

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791049
 研究課題名（和文） 前立腺癌におけるアンドロゲン受容体により制御される ncRNA の同定とその機能解析
 研究課題名（英文） Identification and functional analysis of androgen-responsive ncRNAs in prostate cancer
 研究代表者
 高山 賢一（TAKAYAMA KENICHI）
 東京大学・医学部附属病院・特任臨床医
 研究者番号：50508075

研究成果の概要（和文）：

我々は long non-coding RNA の一つとして CTBP1(Carboxyl terminal binding protein 1) の antisense 領域に存在する CTBP1-AS と名づけた non-coding RNA の機能の解析を進めた。CTBP1-AS は RNA 結合部位を有するエピジェネティックな制御因子との結合、およびヒストン脱アセチル化酵素のプロモーターへの集積を誘導していることを見出した。その標的としてまずは sense 側の遺伝子である CTBP1 は AR の転写抑制因子として機能しており CTBP1-AS 依存的に制御を受けていることでアンドロゲンシグナルの活性化をもたらした。マイクロアレイ、ChIP-seq 法により CTBP1-AS の標的はゲノムワイドに存在していることが示され、標的には細胞周期制御因子が有意に含まれていた。さらに増殖への効果をヌードマウスへ移植したホルモン療法抵抗性細胞モデルを用いた実験により CTBP1-AS はこれらの抵抗性癌の増殖を導く因子であることを見出した。

また miRNA についてはアンドロゲン応答性の miRNA の一つに着目して解析を進めている。この miRNA はアンドロゲン応答性に誘導を受け、抗アンドロゲン剤 Bicalutamide 抵抗性の細胞モデルで発現が上昇していた。さらに miRNA の抑制実験を行い細胞増殖、浸潤能の制御に関与していることを見出した。臨床サンプルより RNA を lasercapture microdissection 法により採取しており癌の進行度との発現レベルでの相関を認めた。今後ホルモン療法抵抗性へのメカニズムを動物実験により立証する予定である。

研究成果の概要（英文）：

We have identified a long non-coding RNA, which is located at the antisense region of CTBP1 (Carboxyl terminal binding protein 1) and then named this transcript 'CTBP1-AS'. CTBP1-AS is induced by androgen treatment and represses CTBP1. Upregulation of CTBP1-AS in prostate cancer promotes hormone-dependent and castration-resistant tumor growth. In addition, we also demonstrated the interaction of CTBP1-AS with one of the epigenetic modifiers which has RNA-binding domains and then subsequent genome-wide regulation of gene expression. Interestingly, cell cycle regulators are significantly enriched in such regulated genes. Taken together, we demonstrated a novel hormone dependent cell cycle regulation mechanism and CTBP1-AS may be a therapeutic targets for hormone refractory prostate cancer.

We also identified and analyzed the functions of androgen-regulated miRNAs. We found one of such miRNA promotes prostate cancer growth and is related with the anti-androgen, bicalutamide-resistant cell proliferation. We are going to perform experiments of xenograft model to show the mechanism of development of hormone refractory prostate cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：ncRNA、前立腺癌、アンドロゲン

1. 研究開始当初の背景

(1)前立腺癌は高齢男性に発生率の高い癌であり、その発生、悪性化はアンドロゲンに強く依存している。アンドロゲンは前立腺上皮において細胞質中のアンドロゲン受容体(AR)と結合後、核内へと移行しゲノム中のアンドロゲン応答配列を認識することで転写因子として機能している。従って前立腺癌においてアンドロゲンがどのような転写産物を制御し癌の発生に関わっているかを解析するためには、ARの結合するゲノム領域を同定しARの下流シグナルを解析することが重要である。申請者はこれまで、クロマチン免疫沈法(ChIP)を利用しARの結合部位を同定し近傍の応答遺伝子に着目し前立腺癌におけるARの標的遺伝子を解析してきた。

(2)ncRNAは蛋白をコードしないTranscriptであり、20-30 bpと短いmiRNAと500 bp程度以上あるLong ncRNAに大別される。Long non-coding RNAについてはHOTAIRなど一部の転写産物のみしか報告がなく機能が明らかでないものが多い。一方、近年miRNAの機能に関して様々な解析が報告され、発生、分化、増殖において重要な役割を果たしていることが明らかになった。特に発癌に関する研究が注目されており、p53で誘導されるmir34ファミリーやRASを標的とするlet-7ファミリーなどが同定された。また最近アンドロゲンによって制御を受けるmiRNAとしてmir-125b、mir-21が同定された。これらのmiRNAは前立腺癌の増殖を促進しており、癌の進行に関わっている可能性が示唆された。また申請者らは前立腺癌細胞より抽出したShort RNAの次世代シーケンサーでの解析によりmir-148aがアンドロゲンによる強い誘導で高発現し前立腺癌の増殖を促進する因子であることを報告している。しかしmiRNAやlong ncRNAについての報告は未だ少なく、その作用メカニズムも明らかではない。

2. 研究の目的

アンドロゲン受容体(AR)は前立腺癌の増殖、進行に深く関与する。申請者はこれまでARのヒト前立腺癌細胞のゲノム中の結合部位(AR binding site: ARBS)を明らかにし、ARBS近傍におけるAR標的因子の機能解析を進めてきた。その解析の中でAR標的因子の中にはマイクロRNA(miRNA)、あるいはnon-coding RNA(ncRNA)も広く含まれることがわかってきた。しかしながらncRNA、特にLong ncRNAの細胞内での機能については未知

なことが多い。本研究では、申請者らは新規のncRNAを探索同定すると共に、アンドロゲンの前立腺癌における増殖促進効果、悪性化に対する影響を解析し、癌におけるncRNAの機能を明らかとし、その応用を目指す

3. 研究の方法

本研究では前立腺癌においてアンドロゲンにより制御を受けるncRNA、特にLong ncRNAを分子生物学的手法により探索し、前立腺癌細胞における機能を解析する。さらに臨床サンプルを用いることで臨床的意義を解明し前立腺癌の診断マーカー、治療標的となるncRNAの同定を目指す。

1) CAGEにより新たに見出されたアンドロゲン応答性転写開始点より3' RACEによるPCRを行い、AR結合部位を近傍に持ちアンドロゲンにより制御される新規のncRNAを同定する。

2)それらアンドロゲンで制御されるncRNAの前立腺癌での増殖における役割を解析し病理学的な重要性を検証する。In situ hybridizationまたはqRT-PCRによりncRNAの発現レベルを判定する。

3)前立腺癌の診断ツールとして臨床応用への可能性の検討を加える。4)ヌードマウスを用いた腫瘍細胞の増殖機構の*in vivo*での解析を行う。

5)ncRNAの癌での作用機序を解明する。マイクロアレイ、ChIP-seqによりゲノムワイドでの転写制御を調べる。

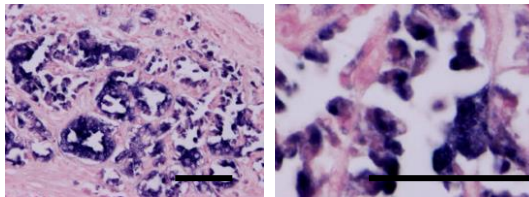
4. 研究成果

(1)アンドロゲン応答性のAS transcriptの中でCTBP1-ASが代表的なもののひとつとして同定された。CTBP1-ASはGENBANKで検索したところAX747592というNon-coding RNAの領域と一致した。転写開始点はAX747592のexon 3に存在しておりtranscriptional variantと考えられる。またRACE法によりPCRで検出されるtranscriptは5-15kbと長い領域にわたることが予想されたがNorthern blotでは5 kbにdominantなbandが検出された。以上の解析によりCTBP1-ASはlong non-coding RNAの一種と考えられた。またCTBP1遺伝子はアンドロゲンにより抑制される遺伝子でありCTBP1-ASの誘導を介してその抑制を受けていることが示唆された。CTBP1-ASはAS領域のlong non-coding RNAであり転写調節を担っていることが考えられた。

(2)CTBP1-ASは正常前立腺より癌、特に転移

組織において発現する割合が上昇することから CTBP1-AS が前立腺癌の病気の進行に関わっており、特に悪性度の高い症例において特に高発現していたことも CTBP1-AS が癌の悪性化に関わっていることが考えられた (図 1)。CTBP1 は逆に癌において正常組織より発現低下を受けており CTBP1-AS の上昇と負の相関を受けていたことより CTBP1-AS により CTBP1 の抑制が実際の臨床検体においても機能していることが示唆された。CTBP1 の抑制は前立腺癌の独立した予後マーカーとして診断への応用も考えられる。

図 1. 前立腺癌における CTBP1-AS の発現



Bar = 100 μm

(3) ホルモン療法耐性がんのモデル細胞として長期にわたり (>6か月) LNCaP 細胞をチャコール血清のみのアンドロゲン枯渇状態で培養した結果、樹立された LTAD (Long term androgen deprivation) 細胞を用いて増殖能への影響を検証した。

LTAD のアンドロゲン枯渇状態での細胞増殖は siCTBP1-AS の transfection により抑制を受けた。また腫瘍増殖については LTAD により形成された腫瘍は精巣摘出後も増殖を続けた。しかしながら siCTBP1-AS の局注により腫瘍の成長は有意に抑制された (図 2)。LTAD においては LNCaP 細胞に比較して CTBP1-AS の発現は上昇し、CTBP1 は抑制されていた。

以上の結果より CTBP1-AS は長期アンドロゲン枯渇によりホルモン療法抵抗性となった前立腺癌がホルモン枯渇抵抗性に増殖するときにおいて増殖促進にポジティブに働いている可能性が示唆された。

図 2. CTBP1-AS 抑制による腫瘍増殖の抑制
コントロール siRNA CTBP1-AS siRNA 群



(4) CTBP1 のアンドロゲン依存的な発現抑制のメカニズムを解析した結果、ヒストン修飾を介したエピゲノム作用を受けていることが見出された。特にヒストン脱アセチル化が著明であった。この脱アセチル化は CTBP1-AS

依存的であり、さらに CTBP1-AS 依存的に HDAC, Sin3A のアンドロゲン依存的な結合を起していることによるものであった。PSF は転写抑制因子であり Non-coding RNA との結合も報告されている。PSF と CTBP1-AS はアンドロゲン依存的に結合しており、PSF の抑制実験により CTBP1 の脱アセチル化、転写抑制に関わっていた。

以上より CTBP1-AS は PSF を介して転写抑制に関わる HDAC 複合体を CTBP1 プロモーター領域に呼び寄せることにより CTBP1 をエピゲノム的な作用で発現抑制を行っていた。

(5) CTBP1-AS と PSF は結合をすることで PSF の機能へ影響を与えることが考えられる。CTBP1-AS がアンドロゲン依存的に発現誘導を受けることから PSF がアンドロゲン依存的に遺伝子発現制御に影響している可能性がある。実際マイクロアレイ解析においても PSF は遺伝子のアンドロゲン応答性の発現制御に関わることが実証された。特に遺伝子の発現抑制に関わっており、これらの因子には細胞周期抑制因子、p53, SMAD3 などが PSF の標的である可能性が見出された。さらに PSF-ChIP-seq によりアンドロゲン依存的に PSF の結合部位は変化を受けていた。また CTBP1, SMAD3, p53 には PSF の結合部位が周辺に存在しており PSF の直接的な制御を受けていることが示唆された。siCTBP1-AS を用いた実験により PSF は CTBP1-AS と結合することでアンドロゲン依存的に結合部位を変化させていることが考えられた。またマイクロアレイによる結果からアンドロゲンによる転写抑制に PSF と CTBP1-AS が協調して作用していることが示唆された。核内でもその局在がほぼ一致することから核内において転写制御に協調して機能していることが考えられる。

(6) 次世代シーケンサーを用いてアンドロゲンにより誘導される miRNA を LNCaP および抗アンドロゲン剤に抵抗性を獲得した LNCaP 細胞由来のホルモン耐性株を用いて解析した。耐性株において高発現しアンドロゲンにより強く誘導される miRNA をいくつか同定した。我々はその中の一つの miRNA family に着目して解析を行っている。

miRNA の発現抑制により LNCaP, DU145, VCaP などの前立腺癌細胞株の増殖が抑制を受けた。また抗アンドロゲン剤抵抗性の増殖において miRNA を発現抑制すると抵抗性が解除され増殖、浸潤能が抑制されることが分かった。我々はそのメカニズムの同定のため miRNA の標的遺伝子群をマイクロアレイを用いて同定しており、遺伝子発現抑制を通して miRNA によるホルモン耐性化のメカニズムを見出し現在実験により立証している。また今後、動物実験を用いて in vivo におけるホルモン療法抵抗性へ対する効果を検証する予定で

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 8 件)

1. Takayama K, Horie-Inoue K, Katayama S, Suzuki T, Tsutsumi S, Ikeda K, Urano T, Fujimura T, Takagi K, Takahashi S, Homma Y, Ouchi Y, Aburatani H, Hayashizaki Y, Inoue S: Androgen-responsive non-coding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer growth by epigenetic regulation. *EMBO J* (in press)
2. Yamada Y, Fujimura T, Takahashi S, Takayama K, Urano T, Murata T, Obinata D, Ouchi Y, Homma Y, Inoue S: Clinical significance of amyloid precursor protein in patients with testicular germ cell tumor. *Adv Urol* (in press)
3. Takayama K, Inoue S: Transcriptional network of androgen receptor in prostate cancer progression. *Int J Urol* (in press).
4. Takayama K, Horie-Inoue K, Suzuki T, Urano T, Ikeda K, Fujimura T, Takahashi S, Homma Y, Ouchi Y, Inoue S: TACC2 is an androgen-responsive cell cycle regulator promoting androgen-mediated and castration-resistant growth of prostate cancer. *Mol Endocrinol* 26, 748-761, 2012.
5. Murata T*, Takayama K*, Urano T, Fujimura T, Ashikari D, Obinata D, Horie-Inoue K, Takahashi S, Ouchi Y, Homma Y, Inoue S: 14-3-3 ζ , a novel androgen-responsive gene, is upregulated in prostate cancer and promotes prostate cancer cell proliferation and survival. *Clin Cancer Res* 18, 5617-5627, 2012.(*: co-first)
6. Obinata D, Takayama K, Urano T, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Homma Y, Ouchi Y, Takahashi S, Inoue S: Oct1 regulates cell growth of LNCaP cells and is a prognostic factor for prostate cancer. *Int J Cancer* 130, 1021-1028, 2012.
7. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Tanaka T, Zhang W, Azuma K, Takayama K, Obinata D, Murata T, Horie-Inoue K, Kodama T, Ouchi Y, Homma Y, Inoue S: Clinical significance of steroid and xenobiotic receptor (SXR) and its targeted gene CYP3A4 in human prostate cancer. *Cancer Sci* 103, 176-180, 2012.
8. Obinata D, Takayama K, Urano T, Murata T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Ouchi Y,

Takahashi S, Inoue S: ARFGAP3, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Int J Cancer* 130, 2240-2248, 2012.

[学会発表] (計 21 件)

1. 高山賢一、堀江公仁子、池田和博、浦野友彦、大内尉義、井上聡：前立腺癌細胞における新規アンドロゲン応答遺伝子 TACC2 の細胞周期、細胞増殖における機能解析 (2011.4.21-23) 第 84 回日本内分泌学会学術総会 (神戸)
2. 村田太郎、高山賢一、浦野友彦、藤村哲也、堀江公仁子、池田和博、高橋悟、大内尉義、本間之夫、井上聡：アンドロゲン依存性増殖にかかわるアンドロゲン応答性マイクロ RNA の次世代シーケンサーによる包括的同定とその新しい機能の解明 (2011.4.21-23) 第 99 回日本泌尿器科学会総会 (名古屋)
3. 大日方大亮、高山賢一、浦野友彦、堀江公仁子、池田和博、大内尉義、高橋悟、井上聡：前立腺癌における AR 転写調節因子である OCT1 の役割 (2011.4.21-23) 第 99 回日本泌尿器科学会総会 (名古屋)
4. Obinata D, Takayama K, Urano T, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Homma Y, Ouchi Y, Takahashi S, Inoue S: OCT1 coordinately regulates androgen receptor and is a prognostic factor for prostate cancer. 第 99 回日本泌尿器科学会【スキルアップ企画】日本泌尿器科学会国際学会フォーラム：国際学会のための医学英語 (2011.4.22)
5. 高山賢一、堤修一、堀江公仁子、池田和博、浦野友彦、大内尉義、油谷浩幸、井上聡：次世代シーケンサーによるアンドロゲン受容体結合部位および標的遺伝子のエピジェネティックな発現制御機構の解析 (2011.7.22-23) 第 30 回アンドロロジー学会学術大会 (東京)
6. Takayama K, Horie-Inoue K, Suzuki T, Urano T, Ikeda K, Fujimura T, Takahashi S, Homma Y, Ouchi Y, Inoue S: TACC2 is an androgen-regulated cell cycle regulator that mediates castration-resistant growth of prostate cancer. (2011.10.3-5) 第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋)
7. Obinata D, Takayama K, Urano T, Takahashi S, Inoue S: Oct1 positively regulates the androgen-upregulated gene ACSL3, a 5'-translocation partner of ETV1, with androgen receptor in human prostate cancer. (2011.10.3-5) 第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋) English Oral

8. 高山賢一：[シンポジウム] 前立腺がんにおけるゲノムワイドでの AR 標的遺伝子の同定 (2012.1.21) 第 12 回関東ホルモンと癌研究会 (東京)
9. 三沢彩、高山賢一、浦野友彦、井上聡：次世代シーケンサーを用いた前立腺がん細胞株における miRNA の発現解析 (2012.1.21) 第 12 回関東ホルモンと癌研究会 (東京)
10. 高山賢一、岡部篤史、堤修一、浦野友彦、堀江公仁子、池田和博、大内尉義、油谷浩幸、井上聡：アンドロゲン応答性フォークヘッド転写因子 FOXP1 の全ゲノムにおける結合部位同定による AR シグナル調節機構の解析 (2012.4.19-21) 第 85 回日本内分泌学会学術総会 (名古屋)
11. Takayama K, Misawa A, Urano T, Horie-Inoue K, Mano H, Ouchi Y, Inoue S: Short RNA sequence analysis for androgen responsive miRNA expression profile in prostate cancer cell lines (前立腺癌細胞におけるアンドロゲン応答性 miRNA 同定を目的とした Short RNA シークエンス解析). (2012.9.19-21) 第 71 回日本癌学会学術集会 (札幌) English, *Oral*
12. 大日方大亮、藤原恭子、高山賢一、浦野友彦、永瀬浩喜、井上聡、高橋悟：TMPRSS2-ERG 融合遺伝子発現を標的としたピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドは前立腺癌細胞の増殖を抑制させる (Pyrrole-imidazole (PI) polyamide targeting of TMPRSS2-ERG gene fusion repress prostate cancer cell progression.) (2012.9.19-21) 第 71 回日本癌学会学術集会 (札幌)
13. 堀江公仁子、高山賢一、伊地知暢宏、池田和博、井上聡：ホルモン療法抵抗性前立腺がん細胞におけるエネルギー代謝関連核内受容体作用の検討 (2012.11.17-18) 脳心血管抗加齢研究会 2012 (大阪)
14. 高山賢一、堀江公仁子、池田和博、浦野友彦、大内尉義、井上聡：次世代シーケンサーを用いたホルモン療法抵抗性前立腺癌への進展におけるアンドロゲン受容体シグナルの統合的解析 (Global analysis of androgen receptor signaling in the prostate cancer progression to castration-resistance by next generation sequencers) (2012.12.11-14) 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡)
15. 芦荻大作、高山賢一、浦野友彦、大日方大亮、高橋悟、井上聡：前立腺癌細胞における新規アンドロゲン応答遺伝子 G3BP2 の同定及び機能解析 (2012.12.11-14) 第 35 回日本分子生物学

会年会 (福岡)

16. 芦荻大作、高山賢一、浦野友彦、大日方大亮、高橋悟、井上聡：ゲノムワイドのアンドロゲン受容体結合部位解析により同定された新規アンドロゲン受容体標的遺伝子の発現制御機構の解析 (2013.3.8-9) 第 22 回泌尿器科分子・細胞研究会 (高知)
17. 高山賢一、堀江公仁子、池田和博、浦野友彦、大内尉義、井上聡：前立腺癌細胞におけるアンドロゲン応答性 Non-coding RNA の同定ならびに機能解析 (2013.4.25-27) 第 86 回日本内分泌学会学術総会 (仙台)

[図書] (計 1 件)

1. Misawa A, Takayama K, Inoue S: MicroRNAs in Prostate Cancer, *microRNAs in cancer*, (edited by César López-Camarillo, Laurence Annie Marchat) Science Publishers, Jersey, British Channel Islands, GB, (pp 128-155)

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 賢一 (TAKAYAMA KENICHI)
東京大学・医学部附属病院・特任臨床医
研究者番号：50508075