

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18133

研究課題名（和文）微小環境下の前立腺癌エピゲノム変化に基づく去勢抵抗性獲得機序の解明

研究課題名（英文）Epigenetic mechanism of castration resistance prostate cancer in response to tumor microenvironment

研究代表者

金坂 学斗（Kanesaka, Manato）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60775039

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は致命的疾患であり、その主因の一つに治療ストレスに付随する腫瘍微小環境への暴露に誘発されたheterogeneityの変化がある。しかしその分子機構については十分にわかっていない。本研究では微小環境が前立腺癌に及ぼす影響とその環境応答自体の違いに着目し、前立腺癌細胞を用いて低酸素刺激前後の網羅的エピゲノム解析を行った。本研究の結果から去勢抵抗性獲得前後の代謝プロファイルの変化を同定し、また微小環境に由来するエピゲノム変化が去勢抵抗性獲得に影響を及ぼす可能性を示した。

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腫瘍微小環境によるheterogeneityの変化については十分に解明されておらず、その分子メカニズムやゲノム変異以外のエピゲノム異常機構については未だ不明な点が多い。本研究はその一端を説明するものであり、微小環境への分子応答機構をゲノム変化や遺伝子発現変化より早期に起こるエピゲノム変化に着目した。治療抵抗性獲得のより早期に、さらに既存の治療戦略とは異なる視点から層別化しうる可能性を秘めており、実臨床において適切な個別化医療の展開へ繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Castration-resistant prostate cancer is a lethal disease, and one of its main causes is heterogeneity induced by exposure to the tumor microenvironment associated with treatment stress. However, the molecular mechanism is not fully understood. In this study, we focused on the effects of the microenvironment on prostate cancer and the differences in the environmental response, and performed comprehensive epigenomic analysis using prostate cancer cell lines. Our results identified alteration of metabolic profiles after the acquisition of castration resistance, and showed that microenvironment-derived epigenomic changes may influence the acquisition of castration resistance.

研究分野：前立腺癌

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 癌エピゲノム 低酸素環境

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において前立腺癌は2018年癌罹患数予測第4位、死亡数第6位に位置する[国立がん研究センター, [https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/index.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/index.html)]。超高齢社会により今後も罹患患者数の増加が見込まれ、喫緊の対策が必要な最重要の悪性腫瘍の一つである。特に標準治療のアンドロゲン除去療法(ADT)に抵抗性となった去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)は致死的であり、実臨床で使用可能なCRPC薬剤は複数あるが、各々の薬剤の選択基準や逐次療法は未だ確立されていない。またCRPC薬剤を去勢抵抗性獲得前から使用するアップフロント治療は一定の治療効果を有するが[Fizazi Kら, *N Engl J Med*, 2017]、有害事象と経済性の観点から適応症例の選択は重要な検討課題である。

これらの背景には、ADTへの適応獲得とADTによる選択により前立腺癌のheterogeneityが各治療段階で変化することが知られている[Zongら, *Nat Rev Urol*, 2013]。一方、ADTの治療ストレスにより腫瘍組織内において低酸素・低栄養・低pHといった過酷な微小環境が誘導されるが、腫瘍微小環境によるheterogeneityの変化については十分に解明されていない。限局性前立腺癌における低酸素環境と幾つかの遺伝子変異リスクの関係性は報告されているものの[Bhandariら, *Nat Genet*, 2019]、その分子メカニズムやゲノム変異以外のエピゲノム異常機構については未だ不明な点が多い。実臨床においては各症例・各治療段階で異なるheterogeneityを示す前立腺癌を適切に層別化することが求められている。

癌細胞の代謝プロファイルは組織特異的であることが多い。正常前立腺上皮細胞では亜鉛イオンの取込が豊富に行われており、この亜鉛イオンはTCAサイクルの酵素のひとつ、アコニターゼを抑制することが知られている。そのため、正常前立腺上皮細胞では主に解糖系によりATPを産生する。一方、プライマリ前立腺癌(PC)ではTCAサイクルが亢進することが知られるが、この原因の1つとして、亜鉛トランスポーターの喪失が古くから報告されている。また最近では、プライマリPCのTCAサイクル亢進の原因として、ピルビン酸をミトコンドリアに運ぶキャリアであるMPCのコンポーネントの1つのMPC2が、ARにより正に制御されていることが報告された[Bader DAら, *Nat Metab*, 2019]。しかし、CRPCにおける代謝については十分にわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、エピゲノム変化とトランスクリプトーム変化の網羅的解析に基づく微小環境変化の分子応答機構の解明を目的とする。そして難治性の主因であるheterogeneityを層別化する新たな標的因子の発見へと繋げる。

クロマチン構造などのエピゲノム変化は、遺伝子発現制御機構の一つとして世界中で研究されている。その可塑性の特徴からエピジェネティックなheterogeneityはゲノミックなものとは比してより動的で、転写制御においても可塑性をもつことが知られており、治療標的としての可能性が近年注目されている[Dawson, *Science*, 2017]。一方、前立腺癌におけるこれらのエピゲノム研究は限られており、本研究では前立腺癌の微小環境応答を、クロマチン構造をはじめとしたエピゲノムの観点から網羅的に解明することを目的とした。

またこれらの結果は、去勢抵抗性獲得のメカニズムに迫る分子生物学的な新規知見を生む可能性のみならず、臨床検体に適応可能なクロマチン構造解析を用いる点で、臨床応用の可能性を秘めている。さらには、CRPC治療において常に考慮すべきheterogeneityの多様性を、クロマチン構造変化という新たな視点から層別化する治療戦略の基盤を築く。

## 3. 研究の方法

細胞株は、プライマリ前立腺癌モデルとしてLNCaPを、CRPCモデルとしてLNCaP95とPC-3を使用した。臨床検体のデータは、公共データベースを用いた。トランスクリプトームはRNA-seqを、エピゲノムはChIP-seq(H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, FOXA1, AR)とFAIRE-seqとHi-Cを施行した。代謝アッセイは細胞外フラックスアナライザーを用いて評価した。

また安定的にCas9を高発現するLNCaPとLNCaP95を樹立し、CRISPR/Cas9システムを用いた標的経路関連遺伝子群のドロップアウトスクリーニングを施行した。

## 4. 研究成果

### (1) 網羅的トランスクリプトーム解析による代謝プロファイル変化の同定

まず臨床検体のトランスクリプトーム情報から GSEA 解析を行った。プライマリ PC と Benign PC を比較すると、プライマリ PC では酸化的リン酸化の遺伝子群が発現上昇していることを確認した。一方、CRPC とプライマリ PC を比較すると酸化的リン酸化の遺伝子群は CRPC で発現低下していた。また興味深いことに解糖系の遺伝子群が CRPC で発現上昇していた。続いて細胞株の RNA-seq を用いて同様の発現変化が起きていることを検証した。CRPC モデルである LNCaP95 と PC-3 では、プライマリ PC モデルの LNCaP と比較して、アンドロゲンレスポンスの遺伝子群が発現低下している一方で、解糖系の遺伝子群は臨床検体と同様に CRPC 細胞株でも発現上昇していることが確認された (図1)。

実際の代謝プロファイルの変化は細胞外フラックスアナライザーを用いた解糖系ストレステストを行い評価した。解糖系代謝の指標である細胞外酸性化速度は、CRPC 細胞株の LNCaP95 と PC-3 どちらにおいても、プライマリ PC の LNCaP と比較して、解糖系と解糖系キャパシティが亢進していた。

次に低酸素環境を用いて解糖系へのシフトを促す実験を行った。低酸素は細胞代謝を ATP 産生効率の悪い嫌氣的解糖系へシフトさせることが知られるが、酸化的リン酸化が亢進している LNCaP を低酸素刺激すると、細胞増殖は抑制された。一方、解糖系が亢進している CRPC 細胞株では、興味深いことに低酸素刺激により細胞増殖は有意な変化を認めなかった。さらに解糖系代謝に依存しているかを確認するため、薬剤を用いて解糖系経路の阻害実験を行い、細胞増殖能を評価した。CRPC 細胞株ではより細胞増殖抑制効果を認め、解糖系により依存的事であることが示された。

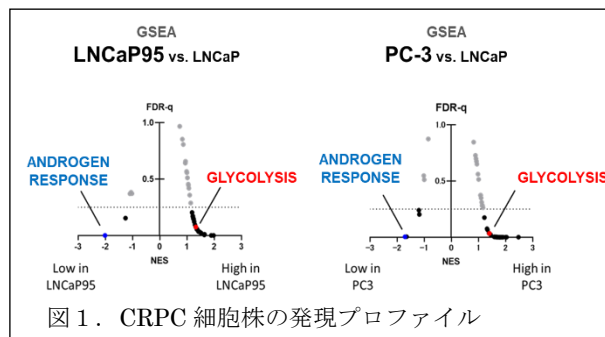


図1. CRPC 細胞株の発現プロファイル

### (2) エピゲノム解析による代謝プロファイル変化の分子機構解明

上記の遺伝子発現変化を起こすメカニズムを探るため、エピゲノムに着目した。CRPC で発現上昇していた解糖系遺伝子セット 200 遺伝子を用いた。正確にエンハンサー領域を抽出するために、Hi-C 法により計算された Topologically Associating Domain (TAD) と呼ばれる、空間的に近接し相互作用している領域を検討した。解糖系遺伝子を含む TAD 内にある活性化領域を、TSS と non-TSS の領域に分け、ヒストン修飾である H3K4me3 と H3K4me1 のピークからそれぞれプロモーターとエンハンサーであることを確認した (図2)。

それぞれの領域をモチーフ解析したところ、エンハンサー領域では特定の候補転写因子モチーフが濃縮していることを確認した。そこで候補転写因子の ChIP-seq を行い、この解糖系遺伝子のエンハンサー領域において確かに結合が増加していることを示した。細胞株で確認したこのようなエピゲノム変化が臨床検体でも起こっていることを公共データベースを用い検証した。

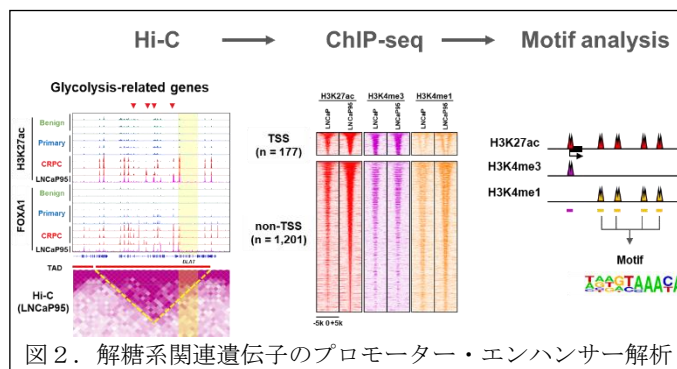


図2. 解糖系関連遺伝子のプロモーター・エンハンサー解析

### (3) CRISPR/Cas9 システムを用いた解糖系経路の機能評価

最後に、具体的な解糖系経路の機能面を評価するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて、解糖系関連遺伝子のドロップアウトスクリーニングを行った。解糖系経路に関連する代表的な代謝酵素をコードする遺伝子をパネル遺伝子としてフローサイトメトリーを用いて評価した (図3)。LNCaP95 において essential かつ CRPC で発現上昇する候補遺伝子を抽出した。候補遺伝子を用いて臨床予後解析を行った。また、これら候補遺伝子の新規治療標的としての可能性を引き続き探索していく。

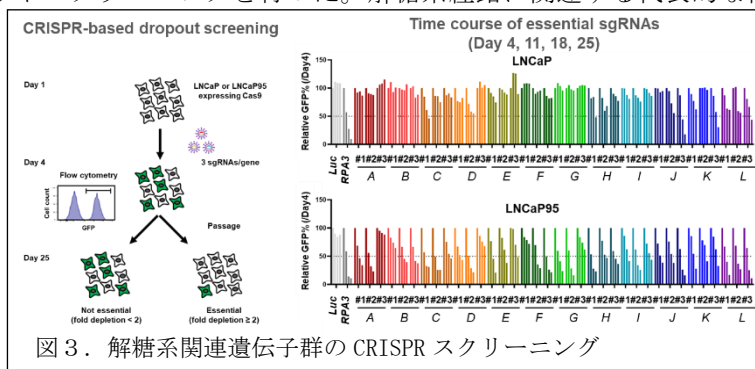


図3. 解糖系関連遺伝子群の CRISPR スクリーニング

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanesaka Manato, Sakamoto Shinichi, Yamada Yasutaka, Rii Junryo, Maimaiti Maihulan, Sazuka Tomokazu, Imamura Yusuke, Komiya Akira, Akakura Koichiro, Ikehara Yuzuru, Nakatsu Hiroomi, Ichikawa Tomohiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Revision of CHARTED and LATITUDE criteria among Japanese de novo metastatic prostate cancer patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Prostate International	6. 最初と最後の頁 208～214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pnrl.2021.06.001	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 Rii Junryo, Sakamoto Shinichi, Sugiura Masahiro, Kanesaka Manato, Fujimoto Ayumu, Yamada Yasutaka, Maimaiti Maihulan, Ando Keisuke, Wakai Ken, Xu Minhui, Imamura Yusuke, Shindo Norihisa, Hirota Toru, Kaneda Atsushi, Kanai Yoshikatsu, Ikehara Yuzuru, Anzai Naohiko, Ichikawa Tomohiko	4. 巻 112
2. 論文標題 Functional analysis of LAT3 in prostate cancer: Its downstream target and relationship with androgen receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3871～3883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14991	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 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 Sugiura Masahiro, Sato Hiroaki, Okabe Atsushi, Fukuyo Masaki, Mano Yasunobu, Shinohara Ken-ichi, Rahmutulla Bahityar, Higuchi Kosuke, Maimaiti Maihulan, Kanesaka Manato, Imamura Yusuke, Furihata Tomomi, Sakamoto Shinichi, Komiya Akira, Anzai Naohiko, Kanai Yoshikatsu, Luo Jun, Ichikawa Tomohiko, Kaneda Atsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Identification of AR-V7 downstream genes commonly targeted by AR/AR-V7 and specifically targeted by AR-V7 in castration resistant prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 100915 ~ 100915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2020.100915	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 Sugiura Masahiro, Sato Hiroaki, Kanesaka Manato, Imamura Yusuke, Sakamoto Shinichi, Ichikawa Tomohiko, Kaneda Atsushi	4. 巻 28
2. 論文標題 Epigenetic modifications in prostate cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 140 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14406	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 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Manato Kanesaka, Hiroaki Sato, Masahiro Sugiura, Takayuki Hoshii, Atsushi Okabe, Masaki Fukuyo, Bahityar Rahmutulla Nawai, Shinichi Sakamoto, Akira Komiya, Tomohiko Ichikawa, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Relationship between epigenetic and metabolic alterations in castration-resistant prostate cancer
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金坂 学斗、佐藤 広明、杉浦 正洋、金岡 尚志、星居 孝之、岡部 篤史、福世 真樹、縄井バハテヤリラヒムトラ、今村 有佑、坂本 信一、小宮 顕、金田 篤志、市川 智彦
2. 発表標題 去勢抵抗性獲得後のエピゲノム変化に由来する前立腺癌の代謝シフトについて
3. 学会等名 第36回前立腺シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manato Kanesaka, Takayuki Hoshii, Atsushi Okabe, Hiroaki Sato, Sanji Kanaoka, Masahiro Sugiura, Masaki Fukuyo, Bahityar Rahmutulla Nawai, Shinichi Sakamoto, Akira Komiya, Tomohiko Ichikawa, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Identification of metabolic shift mediated by epigenetic alteration in castration resistant prostate cancer
3. 学会等名 The 8th Cancer Epigenomics Symposium
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manato Kanesaka, Hiroaki Sato, Masahiro Sugiura, Takayuki Hoshii, Atsushi Okabe, Masaki Fukuyo, Shinichi Sakamoto, Akira Komiya, Tomohiko Ichikawa, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Alterations in response to hypoxia in gaining castration resistant prostate cancer
3. 学会等名 The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金坂 学斗、佐藤 広明、杉浦 正洋、岡部 篤史、福世 真樹、今村 有佑、仲村 和芳、坂本 信一、小宮 顕、金田 篤志、市川 智彦
2. 発表標題 去勢抵抗性獲得前後の前立腺癌における低酸素応答の相違について
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>千葉大学大学院医学研究院泌尿器科学ホームページ  <a href="https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/urology/">https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/urology/</a>          千葉大学大学院医学研究院分子腫瘍学ホームページ  <a href="https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/moloncol/index.html">https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/moloncol/index.html</a></p>
---

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------