

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16727

研究課題名（和文）前立腺癌におけるAR依存性を軸としたエピジェネティックな治療抵抗性獲得機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of epigenetic mechanisms of treatment resistance in prostate cancer through AR dependency

研究代表者

佐藤 広明 (Sato, Hiroaki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50813250

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）で治療抵抗性獲得に応じて変化するエピゲノム情報や遺伝子群を同定するため、各種細胞株や各病態毎の患者由来組織から、網羅的統合解析を行なった。オープンクロマチン領域に着目すると、CRPCは大きく2群に大別され、各群を特徴づける転写因子候補を抽出し、機能解析を継続している。また、3次元クロマチン構造変化に着目したところ、CRPCでは不活性化から活性化へとコンパートメントシフトを呈している領域も特徴的であることが判明した。CRPCで発現上昇するメチル化酵素NSD2によりエピゲノム変化が生じ、この下流の重要遺伝子としてKIF18A遺伝子が重要であることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌は本邦においても欧米諸国においても男性罹患率上位の重要疾患であり、その治療抵抗性病態である去勢抵抗性前立腺癌に対する新規治療戦略の開発が望まれている。我々は前立腺癌の治療抵抗性獲得の分子機構について、エピゲノムの観点から解析を行なっている。自施設と公共データベースを用いた網羅的統合解析を行っており、エピゲノムの観点からグローバルな新規知見が得られた点で、学術的意義が高いと考えられる。社会的に克服すべき治療抵抗性病態である去勢抵抗性前立腺癌に対する臨床応用へと繋がる、大きな社会的意義を有していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In castration resistant prostate cancer (CRPC), we performed a comprehensive integrated analysis of various cell-lines and patient-derived tissues for each disease state to identify epigenomic information and gene clusters that change in response to the acquisition of treatment resistance. Focusing on open chromatin regions, CRPCs are broadly clustered into two groups, and candidate transcription factors that characterize each group have been extracted, and functional analysis is ongoing. In addition, focusing on three-dimensional chromatin structural alterations, we found that CRPCs are characterized by a compartment shift from inactive to active state, and we identified the KIF18A gene as an important downstream gene.

研究分野：泌尿器悪性腫瘍

キーワード：前立腺癌 がんエピゲノム 去勢抵抗性 クロマチン構造

1. 研究開始当初の背景

欧米諸国同様、本邦において前立腺癌は男性罹患数ならびに死亡数上位の悪性腫瘍で、長寿大国である本邦では今後も罹患患者数増加が見込まれ、喫緊の対策が必要な最重要の癌の一つである。前立腺癌がアンドロゲン依存性であることは古くから知られ、アンドロゲン除去療法 (ADT) は現在も標準的な全身治療である。ADT は初期には非常に有効であるものの、のちに治療抵抗性を獲得し去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) に移行する。近年、臨床応用されている新規 CRPC 治療薬が登場してきているが、各薬剤の正確な効果予測は困難であり、明確な選択基準は確立していない。さらに、これら既存の新規 CRPC 治療薬にも抵抗性を示す症例や、一部には神経内分泌前立腺癌 (NEPC) へと進展する症例も存在し、依然として致命的な病態であることが重要な臨床的課題となっている。

ADT の作用機序はアンドロゲンの供給阻止、あるいは、アンドロゲンとアンドロゲン受容体 (AR) との結合阻害であり、いずれもアンドロゲン・AR 間を標的とした治療戦略である。CRPC の治療抵抗性獲得分子機構として、ADT による腫瘍不均一性の変化が知られており、詳細にはゲノム異常等の集積から、AR シグナル変化・PI3K-AKT シグナル異常・DNA 修復異常・細胞周期異常・細胞運命の可塑性などが生じている事が報告されてきた。しかしながら、これら知見の実臨床応用は前述の通り未だ課題が多い。また、ゲノム異常以外のエピゲノム異常機構に関しては十分な解明がなされておらず、依然不明な点も多い。各症例や各治療段階において、異なる分子的異常を有する前立腺癌を適切に層別化する事が求められている。

そこで、ADT の分子標的かつ前立腺癌のマスター転写因子である AR を軸としてエピゲノム変化に着目することで、治療抵抗性獲得における早期の変化を同定し、既存の治療戦略とは異なる視点から CRPC を層別化する事に着想した。また、ゲノム異常に基づいた既知の知見と組み合わせる事により、実臨床における適切な個別化医療展開への応用も期待される。

2. 研究の目的

本研究は AR 依存性という観点を軸として、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き、前立腺癌の治療抵抗性獲得分子機構を解明することを目的とする。CRPC および NEPC の更なる分子生物学的理解によって、難治性の主因である腫瘍不均一性を層別化する、新たな標的因子発見と臨床応用への礎を成すことを目指す。

クロマチン構造やヒストン修飾などのエピゲノム変化は、ゲノム異常に伴う変化と同様に重要な遺伝子発現制御機構の一つであり、悪性腫瘍の分子生物学分野でも世界中で研究が盛んに行われている。さらに、ゲノム変化に対してエピゲノム変化は可塑性が特徴であり、癌においても治療標的としての可能性が注目されている。一方で、前立腺癌ではゲノム異常に基づいた研究にと比べてエピゲノム研究は限られており、本研究によりエピゲノム変化を軸とした観点で前立腺癌治療抵抗性分子機構を紐解くことは、高い学術的独自性を有する。また、臨床検体からエピゲノム異常を検出することで、早期診断や治療感受性のバイオマーカーとしての有用性も期待される。新たな分子生物学的知見を得るのみならず、臨床応用への可能性を有し、広く社会に貢献し得る創造性を有する研究課題である。

3. 研究の方法

自施設にて収集済みのデータと、公共データベースから利用可能なデータを用い、正常前立腺、ADT 感受性前立腺癌、CRPC、NEPC といった各種病態ごとに分類し、網羅的統合解析を行なった。細胞株では、正常前立腺モデルとして RWPE-1、ADT 感受性前立腺癌モデルとして LNCaP、CRPC モデルとして LNCaP95、VCaP、22Rv1、NEPC モデルとして PC3、DU145 を用いた。前立腺組織検体では、正常前立腺モデルとして前立腺肥大症 (BPH) 症例、ADT 感受性モデルとして未治療前立腺癌 (Primary PC) 症例、および、CRPC 症例由来の新鮮凍結組織を用いた。これらの細胞株ならびに組織検体について、H3K27ac に対する ChIP-seq、FAIRE-seq、ATAC-seq、Hi-C などの結果をエピゲノム情報として収集した。また、RNA-seq や RNA micro array などのトランスクリプトーム情報も収集し、前述のエピゲノム情報と共に網羅的な統合解析を行なった。

統合解析から、各病態を層別化する、あるいは、治療抵抗性に関与する特異的エピゲノム変化を抽出した。抽出されたエピゲノム変化に関与する転写因子やエピゲノム修飾タンパクを絞り込み、これらが支配する下流遺伝子発現変化を同定した。さらにこれらの遺伝子発現変化の中から有意な発現変動遺伝子群を抽出し、GO 解析、GSEA 解析、pathway 解析、motif 解析などの *in silico* 解析を行った。重要な遺伝子群から絞り込みを経た標的遺伝子や、転写因子・エピゲノム修飾因子について、レンチウイルスを用いた強制発現系、shRNA あるいは siRNA を用いたノックダウン、CRISPR システムを用いたノックアウト、ならびに、特異的阻害剤投与によって、これらの機能解析を行なった。*in vitro* 解析結果を検証するために、公共データベースに登録されている解析データや、自施設における臨床試料の解析を加え、臨床的正当性ならびに妥当性の検討を行なった。

4. 研究成果

(1) オープンクロマチン領域の解析

自施設にて収集済みの臨床組織検体を用いて、FAIRE-seq を行い全ゲノム下でのオープンクロマチン領域 (OCRs) の同定を行なった。また、公共データベースに収載されている FAIRE-seq 並びに ATAC-seq の結果も利用し、統合した。BPH サンプルからは 58,250 領域、Primary PC サンプルからは 87,982 領域、CRPC サンプルからは 72,160 領域の OCRs が抽出された (図 1A)。これらの領域を比較し、各種病態特異的 OCRs を抽出したところ、いずれの病態においてもその 90%超がゲノム上の Intro や Intergenic 領域であった (図 1B)。細胞株にて収集した H3K4me3, H3K4me1, H3K27ac の ChIP-seq 結果と比較すると、これらの特異的 OCRs はエンハンサー領域により特徴付けされることが判明した。

トランスクリプトームとの統合解析を行うため、自施設で収集済みの臨床組織検体に対して RNA-seq を行なった。主成分解析を行なったところ、BPH サンプルと Primary PC は強い近接関係にあり、また、比較的均質な群に集約されている一方で、CRPC サンプルは極めて多彩な分布を呈しており、BPH/Primary PC 類似群と非類似群とに大別可能であった (図 2A)。非バイアス階層的クラスタ解析においても、CRPC は特異的な遺伝子発現パターンを呈する群 (クラスターA) と、Primary PC と同群の遺伝子発現パターンを呈する群 (クラスターB) とに大別された (図 2B)。

上述の特異的 OCRs 近傍遺伝子群と、トランスクリプトーム解析で抽出された遺伝子群とを照らし合わせ、Motif 解析から各群を特徴づける転写因子の候補を抽出した。公共データベースからの情報とも照合し絞り込みを行い、機能解析を継続中である。

図 1. オープンクロマチン領域の解析

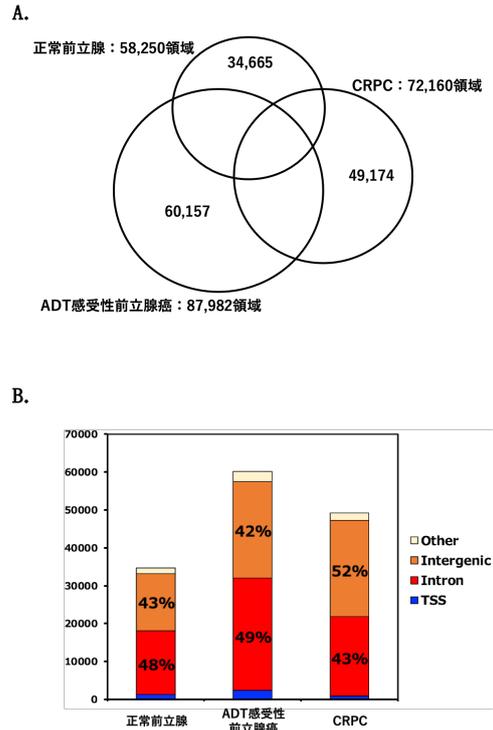
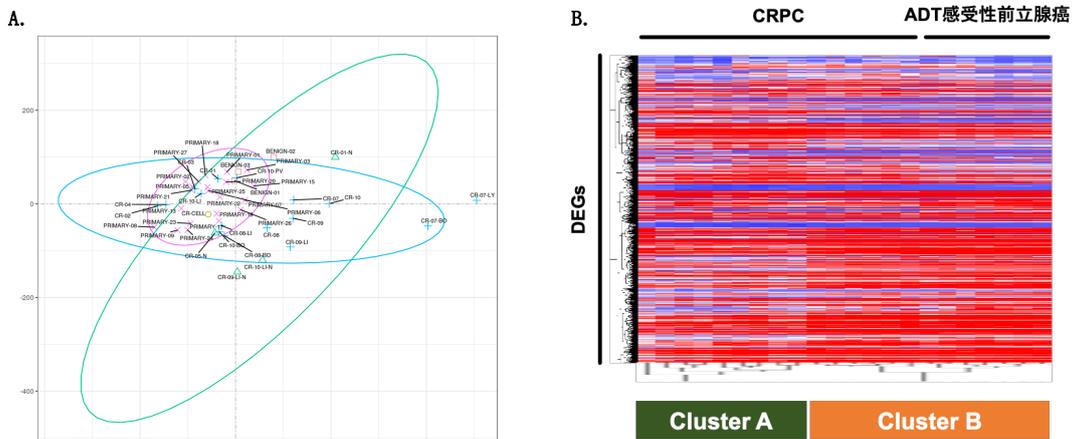


図 2. RNA-seq 解析



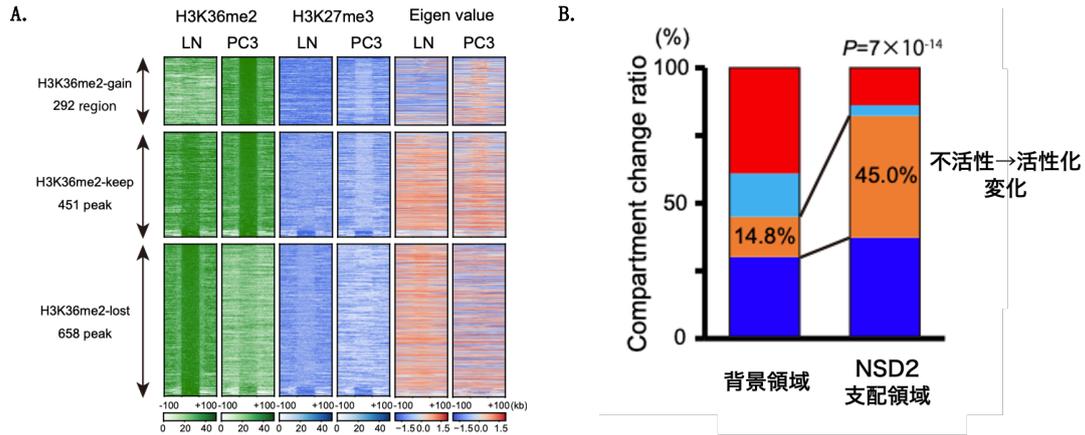
(2) 3次元クロマチン構造変化と NSD2 の関係、KIF18A の同定

近年のクロマチン構造解析により、転写制御エレメント間のループ、トポロジー関連ドメイン (TAD)、クロマチン状態に関連したコンパートメントなど、階層的なクロマチン構造が明らかになってきている。前立腺癌においては、AR による異常なループ形成が転移の進行中に報告されている他、一般的な TAD よりも小さな癌特異的な異常 TAD とその内部の転写活性化が報告されている。そこで我々は、OCRs に着目した研究と並行し、3次元クロマチン構造変化に着目した。

公共データベースならびに自施設の臨床検体データから、エピゲノム修飾因子をコードする遺伝子発現の比較を行なったところ、H3K36 メチル化酵素である NSD2 が CRPC で発現上昇しており、その予後とも相関することを同定した。細胞株を用いて Hi-C ならびに H3K36me3, H3K27me3 に対する ChIP-seq を行い統合解析したところ、CRPC で H3K36me3 が増強するクロマチン領域において、H3K27me3 が減弱し、不活性化から活性化へとコンパートメントシフトを呈している領

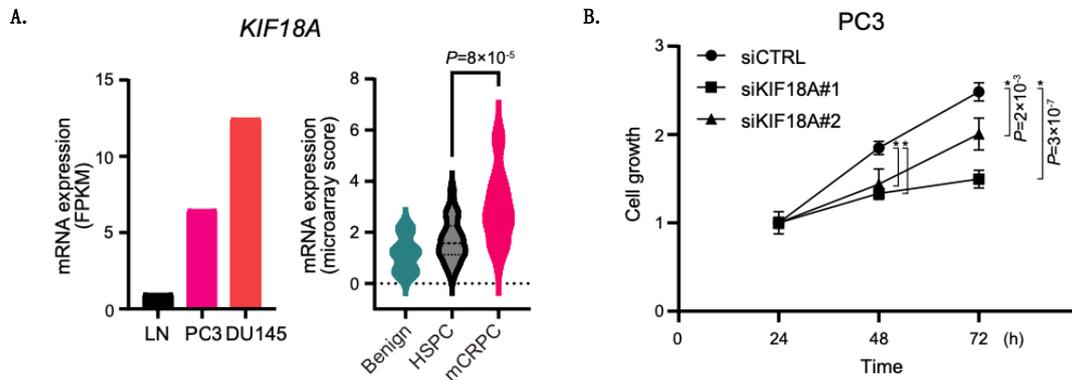
域も特徴的であることが判明した (図 3A, B)。

図 3. NSD2 が関与するクロマチン構造変化と活性化コンパートメントの活性化シフト



NSD2 支配領域から標的遺伝子を抽出し、複数の CRPC 細胞株を用いた RNA-seq から発現変動を確認し、68 遺伝子を候補遺伝子として絞り込んだ。公共データベースの遺伝子発現情報とも比較を行い、NSD2 との共発現相関からさらに絞り込みを行い、KIF18A 遺伝子を同定した。KIF18A は CRPC 細胞株で発現上昇しているのみならず、臨床組織検体においても CRPC において有意に発現上昇している遺伝子であり (図 4A)、そのノックダウンによって細胞増殖抑制効果が得られることから、CRPC の細胞増殖において重要な役割を担う遺伝子であることが判明した (図 4B)。この CRPC におけるクロマチン構造変化と重要遺伝子 KIF18A の同定は、前立腺癌の治療抵抗性に関わる新たな分子機構を示した重要な新規知見であり、国際誌 *Cancer Letters* に掲載された (Kanaoka, Sato, et al., *Cancer Lett.*, 2024)。

図 4. KIF18A の同定と機能解析



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 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Kanaoka Sanji, Okabe Atsushi, Kanesaka Manato, Rahmutulla Bahityar, Fukuyo Masaki, Seki Motoaki, Hoshii Takayuki, Sato Hiroaki, Imamura Yusuke, Sakamoto Shinichi, Ichikawa Tomohiko, Kaneda Atsushi | 4. 巻 588 |
| 2. 論文標題 Chromatin activation with H3K36me2 and compartment shift in metastatic castration-resistant prostate cancer | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Letters | 6. 最初と最後の頁 216815 ~ 216815 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2024.216815 | 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|