い、AR-V7下流標的遺伝子とその制御を網羅的に同定し、これら下流標的遺伝子の機能解析を行った。また解析結果と臨床検体における発現レベルと予後などの臨床情報を統合し、臨床的意義を探る計画を立てた。

具体的には、ARを発現するLNCaP細胞株およびAR-V7を発現するLNCaP95細胞株を使用しAR/AR-V7抗体ならびにヒストン修飾(H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac)に対する免疫沈降(ChIP)を行い、次世代シーケンサー(NGS)を用いた網羅的解析(ChIP-seq)により、ゲノムワイドなAR, AR-V7の標的遺伝子を解明することを試みた。また、LNCaP95においてshRNAによってAR-V7をノックダウンし、RNAシーケンスによる網羅的発現解析を行った。同定したAR-V7下流標的遺伝子のうち、AR-V7ノックダウンによって著明に発現低下した遺伝子を同定し、AR-V7標的遺伝子についてノックダウンもしくは遺伝子強制発現により機能解析を行い、新たな治療標的となり得るドライバー標的遺伝子を同定することを試みた。

千葉大学泌尿器科において前立腺生検および前立腺全摘術にて摘出された標本を対象として機能解析を行ったドライバー標的遺伝子のコードするタンパクの免疫組織学解析および組織中の発現解析を行った。また当科の臨床データを用いて予後との関連を解析した。

### 4. 研究成果

ARを発現するLNCaP細胞株およびAR-V7を発現するLNCaP95細胞株を使用しテストステロン欠乏状態においてAR-V7も認識するN末端認識のAR抗体を用いてChIPを行ったところ結合箇所が274箇所から550箇所に増加する興味深いデータを得た。また同様にヒストン修飾について予備実験を行ったところ、これら増加したAR結合箇所においてテストステロン欠乏状態にも関わらず活性化マークであるH3K27ac、ならびにエンハンサーマークであるH3K4me1のpeakの増加が認められた。これはテストステロン欠乏状態にもかかわらず、LNCaP95はLNCaPと比較し新たな遺伝子の転写が亢進し、癌悪性化に関与している可能性が非常に高いと考えた。

ChIP-seq解析で同定された399個のAR-V7標的領域のうち、377個はARと共通の標的であり、22個がAR-V7特異的であった。これらのAR-V7標的領域と結合している78個の遺伝子はLNCaP95で高発現しており、AR-V7ノックダウンによりこれらの遺伝子を有意に抑制し、LNCaP95の細胞増殖を抑制した。78個のAR-V7標的遺伝子のうち74個がAR/AR-V7共通の標的遺伝子、4個がAR-V7特異的な標的遺伝子であり、その中で特にAR-V7ノックダウンにより、

NUP210 と SLC3A2 がそれぞれノックダウンされた。NUP210 と SLC3A2 は臨床検体の CRPC 組織で有意に発現し、そのノックダウンにより LNCaP95 の細胞増殖は抑制された。

その SLC3A2 が制御する蛋白として 4F2hc についてさらにその機能解析を行い、前立腺癌細胞 C4-2 において siRNA を用いて 4F2hc をノックダウンすると細胞増殖を抑制することが判明した。これらの細胞増殖抑制効果は、その下流である SKP2 を介して起こることがわかり、臨床検体を用いて 4F2hc の免疫組織学的解析を行ったところ、4F2hc 高発現は多変量解析の結果、無増悪生存期間の独立した予後因子であり、臨床病期およびグリソンスコアと関連し予後との関連が示唆された。これらの結果をまとめ、論文発表した。

Maimaiti M, Sakamoto S, Sudiura M, Kanesaka M, Fujiimoto A, Matsusaka K, Xu M, Ando K, Saito S, Wakai K, **Imamura Y**, Nakayama K, Kanai Y, Kaneda A, Ikehara Y, Ikeda JI, Anzai N, Ichikawa T. The heavy chain of 4F2 antigen promote prostate cancer progression via SKP-2. *Sci Rep.* 2021 Jun 1;11(1):11478.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Maimaiti Maihulan, Sakamoto Shinichi, Sugiura Masahiro, Kanesaka Manato, Fujimoto Ayumi, Matsusaka Keisuke, Xu Minhui, Ando Keisuke, Saito Shinpei, Wakai Ken, Imamura Yusuke, Nakayama Keiichi, Kanai Yoshikatsu, Kaneda Atsushi, Ikehara Yuzuru, Ikeda Jun-Ichiro, Anzai Naohiko, Ichikawa Tomohiko	4. 巻 11
2. 論文標題 The heavy chain of 4F2 antigen promote prostate cancer progression via SKP-2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-90748-9	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	坂本 信一  (Sakamoto Shinichi)  (70422235)	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
---------	---------