

【要約】

Inhibition of DOT1L reduces cell proliferation of castration resistant prostate cancer through regulating oncogenic transcription mediated by aberrant enhancers

(DOT1L 阻害は異常エンハンサーがもたらす癌遺伝子転写制御を介し、去勢抵抗性前立腺癌の細胞増殖を抑制する)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：市川智彦教授)

佐藤 広明

【背景・目的】

前立腺癌は最新の世界癌統計において、男性の罹患率第2位、死亡率第5位を占め、本邦においてもその罹患率は年々上昇し、近年では胃癌・肺癌・大腸癌と同等の罹患率が示されている、重要な癌腫である。前立腺癌においてアンドロゲン受容体 (AR) マスター転写因子であり、アンドロゲン除去療法 (ADT) は非常に有効な治療である一方、後に致死的な去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) に至ることが臨床的課題である。CRPC においては血清のアンドロゲンは去勢水準であるものの、アビラテロンやエンザルタミドといった新規 AR 阻害剤が一部有効な症例が存在するものの、その効果は限定的であり、大多数の症例が最終的には AR 阻害に抵抗性を示す。このような CRPC において生じている AR 非依存的な癌分子機構の詳細を明らかにし、新規 CRPC 治療戦略の礎を築くことを本研究の目的とする。

【試料と方法】

去勢感受性モデルとしてアンドロゲン感受性前立腺癌細胞株 LNCaP を、CRPC モデルとして LNCaP 派生の去勢抵抗性株 LNCaP95 を用い、両細胞株におけるエピゲノム・トランスクリプトーム変化を網羅的に比較検討する手法を用いた。AR 等の転写因子、H3K27ac 等のヒストン修飾、ならびに RNA ポリメラーゼ II に対する ChIP-seq を行い、エピゲノム情報をゲノムワイドに解析した。また、トランスクリプトームは RNA-seq を用い、ChIP-seq との網羅的統合解析を行った。

【結果】

AR, AR のパイオニア転写因子 FOXA1, ならびに AR の共因子として機能しアセチル化を読み取る蛋白である BRD4 の 3 者が共通してクロマチン上に結合する領域の大半は、LNCaP と LNCaP95 いずれも活性化エンハンサー領域であった。阻害剤 JQ1 ならびに shRNA によるノックダウンにて BRD4 を阻害すると、両細胞株において上記エンハンサー近傍遺伝子群の発現が抑制され、GO 解析から共通して既知の AR 標的遺伝子群が有意に濃縮した。興味深いことに、LNCaP95 には含まれない細胞周期関連遺伝子群が LNCaP では有意に認められ、実際に細胞増殖抑制効果は LNCaP では顕著であったものの、LNCaP95 では効果が乏しかった。

この差異を解明するため、次に H3K27ac の集簇から定義されるスーパーエンハンサー (SE) 領域とその近傍遺伝子群とを比較した。LNCaP では 57.5%もの遺伝子で AR 標的と SE 標的が一致したが、LNCaP95 においてはその一致率はわずか 25.3%と顕著に減少していた ($P < 0.01$)。さらに LNCaP95 では AR 標的と合致しない SE 標的のうち、JQ1 で発現が抑制されない遺伝子群の GO 解析結果から MYC pathway をはじめとした癌シグナル関連遺伝子群が有意に認められた。これら結果の臨床的妥当性をみるため、臨床検体の mRNA マイクロアレイ解析を行ったところ、CRPC で発現が上昇している SE 標的遺伝子群は AR 標的との一致率が有意に低く、かつ癌関連遺伝子群を有意に含み、臨床検体においても AR 非依存的な癌遺伝子群発

現活性化経路の関与が示唆された。

AR が誘導するエンハンサー活性化には BRD4 が重要な役割を果たしている一方で、AR 非依存的 SE に活性化される転写制御の詳細を評価するため、SE 近傍遺伝子群のヒストン修飾変化と CRPC において有意に発現上昇しているエピゲノム修飾因子との関係性に着目した。CRPC においては、H3K79 メチル化誘導酵素 DOT1L の発現が顕著に上昇しており、SE 近傍遺伝子群における H3K79me2 の ChIP シグナルが H3K27ac や BRD4 のレベルと同等に顕著に上昇していることを同定した。DOT1L の阻害剤である EPZ5676 を投与することで、H3K79me2 の ChIP シグナルは著しく抑制され、遺伝子発現が低下した遺伝子と SE 標的遺伝子群とは有意な正の相関を認めた。また、LNCaP, LNCaP95 いずれも同様の濃度依存的な増殖抑制効果が認められた。

DOT1L と BRD4 の転写制御機構の詳細を明らかにするため、EPZ5676 と JQ1 投与下における RNA ポリメラーゼ II の ChIP-seq を解析したところ、DOT1L 阻害はセリン 2 位のリン酸化を抑制することで転写終結を阻害している一方で、BRD4 阻害はセリン 5 位のリン酸化を抑制することで転写開始を阻害しているという差異が明らかになった。また、これらの ChIP シグナル変化を呈した遺伝子群を比較したところ、DOT1L 阻害には BRD4 阻害で含まれない DNA 修復関連遺伝子群が有意に含まれており、転写制御機構の差異のみならず、制御される遺伝子群の重要な差異が明らかとなった。実際に

BRD4 と DOT1L の阻害を同時併用することで、LNCaP95 に対する細胞増殖抑制効果に相乗効果が得られた。

【考察】

SE は近年、種々の癌において発癌への貢献や腫瘍不均一性への関与を示す報告が増加している一方で、CRPC における機能は明らかでない点が多い。本研究では AR 非依存的な SE が CRPC において重要な癌遺伝子群発現制御を担っていることを示した。

DOT1L は MLL 白血病を中心に、血液腫瘍においてその重要な関与と治療標的としての可能性が多数報告されている一方で、固形腫瘍における役割は解明が不十分である。本研究では CRPC においても DOT1L が癌遺伝子群発現制御に重要な機能を有していることを明らかにした。EPZ5676 は白血病を対象に第 3 相の臨床試験が実施中でヒトへの投与の安全性に関する結果も報告されつつあり、CRPC においても新規治療戦略となり得ることが示唆される。

【結論】

CRPC における AR 非依存的な異常エンハンサーがもたらす癌遺伝子転写に DOT1L が強く関与することを同定し、新規治療標的となり得ることが示された。