

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16732

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌におけるAR-V7発現機構の解明とその治療適応

研究課題名(英文) Clarification of mechanisms regulating AR-V7 in castration resistant prostate cancer

研究代表者

川村 憲彦 (Kawamura, Norihiko)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：40722658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：AR-V7はARのスプライシングバリエーションの一つであり、去勢抵抗性前立腺癌において恒常的に活性状態にある。我々は、スプライシング因子であるSF3B2がAR-V7の発現に関わる遺伝子であることを同定し、実際のヒトの前立腺癌検体においてもSF3B2の発現量と癌の悪性度に相関があることを明らかにした。遺伝子の機能解析から、SF3B2はARを含む標的遺伝子の発現を調節し、また癌の増殖に関わることを明らかにした。生体内における癌の進展は、AR-V7の発現を介して行われていることを明らかにした。Pladienolide Bの投与によって生体内において前立腺癌の進展が抑制されることを明らかにした。

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の薬剤抵抗性マーカーと考えられているAR-V7が発現する原因の一つとして、SF3B2を同定した。さらには、遺伝子発現解析やPAR-CLIPなどの最先端の技術を用いて、SF3B2が癌の進展に寄与するメカニズムを明らかにした(スプライシングの調節、遺伝子発現の調節)。またSF3B複合体を抑制する化合物Pladienolide Bが、癌の増殖を抑制することが明らかになり、SF3B2が新たな治療標的となりうるということが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Androgen receptor splice variant-7 (AR-V7) is a constitutively active AR variant implicated in castration-resistant prostate cancers. Here, we show that the RNA splicing factor SF3B2, identified by in silico and CRISPR/Cas9 analyses, is a critical determinant of AR-V7 expression and is correlated with aggressive cancer phenotypes. Transcriptome and PAR-CLIP analyses revealed that SF3B2 controls the splicing of target genes, including AR, to drive aggressive phenotypes. SF3B2-mediated aggressive phenotypes in vivo were reversed by AR-V7 knockout. Pladienolide B, an inhibitor of a splicing modulator of the SF3b complex, suppressed the growth of tumors addicted to high SF3B2 expression. These findings support the idea that alteration of the splicing pattern by high SF3B2 expression is one mechanism underlying prostate cancer progression and therapeutic resistance. This study also provides evidence supporting SF3B2 as a candidate therapeutic target for treating patients with cancer.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：前立腺癌 去勢抵抗性前立腺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の去勢抵抗性獲得のメカニズムの一つに、アンドロゲンレセプター (AR) の splicing variant の出現が挙げられている。また、この variant の一つである AR-V7 は近年、去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) に対する新規内分泌治療薬への抵抗性に関与していることが報告されてきているが、この AR-V7 が発現するメカニズムについては、これまでほとんどわかっていない。我々はこの AR-V7 が発現するメカニズムの一つとして、スプライシングに関わる RNA 結合タンパクが関与していると仮説を立てた。AR-V7 発現のメカニズムの一端を明らかにできれば、これが去勢抵抗性前立腺癌の治療の礎になる可能性があると考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

前立腺癌の去勢抵抗性獲得のメカニズムの一つに、アンドロゲンレセプター (AR) の splicing variant の出現が挙げられている。また、この variant の一つである AR-V7 は近年、去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) に対する新規内分泌治療薬への抵抗性に関与していることも報告されてきている。しかし、この AR-V7 が発現するメカニズムについては、これまでほとんどわかっていない。我々はこの AR-V7 が発現するメカニズムの一つとして、スプライシングに関わる RNA 結合タンパクの一つである SF3B2 が関与していることを見出した。CRPC の進展メカニズムの一つとして SF3B2 の発現上昇が関与していると考え、本申請研究は、前立腺癌における SF3B2 の機能解析と新規治療標的としての妥当性評価を主目的とする。

3. 研究の方法

SF3B2 が AR の pre-mRNA に結合するか次世代シーケンサーを用いて解析したところ、SF3B2 は直接、AR-V7 に特異的な領域 (cryptic exon 3) に結合する予備的な結果を得ているが、この領域が AR-V7 を発現させるために必要か確かめる必要がある。SF3B2 が結合する領域を CRISPR/Cas9 でノックアウトすることで、AR-V7 発現が低下するか検討する。この実験では AR-V7 遺伝子の終止コドンの直前に EGFP をノックインした細胞を用いて、AR-V7 発現をフローサイトメトリーで解析する。この AR-V7 遺伝子に EGFP をノックインした細胞はすでに樹立済みである。さらに、AR-V7 が低下した細胞をフローサイトメトリーにて分離・回収し、qPCR にて通常の AR の発現は維持されていることを確認する。この実験により SF3B2 が結合する cryptic exon 3 領域が AR-V7 の発現に重要であることを検証する。SF3B2 の強制発現によって転移性去勢抵抗性前立腺がん細胞において AR-V7 の発現が増加する予備的な結果を得ている。また、実際の前立腺がん症例においても SF3B2 の発現量は AR-V7 発現量と正に相関することを見出している。SF3B2 は AR-V7 以外の遺伝子のスプライシングや発現を制御していると考えられるので、SF3B2 を強制発現した細胞株とコントロール細胞株から RNA を抽出し、RNA-seq を行うことで網羅的な遺伝子発現解析を行い、SF3B2 が遺伝子のスプライシングや発現にどのような影響を与えているかを解析する。Pladienolide B が AR-V7 の発現を抑制する予備的な結果を得ている。しかし、Pladienolide B が直接 SF3B2 の機能を抑制するか不明であるので、Pladienolide B が SF3B2 複合体を直接阻害するかを明らかにする。予備的な実験から、転移性去勢抵抗性前立腺がん細胞において、SF3B2 が SF3B 複合体の一部のタンパク質と相互作用することを見出しているため、タグを付加した SF3B2 を強制発現させた前立腺癌細胞株を作成し、この細胞株から SF3B2 複合体をタンパク精製し、この SF3B2 複合体に Pladienolide B を作用させた場合に、SF3B2 複合体から構成因子が解離するか検討する。前立腺癌細胞に SF3B2 を強制発現させた場合、去勢下の生体内における腫瘍の成長に影響を与える予備的な結果は得ている。また、Pladienolide B が転移性去勢抵抗性前立腺がん細胞において AR-V7 の発現を抑制する予備的な結果は得ているが、Pladienolide B が生体内で転移性去勢抵抗性前立腺がんに対し抗腫瘍効果を持つか不明である。SF3B2 を強制発現した前立腺がん細胞株とコントロール細胞株を去勢マウスへ移植し、これらの腫瘍が Pladienolide B の腹腔内投与によって、退縮するか検討する。

4. 研究成果

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 の発現は、去勢抵抗性前立腺癌がアンドロゲン非依存性に増殖できるメカニズムの一つと考えられている。しかしこのようなスプライシングバリエーションが出現するメカニズムは、これまでほとんど明らかにされていなかった。これを解明することが去勢抵抗性前立腺癌の治療の基盤になると考え、我々はこの AR-V7 の発現を制御している遺伝子とそのメカニズムを明らかにしようと考えた。

我々は、RNA 結合タンパクが AR-V7 の発現に関与しているという仮説のもと、ヒト前立腺癌組織検体の遺伝子発現解析のデータを用いて、限局性前立腺癌と去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC)、ならびに AR-V7 陽性の前立腺癌と AR-V7 陰性の前立腺癌を比較し、CRPC または AR-V7 陽性前

立腺癌組織において有意に発現が増加している遺伝子として、RNA 結合タンパク 21 種類を同定した。AR-V7 を発現している前立腺癌細胞株 22Rv1 において、これら 21 種類の遺伝子の中から、機能を抑制した場合に AR-V7 の発現が著明に低下するものとして SF3B2 を同定した。

SF3B2 の機能抑制によって LNCaP95 においても AR-V7 の発現低下が認められるだけでなく、SF3B2 を強制発現させることによって、22Rv1 と LNCaP95 において AR-V7 の発現が上昇することが明らかになり、SF3B2 と AR-V7 発現の関与が明らかになった。SF3B2 を強制発現させた前立腺癌細胞株とコントロールの細胞株を、去勢した免疫不全マウスに移植すると、SF3B2 を強制発現させた腫瘍の増大が有意に速いことがわかった。また、この腫瘍の増大は AR-V7 の発現を抑制することで抑えられることから、SF3B2 の腫瘍進展効果は AR-V7 を介したものであることが明らかになった。さらには TCGA の予後データも含めた解析を行うことにより、前立腺癌における SF3B2 の高発現が前立腺全摘後の PSA 再発と相関していることが明らかになり、SF3B2 の機能解析に焦点を当てることとした。

SF3B2 が結合する RNA を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析する手法 (PAR-CLIP) を用いて、SF3B2 の結合 RNA を同定し、そのモチーフ配列を同定した。またその中には、AR-V7 に特異的な cryptic exon 3 という AR 遺伝子内の一領域から発現する RNA が含まれていた。さらに、この領域をコードする DNA を CRISPR/Cas9 を用いて欠失させると、AR-V7 の発現が消失することがわかり、これらの結果から、SF3B2 が AR の cryptic exon 3 の領域に由来する RNA に直接結合することで、AR-V7 発現を促進する分子メカニズムが明らかになった。また SF3B2 を強制発現させた前立腺癌細胞株を用いてトランススクリプトーム解析を行い、前述の PAR-CLIP 解析の結果を合わせて、SF3B2 が AR を含む標的遺伝子のスプライシングを制御し、癌の進展に寄与していることを遺伝子発現レベルで明らかにした。

前立腺癌細胞内で SF3B2 が形成するタンパク複合体を標的とする化合物である Pladienolide B、または溶媒を、去勢した前立腺癌 Xenograft モデルマウスに投与したところ、同化合物の投与によって、有意に腫瘍の増大が抑制されることがわかり、また同化合物は SF3B2 を強制発現させた腫瘍に対して、より強い腫瘍抑制効果を有することがわかった。

以上より、SF3B2 が AR-V7 を発現させる分子メカニズムや SF3B2 が前立腺癌の進展に関わることが明らかになり、SF3B2 とその複合体を標的とする治療が CRPC に対する有効な治療となる可能性が明らかになった。

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 Kawamura N, Nimura K, Saga K, Ishibashi A, Kitamura K1, Nagano H, Yoshikawa Y, Ishida K, Nonomura N, Arisawa M, Luo J, Kaneda Y	4. 巻 79
2. 論文標題 SF3B2-Mediated RNA Splicing Drives Human Prostate Cancer Progression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5204-5217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-18-3965. Epub 2019 Aug 20.	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川村憲彦
2. 発表標題 Altered RNA splicing by SFX promotes malignancy in prostate cancer.
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川村憲彦
2. 発表標題 SFXはRNAのスプライシングを変え、前立腺癌を進展させる。
3. 学会等名 日本癌治療学会
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
---------------------------	-----------------------	----