

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670678

研究課題名(和文)アンドロゲン応答性ナチュラルアンチセンスRNAを標的とした前立腺癌の診断と治療

研究課題名(英文) Analysis of androgen-regulated natural antisense RNA for the diagnosis and treatment of prostate cancer

研究代表者

高山 賢一 (Takayama, Ken-ichi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50508075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌においてアンドロゲン受容体(AR)により制御されるLong non-coding RNAのなかでもアンチセンスRNAの役割を解析した。まずCTBP1 遺伝子のアンチセンス領域に発現するアンドロゲン応答性non-coding RNAを同定しCTBP1-ASと名付けた。CTBP1-ASはアンドロゲン依存的に核内への集積が認められ、エピゲノム制御により前立腺癌悪性を促進した。またdirectional RNA-seqによるゲノムワイドの解析によりARに制御されるアンチセンスRNAをいくつか同定した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of antisense RNA, expressed in the antisense direction of protein coding gene, among long non-coding RNAs regulated by androgen receptor (AR) in prostate cancer. First, we identified a novel androgen-inducible non-coding RNA situated in the antisense region of CTBP1 gene, and then we named it as CTBP1-AS. We found the androgen-dependent accumulation of this antisense RNA in the nucleus of prostate cancer cells and the epigenetic mechanism for prostate cancer progression by CTBP1-AS. We also identified additional antisense RNAs regulated by androgen using directional RNA-seq analysis in prostate cancer cells.

研究分野：内分泌学

キーワード：分子腫瘍学 内分泌学 病態医化学 ゲノム医科学

## 1. 研究開始当初の背景

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、核内へと移行し転写因子として機能する(Debes JD et al. *N Engl J Med* 351, 1488-1490, 2004)。AR のシグナルを抑制する治療法は前立腺癌の増殖抑制を引き起こすが、一定時間経過するとホルモン療法耐性を獲得し癌が再燃することが臨床上の克服すべき課題となっている。これまでの報告から、耐性癌においても AR のシグナルは亢進していることが知られ(Chen CD et al. *Nat Med* 10, 33-39, 2004)、ホルモン療法耐性癌への進展においては AR の変異、増幅、リン酸化などの修飾による AR の過敏性の獲得が報告されている(Guo Z et al. *Cancer Cell* 10, 309-319, 2006)。したがって、この課題の解決には AR のシグナルの解析が特に重要と考えられる。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て、それら近傍の応答遺伝子に着目した(Takayama K et al. *Biochem Biophys Res Commun* 374, 388-393, 2008; Takayama K et al. *Mol Endocrinol* 26, 748-761, 2012)。さらに、ChIP とゲノムタイリングアレイを組み合わせた ChIP-Chip 法を用いることにより、AR の結合するゲノム領域の同定を世界に先駆け行った。申請者らの解析により AR の結合領域の近辺にアンドロゲン標的遺伝子群を発見し、癌の増殖、悪性化に関わることを示した(Takayama K et al. *Oncogene* 26, 4453-4463, 2007; 30, 619-630, 2011)。特に、従来前立腺癌では解析されていなかった新規の応答遺伝子や miRNA 群(Takayama K et al. *Oncogene* 26, 4453-4463, 2007; Takayama K et al. *Cancer Res* 69, 137-142, 2009; Murata T, Takayama K et al. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 13, 356-361, 2010; Obinata D, Takayama K et al. *Int J Cancer* 130, 2240-2248, 2012; Murata T, Takayama K et al. *Clin Can Res* 18, 5617-5627, 2012)を同定し、これら遺伝子の中に前立腺癌の増殖、悪性化、患者の予後と関連し、癌診断・治療の分子標的となる因子を見出している。また miRNA のみならず遺伝子間領域、遺伝子のアンチセンス領域にもホルモン依存性に転写調節を受ける Non-coding RNA が存在することをゲノムワイドの解析により同定した。

## 2. 研究の目的

本研究では Non-coding RNA、特にナチュラルアンチセンス RNA に着目し、その AR での制御機構、前立腺癌での発現、ホルモン療法抵抗性前立腺癌増殖への関与、ならびに増殖制御における作用メカニズムを明らかにし、臨床応用を目指す。

## 3. 研究の方法

前立腺癌細胞株を用いて Non-coding RNA の発現抑制による癌細胞の性質の変化を多方面にわたって検討する。まず、候補となる Non-coding RNA 群、特にナチュラルアンチセンス RNA 群を次世代シーケンサーにより同定されたアンドロゲン応答性の転写産物のゲノムワイドでのデータより絞り込む。それらに対し siRNA を設計し発現抑制が細胞モデルで機能するかを検討する。増殖能、浸潤能、細胞周期、アポトーシスについて検討する。さらに細胞レベルのデータを下に *in vivo*、臨床への応用への検討まで発展させる。そのために、まず臨床データを用いた検討を行う。臨床サンプルにおける発現レベルを ISH, qPCR を用いて解析する。さらに動物への癌細胞移植モデルを用いた *in vivo* での腫瘍増殖への影響について siRNA を用いて検討し、癌治療への応用が可能であるかを検討する。

## 4. 研究成果

(1) アンドロゲンにより応答する Non-coding RNA の同定を網羅的に行った。以前の報告の中で、前立腺癌細胞株 LNCaP 細胞においてゲノムワイドの AR 結合部位の解析(ChIP-chip)、ならびに転写開始点を次世代シーケンサーにより網羅的に同定する CAGE法(Cap analysis of gene expression)によりアンドロゲンに応答する全転写産物をゲノム中に同定している。その中で遺伝子のアンチセンス方向に転写される Non-coding RNA は全体の9%程度を占めていた。その中で AR 結合部位を近傍に有しアンドロゲン刺激により発現誘導を受ける転写産物を絞り込んだ。

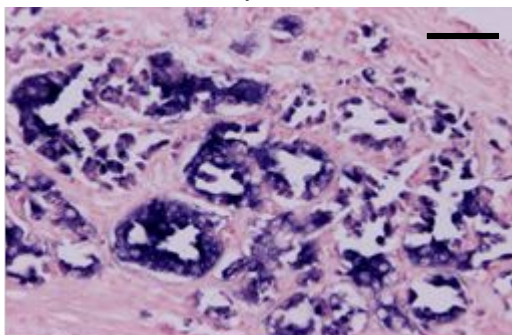
それらの転写産物の中から特に発現誘導が強く高発現していた CTBPI (C-terminal binding protein1)のアンチセンス領域で転写される Long non-coding (lnc) RNA に着目した。この lnc-RNA は約 5 kb の長い transcript であ

りアンドロゲン刺激に素早い反応を示し発現が上昇することを見出した。また Northern blot や定量的 RT-PCR および RNA-FISH 法により核内、細胞質での局在を解析したところ核内に集積してくることを見出した。

(2) *CTBP1-AS* の発現抑制をする siRNA を設計した。CTBP1 は AR と結合し AR のアンドロゲン依存的な転写活性化に抑制因子として機能していることを見出した。CTBP1 は *CTBP1-AS* の上昇に伴い発現抑制を受ける。つまりアンドロゲン依存的に CTBP1 の発現は抑制され AR は活性化を受ける。si*CTBP1-AS* を使用した定量的 RT-PCR により *CTBP1-AS* の発現抑制はこの CTBP1 のアンドロゲンによる転写抑制を解除する機能があることを見出した。

(3) 前立腺癌組織を使用した *CTBP1-AS* ならびに CTBP1 の発現解析を行った(図 1)。CTBP1 は AR の転写抑制因子として前立腺癌細胞の増殖抑制、癌の予後ならびに術後再発の良好因子となることを示した。一方、*CTBP1-AS* の発現は *in situ* hybridization 法ならびに定量的 RT-PCR 法を用いて解析したところ、CTBP1 の発現と逆相関傾向があり発癌ならびに転移に伴い発現が上昇していることを見出した。また AR の発現やグリソスコアとも相関し *CTBP1-AS* の発現上昇は病気の進行と相関していることを見出した。加えて *CTBP1-AS* は癌の増殖能を促進し、治療標的となることを示した。

*In situ* hybridization



Bar = 100 μm

図 1. *CTBP1-AS* は前立腺癌において高発現している。

(4) *CTBP1-AS* は転写抑制因子として機能する PSF と結合しエピゲノム作用を通して様々な遺伝子の発現抑制にアンドロゲン依存的に機能していることを見出した。特にセンス側

の CTBP1 遺伝子のプロモーターのヒストン脱アセチル化を促していることを ChIP assay を用いて示した。まず CTBP1 プロモーターはアンドロゲン依存的に脱アセチル化を受けており HDAC ならびに Sin3A の集積を認める。これらの HDAC 複合体の結合は *CTBP1-AS* 依存的であることを示した。さらに RIP assay や RNA pull down 法により *CTBP1-AS* は PSF との結合を受けることを示した。PSF は HDAC 複合体と結合することが知られており、それにより転写抑制を誘導する。*CTBP1-AS* は PSF のゲノム中への結合に働き PSF を介した転写抑制を促していた。

(5) *CTBP1-AS* は PSF との結合によりゲノムワイドでの転写抑制に広く効果があることを示した。まず RNA の局在を見るため RNA-FISH 法を応用し、*CTBP1-AS* に対するラベル化したプローブを作成し細胞内での *CTBP1-AS* を観察したところ核内に広く分布

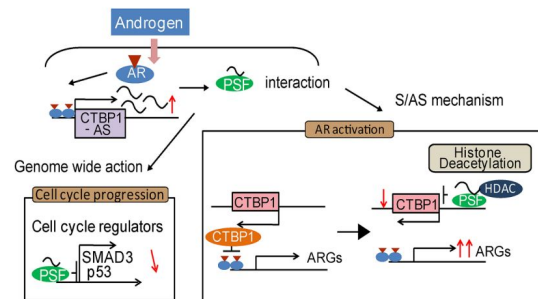


図 2. *CTBP1-AS* による前立腺癌悪性化メカニズム

しており PSF との共局在も確認された。さらにマイクロアレイや ChIP-seq により PSF がゲノムワイドでのアンドロゲンシグナルに必須であり *CTBP1-AS* と相互作用し共調して転写の抑制を行うこともわかった。アンドロゲンにより抑制を受ける遺伝子の大部分が PSF や *CTBP1-AS* の何らかの効果を受けておりこれらの機序を介した転写抑制は前立腺癌のアンドロゲンシグナルにおいて重要な役割を果たしていることが考えられた。

特に PSF の下流遺伝子群のパスウェイを解析したところ細胞周期因子が特に有意に濃縮していることを発見した。前立腺癌においてアンドロゲンで抑制され細胞周期の抑制因子として知られている SMAD3 や p53 などが含まれており、これらの細胞周期のブレーキ役を抑制することで増殖を促進するメカニズムを見出した。PSF や *CTBP1-AS* の抑制

は FACS を用いた細胞周期の解析でも S 期の細胞の増加に寄与していることが見出された。また、本研究により図 2 に示すような lnc-RNA を介したアンドロゲン依存的な前立腺癌増殖システムが存在することを見出した。lnc-RNA がアンドロゲンにより細胞内、生体内ならびに男性の病態で直接的に制御されていることを世界に先駆けて示すことができた。特に前立腺癌における lnc-RNA の分子作用メカニズムを解明し、lnc-RNA が癌の治療と診断へ応用できることを示した点で、今後の臨床応用にもつながることが考えられる。また、これまではっきりしなかった lnc-RNA の内分泌システムにおける役割を明らかとしたことで、今後の内分泌疾患の研究発展に新たな経路の可能性を示唆するものと考えられる。

(6) 次に directional RNA-sequence を利用して前立腺癌細胞株 LNCaP および VCaP において共通して AR に制御される antisense RNA の解析を行った。両方の細胞株に DHT 10 nM もしくは Vehicle 刺激を行い 24 時間後に Total RNA を回収した。Illumina 社の HiSeq2000 を利用して directional RNA sequence 解析を行いそれぞれの細胞においてセンス、アンチセンス両方向でアンドロゲンにより制御される Non-coding RNA を同定した。さらに AR の阻害剤である Bicalutamide 10 μM 処理もしくは siAR 処理を行い、アンドロゲンによる転写活性化が抑制されるかを解析した。GENCODE を用いて lnc-RNA のなかで AR による制御を受ける転写産物を絞り込んだ。その結果、LNCaP 細胞で 67 遺伝子、VCaP 細胞において 81 遺伝子が同定された。両方で共通する lnc-RNA は 9 個同定された。また別の database である Noncode を利用したところ 12 個同定された。

(7) 同定された Non-coding RNA 群の中で ChIP-seq による転写開始点、プロモーターが同定される (K4me3, AcH3 活性化のピークを持つ) ものとして 10 個を同定した。まず qRT-PCR 法によりアンドロゲンによる制御を受けることを確認した。さらに siRNA の設計を行い、それぞれの発現量を減少させることにより前立腺癌細胞の増殖能への影響を解析した。siRNA を処理することにより増殖能、遊走能を抑制することができたものは 3 つ同定された。現在その中の一つに関して機

能解析を行っている。具体的にはこのアンチセンス RNA は Head-Head でセンスの protein coding gene と向かい合い共通のプロモーターを持っている (図 3)。センス側の遺伝子は発がん性のシグナル伝達物質であり、前立腺癌の悪性化を促すと報告されている。共通のプロモーターを有しており前立腺癌細胞の増殖に関与することから、悪性化に寄与する可能性を考えている。現在、Microarray により下流シグナルの同定を行っており、遺伝子の転写制御のメカニズムとともに臨床的な発現の意義について今後解析予定である。

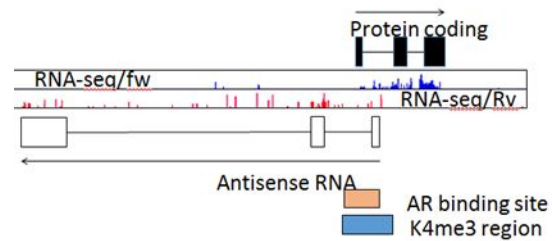


図 3. RNA-sequencing により同定された AR により制御されるアンチセンス RNA の一例

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 11 件)

1. Takayama K, Suzuki T, Tsutsumi S, Fujimura T, Urano T, Takahashi S, Homma Y, Aburatani H, Inoue S: RUNX1, an androgen- and EZH2-regulated gene, has differential roles in AR-dependent and -independent prostate cancer. *Oncotarget* 6, 2263-2276, 2015. [http://www.impactjournals.com/Oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=2949](http://www.impactjournals.com/Oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=2949) 査読あり
2. Takayama K, Suzuki T, Tsutsumi S, Fujimura T, Takahashi S, Homma Y, Urano T, Aburatani H, Inoue S: Integrative analysis of FOXF1 function reveals a tumor suppressive effect in prostate cancer. *Mol Endocrinol* 28, 2012-2024, 2014. DOI: 10.1210/me.2014-1171. 査読あり
3. Obinata D, Ito A, Fujiwara K, Takayama K, Ashikari D, Murata Y, Yamaguchi K, Urano T, Fujimura T, Fukuda N, Soma M, Watanabe T, Nagase H, Inoue S, Takahashi S: Pyrrole-imidazole polyamide targeted to break fusion sites in TMPRSS2 and ERG

- gene fusion represses prostate tumor growth. *Cancer Sci* 105, 1272-1278, 2014. DOI: 10.1111/cas.12493. 査読あり
4. Boele J, Persson H, Shin JW, Ishizu Y, Newie I, Søkilde R, Hawkins SM, Coarfa C, Ikeda K, Takayama K, Horie-Inoue K, Ando Y, Burroughs AM, Sasaki C, Suzuki C, Sakai M, Aoki S, Ogawa A, Hasegawa A, Lizio M, Kaida K, Teusink B, Carninci P, Suzuki H, Inoue S, Gunaratne P, Rovira C, Hayashizaki Y, de Hoon M: PAPD5- mediated 3' adenylation and subsequent degradation of oncomiR miR-21 is disrupted in proliferative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 11467-11472, 2014. DOI:10.1073/pnas.1317751111. 査読あり
  5. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Takayama K, Sugihara T, Obinata D, Yamada Y, Kumagai J, Kume H, Ouchi Y, Inoue S, Homma Y: Expression of androgen and estrogen signaling components and stem cell markers to predict cancer progression and cancer-specific survival in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 20, 4625-4635, 2014. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1105. 査読あり
  6. Takayama K, Suzuki T, Fujimura T, Urano T, Takahashi S, Homma Y, Inoue S: CtBP2 modulates the androgen receptor to promote prostate cancer progression. *Cancer Res* 74, 6542-6553, 2014. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1030. 査読あり
  7. Yamaga R, Ikeda K, Boele J, Horie-Inoue K, Takayama K, Urano T, Kaida K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Ouchi Y, de Hoon M, Inoue S: Systemic identification of estrogen-regulated genes in breast cancer cells through cap analysis of gene expression mapping. *Biochem Biophys Res Commun* 447, 531-536, 2014. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.04.033. 査読あり
  8. 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 long noncoding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer. *EMBO J* 32, 1665-1680, 2013 and highlighted in “*Have you seen?*” pp. 1653-1654. DOI: 10.1038/emboj.2013.99. 査読あり
  9. 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* 2013, 348438, 2013. DOI: 10.1155/2013/348438. 査読あり
  10. Oneyama C, Kito Y, Asai R, Ikeda J, Yoshida T, Okuzaki D, Kokuda R, Kakumoto K, Takayama K, Inoue S, Morii E, Okada M: MiR-424/503-mediated Rictor upregulation promotes tumor progression. *PLoS ONE* 8, e80300, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0080300. 査読あり
  11. Takayama K, Inoue S: Transcriptional network of androgen receptor in prostate cancer progression. *Int J Urol* 20, 756-768, 2013. DOI: 10.1111/iju.12146. 査読あり
- 〔学会発表〕(計 13 件)
1. 芦苅大作、高山賢一、大日方大亮、浦野友彦、井上聡、高橋悟：[研究奨励賞口演部門最優秀賞] 新規アンドロゲン応答遺伝子 G3BP2 によるドセタキセル抵抗性及び去勢抵抗性前立腺癌への進展メカニズムの解析 (2015.2.27-28) 第 24 回泌尿器科分子・細胞研究会 (東京都・千代田区)
  2. 高山賢一、井上聡：アンドロゲン受容体による転写プログラムの統合的解析により同定された新たなエピジェネティック制御機構(Integrative analysis of androgen receptor transcriptional program reveals novel epigenetic regulatory mechanisms) (2014.11.25-27) 第 37 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
  3. Takayama K, Inoue S: [第 33 回日本癌学会奨励賞(基礎)受賞講演] ゲノム医学アプローチによる前立腺癌におけるアンドロゲン受容体転写ネットワークの解明(Integrative genomic approaches to identify androgen receptor transcriptional network in prostate cancer) (2014.9.25-27) 第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)



4. 高山賢一、井上聡：[International Sessions] アンドロゲンにより制御される長鎖非コードRNAを介した前立腺癌における腫瘍増殖促進機構の解明 (Identification of a novel tumor-promoting mechanism in prostate cancer via androgen-responsive long non-coding RNA) (2014.9.25-27) 第73回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
  5. 右田敏郎、高山賢一、大日方大亮、池田和貴、浦野友彦、高橋悟、曾我朋義、井上聡：アンドロゲン応答性の脂質代謝酵素 ACSL3 は去勢抵抗性前立腺がんの増殖に關与する (Androgen-responsive and lipogenic enzyme ACSL3 is involved in castration-resistant growth of prostate cancer) (2014.9.25-27) 第73回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
  6. 芦苅大作、高山賢一、浦野友彦、大日方大亮、井上聡、高橋悟：ChIP-sequence法の活用による前立腺癌細胞における新たなアンドロゲン受容体シグナルの同定 (2014.4.24-27) 第102回日本泌尿器科学会総会 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
  7. 藤原恭子、大日方大亮、伊藤垂希子、高山賢一、浦野友彦、井上聡、相馬正義、高橋悟、永瀬浩喜、福田昇：ピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)を用いた前立腺癌関連融合遺伝子の発現抑制法の検討 (2014.4.24-26) 第87回日本内分泌学会学術総会 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
  8. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Kume H, Takayama K, Murata T, Yamada Y, Obinata D, Inoue S, Homma Y: [Best Poster 賞受賞] Expression of androgen and estrogen signaling components and stem cell markers is highly predictive of cancer progression of metastatic prostate cancer. (2014.4.11-15) 29<sup>th</sup> Annual Congress of the European Association of Urology, Stockholm (Sweden).
  9. Obinata D, Takayama K, Fujiwara K, Fukuda N, Urano T, Ito A, Ashikari D, Murata T, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S, Takahashi S: Polyamide targeting transcription of long chain acyl-CoA synthetase 3: A novel therapeutic approach for prostate cancer. (2014.4.11-15) 29<sup>th</sup> Annual Congress of the European Association of Urology, Stockholm (Sweden).
  10. 高山賢一、大内尉義、井上聡：[ワークショップ] アンドロゲン応答性長鎖非コードRNAを介するホルモン依存性腫瘍増殖機構の解明 (2013.12.3-6) 第36回日本分子生物学会年会 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
  11. 高山賢一、浦野友彦、井上聡：Novel collaborating factors for androgen receptor form transcriptional networks and contribute to the progression of prostate cancer (新たなアンドロゲン受容体と協調して機能する因子群は転写ネットワークを形成し前立腺癌の進行に寄与する) (2013.10.3-5) 第72回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
  12. 堀江公仁子、兒玉啓輔、高山賢一、池田和博、井上聡：[優秀演題賞] ホルモン療法体制前立腺がん細胞のエクソーム解析 (2013.6.28-30) 第13回日本抗加齢医学会総会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
  13. 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 仙台国際センター(宮城県・仙台市)
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
高山 賢一 (TAKAYAMA, Ken-ichi)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：50508075
  - (2)研究分担者  
浦野 友彦 (URANO, Tomohiko)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：20334386
  - (3)研究分担者  
井上 聡 (INOUE, Satoshi)  
東京大学・医学部附属病院・特任教授  
研究者番号：40251251