

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21115

研究課題名(和文)アンドロゲン受容体に着目したCRPCの薬剤耐性機構の解明

研究課題名(英文)Identification of drug resistant mechanism of CRPC focusing on androgen receptor

研究代表者

杉山 愛子(Sugiyama, Aiko)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：30642699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アンドロゲン受容体(AR)の選択的スプライシングバリエントであるAR-V7が前立腺がんにおける去勢抵抗性を獲得する要因の一つとして考えられている。今回、AR-V7を強制発現させたCRPC細胞株CAGE解析を用いたAR-V7の分子内制御機構の解明を行った。CRPC細胞株において、約2000遺伝子が発現上昇していた。これら遺伝子について機能解析を行ったところ、“endosome”、“pyrimidine metabolic process”に関連する遺伝子が多いことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Androgen deprivation therapy is standard of care for advanced prostate cancer. However, most cases will acquire resistant and progress to castration resistant prostate cancer (CRPC), the mechanism of progression to CRPC is still not clear. To understand the part of the mechanism to progression, gene interaction analysis in CRPC cell line were analyzed using CAGE analysis. Functional enrichment analysis identified about 2000 genes over-expressed in CRPC cell line and were clustered as “endosome” or “pyrimidine metabolic process”.

研究分野：前立腺癌

キーワード：内分泌療法 腫瘍学 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は本邦において、この20年間に全悪性新生物の中で最も死亡数が増加した癌腫であり、2020年には約2万人が死亡すると想定され、その対策が重要である。進行性前立腺がんに対しては抗アンドロゲン療法が標準治療として施行されており、近年、Abirateroneなどの新規薬剤により予後の改善が認められる。しかし、アンドロゲン受容体のスプライシングバリエーションの一つであるAR-V7が高発現している症例では、同薬剤に対して治療抵抗性を示すことが明らかとなり、新たな問題となっている。

2. 研究の目的

AR-V7はアンドロゲン受容体(AR)の選択的スプライシングによる転写産物の一つである。新規薬剤への治療抵抗性を示すCRPC症例において発現上昇が確認されているため、AR-V7が虚勢抵抗性を獲得する要因の一つであると考えられているが、AR-V7の発現制御機構は不明な点が多い。本研究では、AR-V7を強制発現させたCRPC細胞株の樹立を行った。また、LNCaP細胞より新規に樹立を行った新規CRPC細胞株を用いてAR-V7高発現によるCRPC内の分子機構の解明を行った。

3. 研究の方法

(1)AR-V7を強制発現させたCRPC細胞株の樹立

AR-V7の転写を活性化させるメカニズムを明らかにするために、AR-V7低発現AR抵抗性LNCaP株に同バリエーションを導入し、AR-V7を過剰発現するAR抵抗性LNCaP細胞を作成する。AR-V7高発現AR抵抗性LNCaP細胞からTotal RNAを抽出し、全長AR-V7cDNAを合成する。Lentiviral Packaging plasmidを用いてVirus supernatantを作成し、AR-V7低発現AR抵抗性LNCaP細胞に感染させ発現を誘導する。樹立された細胞株において、Western blottingでPSA, AR, AR-V7のタンパク量の確認を行う。

(2)CRPCで発現変動する遺伝子群とその機能解析

限局性前立腺がんがCRPCに移行することによって、どのような遺伝子群が変動しているのか、in vivoでの限局性前立腺がん組織とCRPCを含む公開マイクロアレイデータを用いてCRPCで発現変動する遺伝子群の抽出機能解析を行った。また、変動遺伝子間の因果関係を推定するため、ネットワーク解析を行った。

(3)AR-V7高発現細胞株で変動する遺伝子群の機能解析と転写開始点の探索

AR-V7の発現が確認されないLNCaP細胞株と、AR-V7高発現AR抵抗性LNCaP細胞株を用いて、AR-V7によって制御されている遺伝子群とそ

れら遺伝子群の転写開始点を明らかにするために、CAGE(Cap Analysis of Gene Expression)解析を行った。

4. 研究成果

(1)AR-V7を強制発現させたCRPC細胞株の樹立

ARには数多くのスプライシングバリエーションが存在するが、AR-V7はAR-V7しか保持しない「cryptic exon」を含む。そのため、このcryptic exonをターゲットにして、AR-V7全長を増幅するためのプライマーを作成し、RT-PCRによるクローニングと、sequencingによる配列決定した後に発現ベクターに組み込みAR-V7低発現AR抵抗性LNCaP細胞株への導入を行った(図1)。

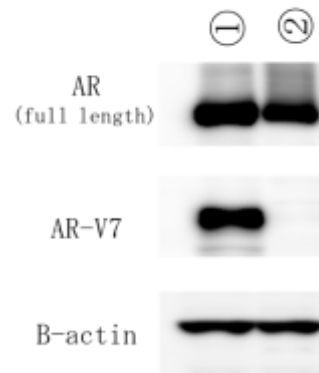


図1. AR-V7を強制発現させたCRPC細胞株のwestern blotting

- ① AR-V7強制発現CRPC細胞株
- ② Mock

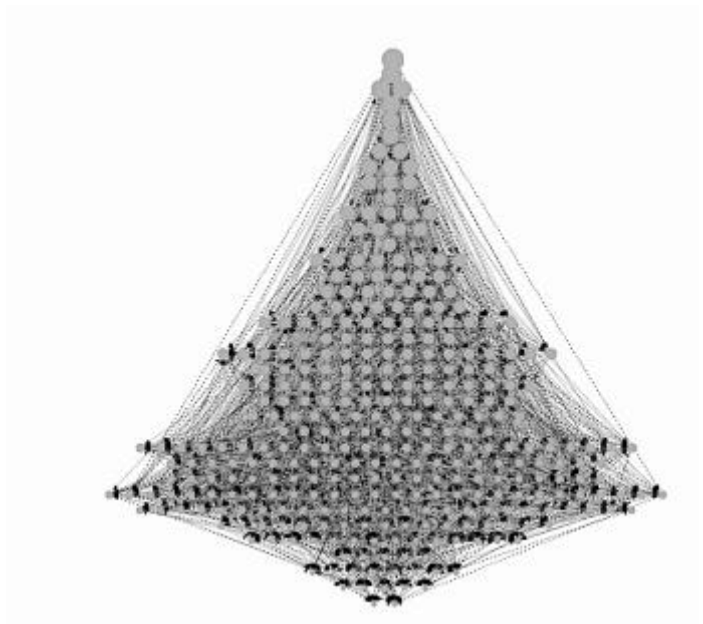
(2)CRPCで発現変動する遺伝子群とその機能解析

CRPCにおいて、変動している遺伝子を明らかにするために、in vivoの公開マイクロアレイデータを用いて、変動遺伝子の抽出を行った。CRPCにおいて、約2000の遺伝子が2倍以上、約3000の遺伝子が0.5倍以下の発現変動を示していた。これらCRPCで発現上昇を示した遺伝子群、発現低下を示した遺伝子群について機能解析ソフトウェアDAVIDを用いて機能解析を行った。さらに、この機能に関連する遺伝子群の因果関係の推定を、遺伝子ネットワーク推定プログラムSiGN-BNを用いて推定した。CRPCで発現上昇または発現低下を示した遺伝子群を多く含む機能と、その機能に属する遺伝子間のネットワーク推定結果は以下の通りである。

① CRPC で発現上昇を示した遺伝子群の機能解析と、その機能を持つ遺伝子間の因果関係の推定

- Endosomal part
- Plexin
- Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
- Cytokine receptor activity
- Tube development

約 300 の遺伝子群が以上の機能に属していた。この遺伝子群の相互関係を SiGN-BN を用いて推定した(図2)。



② CRPC で発現低下を示した遺伝子群の機能解析

- ATP activity
- Progesterone-mediated oocyte maturation
- Zinc finger
- Cytosolic part
- MAP kinase, conserved site

約 400 の遺伝子群が以上の機能に属していた。この遺伝子群の相互関係を SiGN-BN を用いて推定した (図3)。

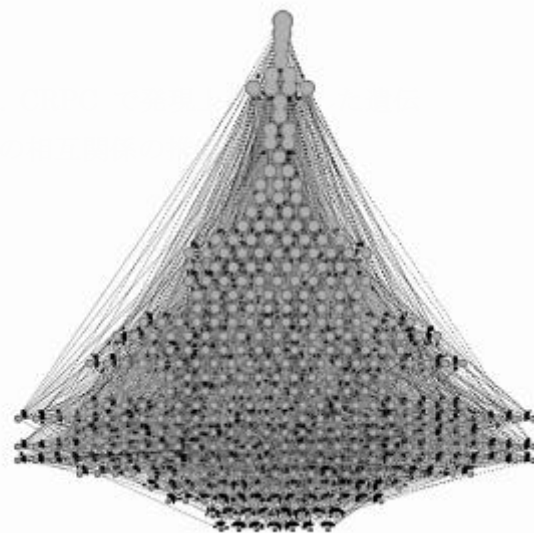


図 3. CRPC で発現低下を示した遺伝子群の相互関係の推定

丸が各遺伝子を示し、線が因果関係を示す。上部に記されている遺伝子が、制御関係の上流にあることを示す。

(3) AR-V7 高発現細胞株で変動する遺伝子の機能解析と転写開始点の探索

AR-V7 によって制御されている遺伝子群とその転写開始点を明らかにするため、CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) 解析を行った。AR-V7 高発現細胞株においては、それぞれ約 2000 遺伝子が 2 倍以上・0.5 倍以下の発現変動を示した。

今後は、CRPC 組織内で AR-V7 の高発現によって変動する遺伝子群を明らかにするため、CRPC 組織と AR-V7 高発現細胞株で共通して変動する遺伝子群を明らかにするとともに、その遺伝子群の相互の制御関係を特定する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

第 10 回 日米癌合同会議
2016年2月17日ハイアットリージェンシー、
マウイ、米国

Detection of new pathways for tumor progression to CRPC using computational

gene network based on differential gene expression profile.

杉山愛子

第 75 回 日本癌学会学術総会
2016 年 10 月 8 日パシフィコ横浜
遺伝子ネットワーク解析を用いた前立腺癌の
アンドロゲン抵抗性獲得に関する新規経路
の同定
杉山愛子、中村英二郎

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dsk.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山愛子 (SUGIYAMA AIKO)
京都大学・医学研究科・特定研究員
研究者番号：30642699

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()