

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09181

研究課題名(和文) 前立腺癌の骨転移における lncRNA の機能解明と新規治療法開発の基盤形成

研究課題名(英文) Functional analysis of prostate cancer bone metastasis-related lncRNA and establishment of the basis for the development of new therapies

研究代表者

三沢 彩 (Misawa, Aya)

国際医療福祉大学・医学部・講師

研究者番号：20598453

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)：本研究では、HOXA11-AS が骨転移した前立腺がん細胞株で高発現しており、細胞浸潤及び細胞増殖を促進し、骨転移に関わる遺伝子の発現を制御していることを見出した。転写因子 HOXB13 が HOXA11-AS の上流で機能していることを見出し、HOXB13 と HOXA11-AS が骨転移に関与することが知られている特定のインテグリンやサイトカインを協調的に調節していることを明らかにした (Misawa et al. Genes (Basel). 2021)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

lncRNA は多様な臓器のがんで異常発現することが知られている。HOXA11-AS はがんバイオマーカーとして同定されている免疫関連 lncRNA である。本研究より、HOXA11-AS が前立腺がんの骨転移に主要な役割を果たしていることが示唆された。また、lncRNA が免疫チェックポイント阻害剤との奏効と相関する結果も得られており、HOXA11-AS と発がんとの関係の解明は抗がん剤治療や免疫療法を組み合わせた新たな複合療法の開発につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that homeobox A11 antisense RNA (HOXA11-AS), a highly expressed lncRNA in cell lines derived from prostate cancer bone metastases, promotes cell invasion and proliferation of PC3 prostate cancer cells. Transcription factor homeobox B13 (HOXB13) was identified as an upstream regulator of HOXA11-AS. HOXA11-AS regulated bone metastasis-associated C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2)/C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) signaling in both PC3 prostate cancer cells and SaOS2 osteoblastic cells. The HOXB13/HOXA11-AS axis also regulated integrin subunits specific to prostate cancer bone metastasis. Furthermore, conditioned medium containing HOXA11-AS secreted from PC3 cells could induce the expression of CCL2 and IBSP in SaOS2 osteoblastic cells. These results suggest that prostate cancer HOXA11-AS and HOXB13 promote metastasis by regulation of CCL2/CCR2 and integrin signals in autocrine and paracrine manners.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：lncRNA 前立腺がん 骨転移 サイトカイン インテグリン

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでがんにおける非コード RNA (non-coding RNA, ncRNA) の発現及び機能解析を行ってきた。乳がんにおいては、種々の乳がん細胞株のがん幹細胞 (Cancer Stem Cell) 様 side population (SP) 細胞でマイクロ RNA (miRNA) -21 (miR-21) が過剰発現しており、miR-21 が SP 細胞の抗がん剤耐性及び保持に関与することを明らかにした (Misawa et al. *Oncology Res*, 2010)。前立腺がんにおいては、Short RNA シークエンス解析よりアンドロゲンで発現が上昇する miRNA を同定し、ChIP シークエンス解析より AR 結合サイト (ARBS) や転写開始点マーカーが近傍に存在する miRNA を見出して miR-22 及び miR-29a/b に焦点を当てた。これらの miRNA のターゲット探索を行った結果、ヒストンの 5 番目のメチル基 (5-mC) をヒドロキメチル基 (5-hmC) に変換する Ten-eleven translocation-2 (TET2) が共通の標的遺伝子として同定され、アンドロゲンで誘導される miR-22, miR-29a/b が TET2 を介して前立腺がんのエピゲノムに変化をもたらすことを明らかにした (Takayama#, Misawa# et al. *Nat Commun*, 2015, #co-first author) (Fig.1)。更に、RNA シークエンス解析によりアンドロゲンで発現が変化する lncRNA を探索し、同定した 10 種類のアンドロゲン応答性 lncRNA の内、SOCS2-AS1 及び POTEF-AS1 に着目した。siRNA 又は lncRNA の発現ベクターを用いた際、細胞の増殖、遊走能が抑制または亢進された。マイクロアレイ解析よりこれらの lncRNA はアポトーシスに関与することが明らかになり、臨床サンプルにおいては POTEF-AS1 が進行した前立腺がん細胞で発現が高いことを発見した。これらの研究により、SOCS2-AS1, POTEF-AS1 は前立腺がんにおいて AR 依存的にがんの進行に関わる lncRNA であることを見出した (Misawa #, Takayama KI# et al. *J Biol Chem*, 2016; Misawa et al. *Cancer Sci*, 2016)

2. 研究の目的

これまで数多くの研究で前立腺がん細胞における ncRNA の解析が行われてきたが、転移性前立腺がんにおける ncRNA の役割については不明な点が多く残されている (Misawa et al. *microRNAs in cancer*, 2012)。特に、有効な治療法がなく予後が極めて不良である骨転移した前立腺がんにおける ncRNA の役割に関してはほとんど明らかになっていない。

本研究では、新規治療標的を同定するため、前立腺がんの骨転移と転移巣における細胞増殖に関与する lncRNA の機能解析を行った。

3. 研究の方法

これまで行った lncRNA の RNA シークエンス解析結果 (GEO Accession No: GSE82225) を用いて骨転移した前立腺がん由来の VCaP 細胞株 (以下 VCaP) とリンパ節転移した前立腺がん由来の LNCaP 細胞株 (以下 LNCaP) における lncRNA の発現を比較し、骨転移性前立腺がん細胞特有の lncRNA を同定及び定量的 RT-PCR 法で検証を行った。

(a) VCaP, LNCaP の RNA シークエンスデータを用いた lncRNA の網羅的解析: 両細胞において新規又は Gencode データベースに登録されている lncRNA を Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトを用いて解析を行い、VCaP 特異的に発現している lncRNA を見出した。

(b) 細胞増殖、浸潤における lncRNA の機能解析: 同定した lncRNA が細胞増殖、浸潤に影響するか検証するため、siRNA をトランスフェクションした細胞の増殖と浸潤をリアルタイムセルアナライザー XCELLigence で解析を行った。

(c) lncRNA の上流遺伝子の同定: 公開データベース ChIP-Atlas を用いて、lncRNA のゲノム領域に結合する転写因子を見出し、Oncomine データベースを用いて特に前立腺がんを高発現している因子を絞り込んだ。更に、マイクロアレイ解析によって lncRNA と同定した上流因子の関係に関して解析を行った。

(d) lncRNA の下流遺伝子の発現解析: マイクロアレイ解析のデータより Gene Ontology 解析を行い、lncRNA が最も関与し得るパスウェイを同定し、lncRNA の発現を抑制した際の関連遺伝子の発現解析を行った。

4. 研究成果

(a) HOXA11-AS は骨転移前立腺がん細胞特異的な lncRNA である

VCaP, LNCaP の RNA シークエンスデータより、4358 種類の lncRNA を対象に、LNCaP と比較して VCaP で変動している遺伝子を見出した。最も変動している遺伝子の内、特に HOX クラスター由来の遺伝子が同定された。特に、HOXA11-AS は LNCaP と比較して VCaP で 40 倍高発現していた。前立腺がんの骨転移由来の 2 種類の細胞株、VCaP 及び PC3 細胞において HOXA11-AS が LNCaP より高発現していることを確認した。

(b) HOXA11-AS は細胞増殖及び浸潤を促進する

HOXA11-AS は多くのがん種で細胞増殖、遊走、浸潤を促進することが報告されている。そこで、PC3 細胞に HOXA11-AS 特異的な siRNA (siHOXA11-AS) をトランスフェクションし、増殖と浸潤をリアルタイムに解析した。HOXA11-AS を抑制した PC3 細胞では、コントロール細胞と比較して浸潤が顕著に抑えられた。また、細胞増殖も HOXA11-AS の抑制によって抑えられる傾向が認められた。がん転移に関与することが知られている E-Cadherin (CDH1) 及び Matrix Metalloproteinase 3 (MMP3) の発現を解析した結果、siHOXA11-AS のトランスフェクションによって CDH1 が上昇し、MMP3 が抑制される結果が得られた。従って、HOXA11-AS はこれらの因子を制御することによって PC3 細胞の浸潤を促進していることが示唆された。

(c) HOXB13 は HOXA11-AS の上流制御因子である

HOXA11-AS が制御される機構を明らかにするため ChIP-ATLAS データベースを用いて HOXA11-AS のゲノム領域に結合する転写因子を探索した。その結果、アンドロゲン受容体 (Androgen Receptor, AR), Forkhead box A1 (FOXA1) 及び Homeobox Protein Hox-B13 (HOXB13) が上流因子として同定された。Oncomine データベースにおいて種々のがん種における HOXB13 の発現を調べた結果、特に前立腺がんが高発現が認められた。HOXA11-AS 及び HOXB13 の関連を明らかにするため、HOXB13 に対する siRNA (siHOXB13) をトランスフェクションした PC3 細胞において HOXA11-AS の発現解析を行った。HOXB13 の抑制によって HOXA11-AS の発現が抑制される結果が得られ、HOXB13 は HOXA11-AS の発現を促進していることが示唆された。更に、HOXA11-AS のプロモーター領域を含む Reporter vector を用いた Luciferase Assay では、HOXB13 の抑制によって HOXA11-AS のプロモーター活性が抑えられる結果となった。前立腺がんにおける HOXA11-AS 及び HOXB13 の関係について更に理解を深めるため、これらの遺伝子を siRNA で抑制した PC3 細胞のマイクロアレイ解析を行った。HOXA11-AS 及び HOXB13 抑制細胞では同様のパスウェイが制御されていることが明らかになり、これらの遺伝子は協調的に機能していることが示唆された。

(d) HOXA11-AS が制御するパスウェイ解析

マイクロアレイのデータより Gene Ontology 解析を行った結果、HOXA11-AS が最も関与するパスウェイとして、Interferon signal, Cytokine signal, Immune system が同定された。骨芽細胞で産生され前立腺がん細胞でも発現されるケモカインとして CCL2 及びそのレセプター CCR2 が知られている。CCL2 は骨に転移した前立腺がん細胞の増殖を制御していることが報告されており、細胞分化、増殖、浸潤、遊走に関与する。PC3 細胞及び骨芽細胞株 SaOS2 において HOXA11-AS を抑制した結果、いずれの細胞においても CCL2 及び CCR2 の発現が抑制された。

ケモカインは細胞内のタンパク質と細胞膜のインテグリンの結合を制御することが知られている。公開されている臨床サンプルのデータを用いて、149 の去勢抵抗性前立腺がん患者の腫瘍から、骨、リンパ節、肺、肝臓、及びその他の臓器に転移したがん組織における HOXB13, CCL2, IBSP (Integrin Binding Sialoprotein) 及び 8 種類のインテグリンサブユニット (ITGA2, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB3, ITGB4, ITGB5, ITGB6) の発現を解析した。臨床サンプルの解析より、これらの遺伝子は全て骨に転移した前立腺がんの高い発現を示した。HOXA11-AS 及び HOXB13 を siRNA で抑制した PC3 細胞における定量 PCR 解析より、特に ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB3, ITGB4, ITGB5, IBSP が HOXA11-AS 及び HOXB13 によって制御されていることを検証した。IBSP に関しては、IBSP プロモーターを含む Luciferase vector 用いた Reporter gene assay 及び ChIP assay より、プロモーターレベルで HOXA11-AS 及び HOXB13 から制御を受けることが明らかになった。

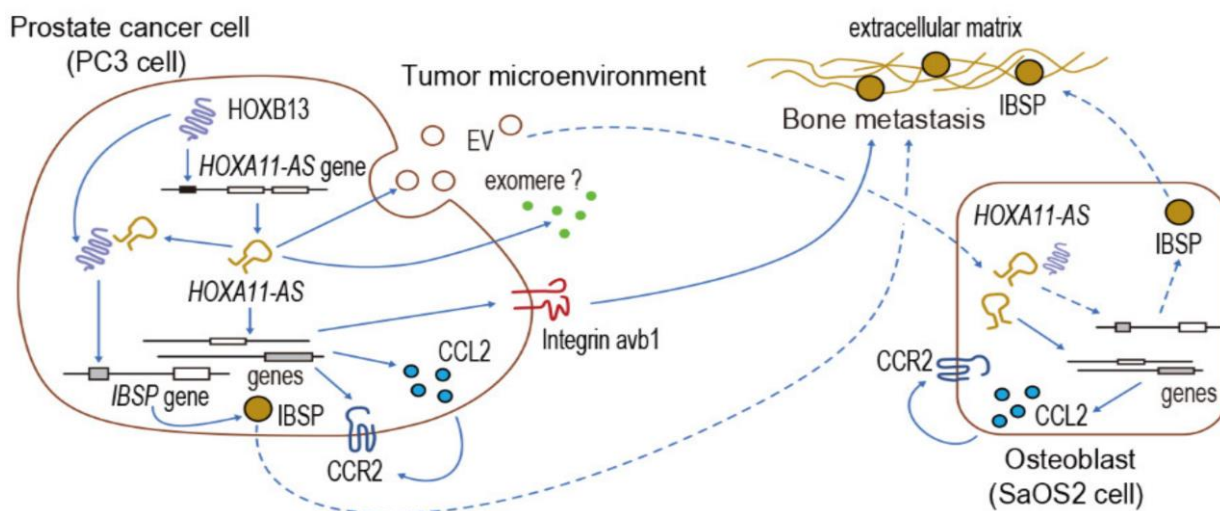
(e) 前立腺がん細胞から産生される HOXA11-AS は骨芽細胞において CCL2 及び IBSP の発現を制御する

細胞外小胞体 (Extracellular Vesicles, EV) は、がん微小環境においてがん細胞との周囲の細胞間の情報伝達を担う直径 40–150 nm 以下の小胞体である。前立腺がん細胞株における

マイクロアレイのデータ解析より、VCaP, PC3, LNCaP 及び DU145 細胞株で HOXA11-AS を含むがん転移に関連する lncRNA (MALAT-1, NEAT-1, HOTAIR) が EV に含まれていることを見出した。そこで、PC3 細胞で発現される HOXA11-AS が EV を介して骨芽細胞 SaOS2 の遺伝子発現を制御する可能性を検討した。HOXA11-AS を恒常的に発現する PC3 細胞株 (A11AS-PC3) を構築し、培養上清における HOXA11-AS を定量 PCR 法で解析した結果、コントロールの PC3 細胞と比較して検出量が多かった。A11AS-PC3 細胞の培養上清を SaOS2 細胞の培養液に添加し SaOS2 細胞における HOXA11-AS, CCL2, IBSP の発現解析を行った結果、いずれの遺伝子も優位に発現が上昇していた。HOXA11-AS は EV を介して前立腺がん細胞からがん微小環境の骨芽細胞に作用し、骨転移を促進していることが示唆された。

5. まとめ

本研究より、HOXA11-AS が骨に転移した前立腺がんで高発現をしていることを見出し、前立腺がん細胞の増殖と浸潤を促進していることが明らかになった。HOXA11-AS の上流因子として転写因子 HOXB13 を同定した。マイクロアレイ解析より HOXA11-AS が免疫系に関わり、CCL2/CCR2 及び種々のインテグリンを制御することが示唆された。HOXA11-AS は EV を介して骨芽細胞の遺伝子発現をも制御している可能性も示唆され、がん微小環境におけるがん転移のメカニズムの一端を明らかにする結果が得られた。



がん微小環境における HOXA11-AS の作用機序

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 1件）

1. 著者名 Aya Misawa, Yukihiro Kondo, Hiroyuki Takei and Toshihiro Takizawa	4. 巻 12(182)
2. 論文標題 Long Noncoding RNA HOXA11-AS and Transcription Factor HOXB13 Modulate the Expression of Bone Metastasis-Related Genes in Prostate Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes12020182	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三沢彩、近藤幸尋、武井寛幸、瀧澤俊広
2. 発表標題 分子解剖学的アプローチによる癌の骨転移における HOXA11-AS の機能解明
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 三沢彩、近藤幸尋、武井寛幸、瀧澤俊広
2. 発表標題 癌の骨転移に関与する lncRNA の機能解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 三沢彩、近藤幸尋、武井寛幸、瀧澤俊広
2. 発表標題 癌の骨転移に関与する lncRNA の分子解剖学的解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三沢彩、瀧澤俊広
2. 発表標題 前立腺癌の骨転移に関する lncRNA の同定及び機能解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会
4. 発表年 2018年

〔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	瀧澤 俊広 (Toshihiro Takizawa) (90271220)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	

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