

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09372

研究課題名（和文）FGF-FGFR活性化去勢抵抗性前立腺癌オルガノイドの解析による個別化医療の探求

研究課題名（英文）Personalized medicine through the analysis of organoids derived from FGF-FGFR-activated CRPC

研究代表者

亭島 淳 (Teishima, Jun)

神戸大学・医学研究科・特准准教授

研究者番号：20397962

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）：去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）は前立腺癌にもっとも重要な役割を果たすとされるアンドロゲンレセプター（AR）非依存性である事を大きな特徴とし、線維芽細胞増殖因子FGFファミリーシグナル活性と関連付けられる集団の報告がある。申請者らのグループは、AR発現を制御する可能性のあるエピジェネティック因子であるヒストン脱メチル化酵素KDM6Aに着目した。前立腺癌細胞株を用いてKDM6Aを欠失させると、ARの発現がタンパクレベルで著明に低下する事を確認した。さらにKDM6Aの欠失により、エンドクラインFGFの発現が有意に低下する事を観察した。

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（CRPC）は前立腺癌にもっとも重要な役割を果たすとされるアンドロゲンレセプター（AR）非依存性である事を大きな特徴とし、線維芽細胞増殖因子FGFファミリーシグナル活性と関連付けられる集団の報告がある。申請者らのグループは、AR発現を制御する可能性のあるエピジェネティック因子であるヒストン脱メチル化酵素KDM6Aに着目し、研究を行なった。その結果、KDM6Aの機能欠失によりARの発現が低下すると同時に、エンドクラインFGF（FGF19,21,23）の発現が全て有意に低下する事が判明した。申請者らの研究成果は、今後のCRPC研究のAR非依存性獲得解明に向けた重要な布石となる。

研究成果の概要（英文）：Castration-resistant prostate cancer (CRPC) is largely characterised by its androgen receptor (AR)-independence, which is thought to play the most important role in prostate cancer, and has been reported in populations associated with fibroblast growth factor FGF family signalling activity. The applicant group focused on the histone demethylase KDM6A, an epigenetic factor that may regulate AR expression. Using a prostate cancer cell line, they confirmed that deletion of KDM6A markedly reduced AR expression at the protein level. Furthermore, we observed that the expression of endocrine FGF was significantly reduced by deletion of KDM6A.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)の中でも特に治療抵抗性となるアンドロゲンレセプター(AR)陰性症例では、これまで広く知られてきた神経内分泌分化(NE)を有する癌の他に高頻度に繊維芽細胞成長因子とその受容体(FGF-FGFR)のシグナル活性化で特徴づけられる症例集団の存在が報告されており、個別化医療の確立と新たな治療標的の同定のために FGF-FGFR の多様な分子機構の解明が急務である。オルガノイドは患者ごとの組織の特性を *in vitro* で忠実に再現することができる画期的なモデルである。我々はすでに患者由来 CRPC オルガノイドの樹立と薬剤感受性の解析に成功しており、今後はこれを用いて前立腺癌研究を進めていくことで全く新たな知見を得ることが可能ではないかと考えている。

2. 研究の目的

本研究ではオルガノイドを用いて患者ごとに異なる FGF-FGFR シグナルの異常を解明する。本研究を介して、CRPC 症例ごとの FGF-FGFR シグナルの異常と薬剤感受性が明らかになることが期待される。

3. 研究の方法

FGF ファミリーのうちエンドクライン FGF (FGF19, 21, 23) 特異的な定量 PCR 用 Primer を作成し、ヒト前立腺癌に対する前立腺生検検体を用いた発現量の観察を行う。In silico 解析を用いて、AR 非依存性 (AR 陰性) 獲得に関与する遺伝子変異を探索する。そこで得られた遺伝子を CRISPR - Cas9 を用いて欠失させ、FGF ファミリーとの関連性を観察する。

4. 研究成果

申請者らは CRPC 患者由来オルガノイドを作成して、FGF3, FGF4, FGF19, FGF21, FGF23, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 の発現解析を行った。さらに前立腺周囲脂肪組織でも同様に FGF-FGFR シグナルの亢進を確認した。次に CRPC 患者由来オルガノイドにドセタキセル、カバジタキセルを添加し、薬剤感受性を調べた。ドセタキセル、カバジタキセル存在下で培養・継代し、各薬剤耐性オルガノイド作成を試みたが、ここでオルガノイドの定常的な継代が極めて困難となる問題に直面した。

そこで、申請者らはそれと別個に、AR とは別の機序により FGF ファミリーの発現自体を上方で制御する可能性のある遺伝子変異の探索を行った。その結果、前立腺癌のみならず多数の癌研究において着目されるエピジェネティック因子であるヒストン脱メチル化酵素 KDM6A の機能欠失型変異に着目した。KDM6A は、ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のメチル基を me3 から me2、そして me1 に脱メチル化させることで、グローバルに標的遺伝子の発現制御を行っていると考えられ、その機能欠失を有する場合がん発症に寄与するとされることから、がん抑制遺伝子として広く知られている。

前立腺がんにおいても一定数 KDM6A 機能欠失型変異を持つ集団の存在は確認されている。そこで In silico 解析を用いて前立腺癌集団における AR と KDM6A の発現相関を調べたところ、有意な正の相関を確認した。(図 1)

図 1. KDM6A と AR の遺伝子発現相関図

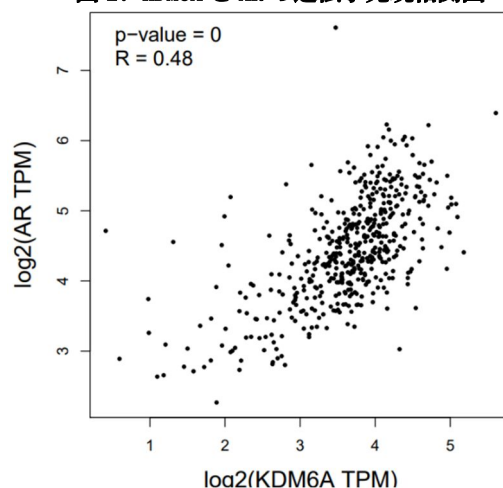
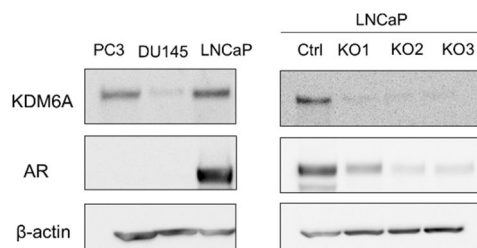


図 2. 前立腺癌細胞株における KDM6A と AR 発現

この事は、KDM6A の発現低下により AR の発現も抑制される事を示唆している。そこで、我々は次に 3 種類のヒト前立腺癌細胞株を用いて、KDM6A と AR の発現を観察し、LNCaP 細胞株においていずれのタンパクも共に発現している事を確認した(図 2 左側)。そこで、次に LNCaP 細胞株を用いて CRISPR-Cas9 系によるヒト前立腺癌細胞株の KDM6A のノックアウト (KO) 株

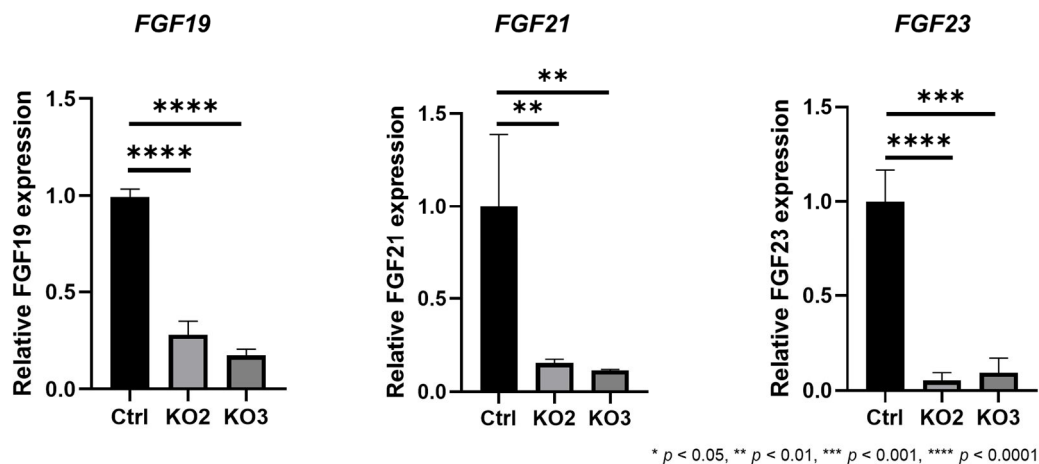


を作成した。異なる配列を標的とした sgRNA 3 種類用意し、3 種類の KO 株を作成し、AR の発現をタンパクレベルで観察したところ、いずれの KO 株においても AR の発現がコントロールと比較して著明に低下している事を確認した (図 2. 右側)。

このことから、前立腺癌における AR の発現は、その上流で KDM6A によりエピジェネティックに制御を受けている事が判明した。

次に、この KDM6A と、FGF ファミリーのうち特にエンドクライン FGF (FGF19, 21, 23) の発現について相関を調査するため、定量 PCR により mRNA 発現を相対的に評価した。その結果、KDM6A-KO 株では、FGF 19, 21, 23 の 3 種類全ての遺伝子発現レベルが有意に減少している事が判明した (図 3)

図 3. KDM6A-KO 細胞株と対照株における FGF19, 21, 23 の mRNA 発現比較

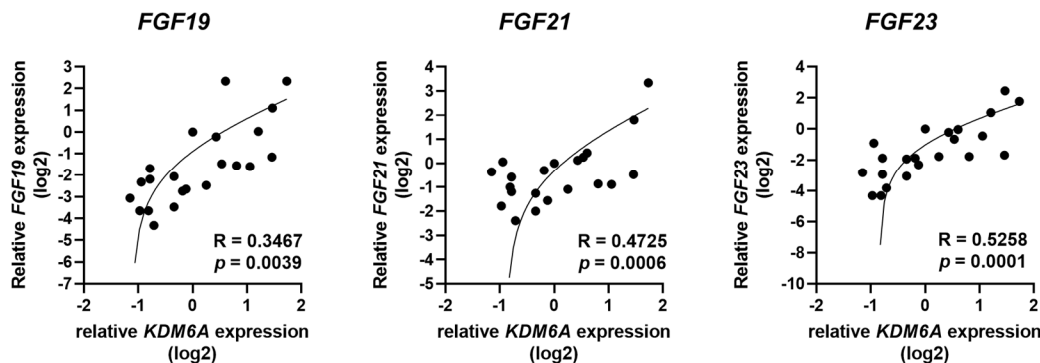


この現象を更に評価するため、ヒト前立腺がんのうち、診断時に転移性去勢感受性前立腺癌と診断された 22 症例分の前立腺生検検体を用意した。これらの生検検体から total RNA を抽出し、定量 PCR による各遺伝子の発現比較を行った。

その結果、KDM6A の発現とエンドクライン FGF の発現には、それぞれ有意な正の相関 (FGF 19 : R = 0.3467, FGF 21 : R = 0.4725, FGF 23 : R = 0.5258) が確認された (図 4)。

図 4. 転移性前立腺癌組織における KDM6A とエンドクライン FGFs の遺伝子発現相関

転移性去勢感受性前立腺癌組織 (n = 22)



以上をまとめると、前立腺癌における AR 陰性症例には KDM6A の機能欠失が関与している可能性があり、また KDM6A の機能欠失により FGF ファミリーの一部、特にエンドクライン FGFs の発現が抑制される事が判明した。本研究成果を基に、AR 陰性前立腺癌と FGF-FGF R シグナルの関連について更なる研究を続けていく予定である。

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	小島 浩平 (Kobatake Kohei) (10749998)	広島大学・病院（医）・助教 (15401)	
研究分担者	坂本 直也 (Sakamoto Naoya) (20571798)	国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長 (82606)	
研究分担者	後藤 景介 (Goto Keisuke) (30784251)	広島大学・病院（医）・助教 (15401)	
研究分担者	関野 陽平 (Sekino Yohei) (30837810)	広島大学・病院（医）・医科診療医 (15401)	
研究分担者	池田 健一郎 (Ikeda Kenichiro) (50624863)	広島大学・病院（医）・助教 (15401)	
研究分担者	林 哲太郎 (Hayashi Tetsutaro) (60612835)	広島大学・医系科学研究科（医）・講師 (15401)	

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 分担者	井上 省吾 (Inoue Shogo) (90457177)	広島大学・病院（医）・講師 (15401)	
研究 分担者	日向 信之 (Hinata Nobuyuki) (10598816)	広島大学・医系科学研究科（医）・教授 (15401)	

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