

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09707

研究課題名(和文) ARシグナルの遮断によって活性化する前立腺癌増悪因子の探索と転移指向性の解明

研究課題名(英文) Androgen receptor signaling-controlled microRNA inhibits prostate cancer metastasis

研究代表者

野原 隆弘 (NOHARA, Takahiro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：20733372

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)：CCL2はアンドロゲン受容体(androgen receptor: AR)の活性化状態では抑制されているが、ARが不活化することで自己分泌作用が亢進し、前立腺癌細胞の遊走能を亢進させる。しかし、ARの不活性化でCCL2分泌が亢進する機序は不明であった。本研究ではまず網羅的マイクロRNA(miRNA)解析から複数の候補miRNAを抽出した。その候補の中から、ARシグナルによって発現が亢進し、かつ、CCL2を抑制的に制御しているmiRNAとしてmiR-124-3p.2を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ARによって発現がコントロールされているmiR-124-3p.2がCCL2の抑制を介して前立腺癌細胞の遊走能を低い活性状態に保つ機能を有する可能性を明らかにした。近年、ARシグナルを強力に抑制する治療を行った結果、ARシグナルに依存しない高悪性度の前立腺癌へと変化し、治療抵抗性となることが大きな問題となっている。ホルモン療法を行う場合に、miR-124-3p.2と同様の機能を有する薬を投与することにより、ARシグナルの抑制に伴う前立腺癌の進展を防ぐことができる可能性がある。現在根治の見込めない進行前立腺癌に対する新たな治療のターゲットとして、さらなる研究の促進が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：CCL2 is inhibited by androgen receptor (AR) signaling in prostate cancer cells. However, androgen-deprivation therapy suppresses AR signaling and subsequently increases CCL2 secretion, resulting in increase of migration ability by an autocrine manner. It has been unclear how AR signaling suppresses CCL2 secretion in prostate cancer cells so far. In this study, we clarified AR-regulated microRNA, miR-124-3p.2, inhibited CCL2 gene expression and it may be a novel therapeutic target to prevent prostate cancer progression during androgen-deprivation therapy.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前立腺癌 ケモカイン 去勢抵抗性 アンドロゲン受容体 マイクロRNA 遊走能

## 1. 研究開始当初の背景

日本における前立腺癌患者の新規罹患数は増加の一途を辿っており、現在男性における癌の新規罹患数では第1位となっている。検診の普及とともに臨床的に重要ではない癌が発見されているという見解もあるが、前立腺癌新規診断症例の実に12%が転移を伴う進行癌であり、根治的治療の適応とはならない状態で発見されている。前立腺癌細胞は一般にアンドロゲン受容体 (androgen receptor: AR) を発現し、アンドロゲン依存性に増殖するため、進行前立腺癌に対してはアンドロゲン除去療法 (androgen-deprivation therapy: ADT) が行なわれる。ノーベル賞受賞者 Huggins と Hodges が前立腺癌のアンドロゲン依存性を報告して以来、ADT は多くの前向き研究で検証され、生存期間延長に寄与することが証明されている。しかし、ADT は治療初期には著効する一方、ほとんどの症例で数年後には ADT に対して抵抗性を獲得した去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer: CRPC) となる。これまでの多くの前立腺癌の基礎的研究では、CRPC においてもなお AR シグナルが機能しているという点に焦点を当てていた。その成果として、AR の感受性亢進 (hypersensitivity) などの機序によって、ごく低濃度のアンドロゲンでも AR シグナルを活性化していることが CRPC の本態である可能性が明らかとなった。

当研究室でも副腎性アンドロゲンの存在が前立腺癌細胞の活性化に重要であることを突き止め (Mizokami A, et al. *Cancer Res.* 2004;64:765-71)、前立腺癌微小環境でのアンドロゲン合成機構を解明するなど (Mizokami A, Izumi K, et al. *Endocr Relat Cancer.* 2009;16:1139-55)、CRPC の機序の解明に貢献してきた。そして、これら基礎研究の成果は CRPC に対する新規 AR シグナル標的薬アピラテロンやエンザルタミドなどの臨床応用へと繋がっていると考えている。しかし残念ながら、临床上 AR シグナルをいかに抑制しようとも最終的にはさらなる転移を引き起こし、手詰まりになっていくのが現実である。特に最近では新規 AR シグナル標的薬の台頭で、徹底して AR シグナルを遮断することにより、これまでほとんど見られなかった肺・肝および副腎転移がしばしば見られるようになってきた。このような臨床的行き詰まりは、AR シグナルの完全なる遮断を目的としてきたこれまでの CRPC 研究が限界を迎えていることを示しており、AR シグナルとは別の増悪機構に基づいた新たな治療戦略による病勢のコントロールが必要となってきていると考えられる。

CRPC 患者 130 症例を対象とした臨床研究を行ったところ、治療経過で肺、肝、副腎転移が治療ライン数とともに有意に増加していることが明らかとなった (Iwamoto H, et al. *Prostate.* 2021;81:72-80)。この点からも AR シグナルの遮断で前立腺癌の進行を食い止めることは不可能であることを示唆している。実際我々は、AR シグナルの遮断は前立腺癌細胞の増殖を抑制するものの、前立腺癌細胞に上皮間葉移行をもたらし、逆に遊走能を高めることを明らかにしており、この結果は治療経過とともに肺、肝、副腎転移が増加するという臨床での現象を支持している。この機序として AR が CCL2 の分泌を制御しているため ADT によって CCL2 の分泌抑制が解除され、CCL2 が autocrine 作用で上皮間葉移行を促進する可能性について報告した (Izumi K, Mizokami A, et al. *EMBO Mol Med.* 2013;5:1383-401)。AR の活性化状態では抑制され、AR が不活化することで抑制が外れ前立腺癌細胞を活性化するという分子はこれまで知られていなかった。予備実験においては CCL2 を含めてすでに AR によって抑制的に制御されている可能性のある分子 (ケモカイン等) を複数同定している。しかし、この機序によって、一体どれだけの分子がどのように活性化されるのか、これまでに体系的に解析されたことはない。AR の不活化による CRPC 増悪のメカニズムが明らかとなれば、治療ライン数とともに増える内臓転移を抑えることが可能で、生存期間も延長することが可能ではないかと考えている。AR による制御が外れることによって増悪をきたすという機序そのものが前立腺癌治療戦略の中においてパラドキシカルで挑戦的であり、全貌を明らかにするためには網羅的解析手法でしっかりと標的を拾い上げることから始めなければならない。

## 2. 研究の目的

我々は以前から AR シグナル遮断後の CRPC 増悪機構について研究を行ってきた。AR シグナルの遮断は前立腺癌細胞の増殖を抑制するものの、逆に転移能を高めることを明らかにした。「前立腺癌の転移と言えば骨転移」と言われるほど骨転移の頻度は高い (転移の 80-90%) が、我々は CRPC 治療を重ねることにより、肺・肝・副腎転移が著しく増加することを明らかにした。これは AR シグナルを徹底的に遮断した結果、特殊な指向性を持った前立腺癌細胞が出現し (選別または形質転換され) 稀と考えられていた部位への転移を起こすようになったためと考えている。この転移指向性獲得には AR が抑制している経路が関与すると考えている。タキサン系抗癌剤や骨転移をターゲットとした放射線治療薬ラジウム 223 は、いずれも我々が考えている CRPC における前立腺癌細胞の薬剤抵抗性に関わる分子細胞学的機構を考慮した治療法ではない。AR は通常、CCL2 の分泌を抑制しているが、ADT によってその抑制が解除され CCL2 が分泌されることが転移能を高めている原因である。AR-controlled gene として AR が upregulation するもの

は多数存在するが、AR が抑制し、かつ前立腺癌細胞を活性化する分子 CCL2 の制御機構は未解明である。AR 阻害薬を投与した後の CRPC 増悪機序として、我々は AR が抑制しているこの分子に着目した。

本研究の目的は AR シグナルの活性化で抑制され、かつ前立腺癌細胞を活性化する分子 CCL2 に注目し、AR がこの分子を抑制している機構を解明することである。本研究によって明らかにされた機序から開発される治療法は、単独または ADT との併用によって CRPC 患者の予後の改善をもたらす可能性があると考えている。

### 3 . 研究の方法

(1)AR 陽性のヒト前立腺癌細胞株 LNCaP, C4-2B を使用し、AR によって抑制される micro RNA を網羅的解析手法(RNA microarray)にて探索する。

(2)また公共データベース TargetScanHuman も利用し、CCL2 遺伝子を抑制する microRNA 候補を抽出する。

(3)CCL2 は前立腺癌の転移能を促進するが、増殖能には影響を与えないため、抽出した microRNA が前立腺癌の増殖能に影響を与えないことを確認する。

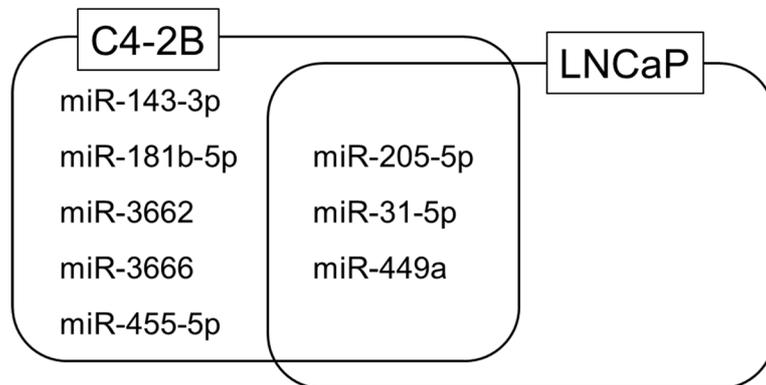
(4) 抽出した microRNA が AR をノックアウトした前立腺癌細胞株で発現低下していることを RT-PCR で確認し、さらにそれらが CCL2 の発現を亢進させることも同様に RT-PCR で確認する。

(5)(4)で条件をみたまのものをターゲットとし、DHT での発現変化を確認する。また CCL2 の分泌変化については ELISA で確認する。

(6)ターゲット miRNA の発現操作により遊走能が変化することを確認する。

### 4 . 研究成果

Script miRNA PCR Plate Array にて、C4-2B と LNCaP の siAR とコントロール(CTR)について miRNA の発現を解析した。CTR-C4-2B と比較し siAR-C4-2B で発現変化が認められたものは以下であった：miR-143-3p, miR-181b-5p, miR-3662, miR-3666, miR-455-5p, miR-205-5p, miR-31-5p, miR-449a。CTR-LNCaP と比較し siAR-LNCaP で発現変化が認められたものは以下であった：miR-205-5p, miR-31-5p, miR-449a。したがって、両細胞株 siAR で共通して低下した miRNA は miR-205-5p, miR-31-5p, miR-449a であった(右図)。なお、C4-2B と LNCaP それぞれから分泌されるエクソソームでも同様に内包される miRNA を網羅的に解析してみたが、共通の miRNA が少なく、いずれも含有量が少ないことなどから細胞内での発現量を標的とすることにした。

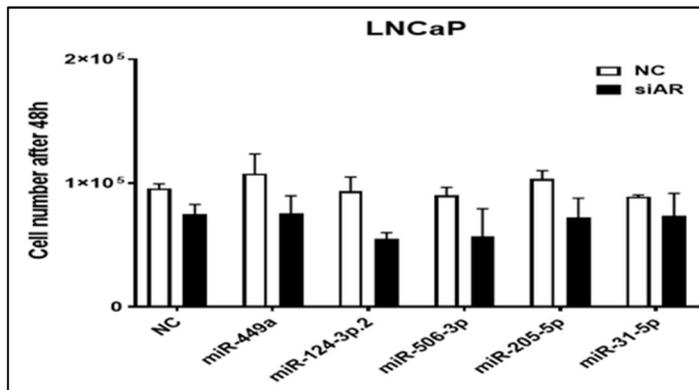


	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 113-120 of CCL2 3' UTR	5' ...UGAUGUGAAACAUUAUGCCUUA...
miR-124-3p.2	3' CGUAAGUGGCGCACGGAAUU
Position 113-120 of CCL2 3' UTR	5' ...UGAUGUGAAACAUUAUGCCUUA...
miR-506-3p	3' AGAUGAGUCUCCACGGAAUG

次に、上流 AR 側からではなく、下流 CCL2 の発現から miRNA を特定すべく、CCL2 遺伝子に結合しうる配列を持つ miRNA についてデータベース TargetScanHuman ([https://www.targetscan.org/vert\\_80/](https://www.targetscan.org/vert_80/))を用いて検索し、2つの候補が抽出された(上図)。

上記二つの結果から、miR-205-5p, miR-31-5p, miR-449a, miR-124-3p.2, miR-506-3p を AR によって制御され、かつ CCL2 を抑制している可能性のある候補 miRNA とし、この中から絞り込むこととした。

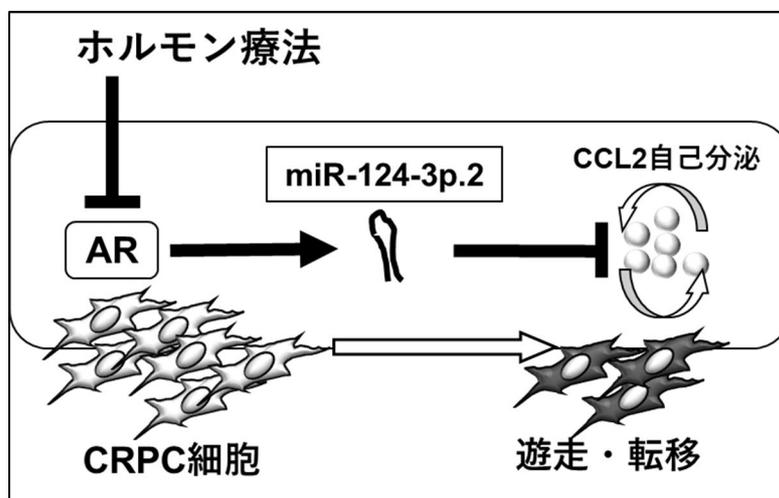
まず、前立腺癌細胞において siAR は CTR に比し増殖能が低下するが、CCL2 は基本的な機能として、AR により抑制されていることから、増殖能に影響を与えないことがわかっている。これら候補の miRNA によって前立腺癌細胞の増殖能が変化しないことを確認する必要があったため、増殖能試験を行ったところ、全ての候補 siRNA は増殖能を亢進させることは無かった（右図）。



つぎにこれらの候補 miRNA により CCL2 遺伝子の発現が変化することを確認するため、siAR-C4-2B にこれら miRNA を作用させ RT-PCR で CCL2 の発現変化を確認した。また、siAR 細胞において、これら miRNA の発現が低下することを確認するために同様に RT-PCR を行った。すると、AR シグナルの抑制で抑制され、CCL2 を抑制しているものとして miR-124-3p.2 のみが残った。さらに、AR の下流に miR-124-3p.2 が存在することを確認するために、前立腺癌細胞に DHT を作用させたところ、miR-124-3p.2 の発現は亢進した。ELISA によって、miR-124-3p.2 は CCL2 の分泌を増加させることも確認した。

最後に、siAR 細胞に miR-124-3p.2 を作用させたところ、亢進していた遊走能が低下することを確認した。

以上より、AR は miR-124-3p.2 を制御しており、miR-124-3p.2 は CCL2 遺伝子発現を抑制している、ホルモン療法により AR シグナルを抑制することで miR-124-3p.2 の抑制がはずれた CCL2 は分泌が亢進し、前立腺癌の遊走・転移を促進する可能性が明らかになった（右図）。miR-124-3p.2 は CCL2 の抑制を介して前立腺癌細胞の遊走能を低い活性状態に保つ機能があると考えられ、ホルモン療法を行う場合に、miR-124-3p.2 を投与することで前立腺癌のさらなる進展を防ぐことができる可能性が示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩本大旭、泉浩二、門本卓、八重樫洋、飯島将司、川口昌平、野原隆弘、重原一慶、角野佳史、溝上敦
2. 発表標題 新規アンドロゲン受容体シグナル伝達阻害薬とタキサン系抗癌剤は去勢抵抗性前立腺癌の内臓転移を誘発する
3. 学会等名 第70回日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2020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	溝上 敦 (MIZOKAMI Atsushi) (50248580)	金沢大学・医学系・教授  (13301)	
研究分担者	泉 浩二 (IZUMI Kouji) (80646787)	金沢大学・附属病院・講師  (13301)	

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