

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11140

研究課題名(和文)アンドロゲン応答性の転写超保存領域を標的とした前立腺がん新規診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Identifying new therapeutic target using transcribed ultra-conserved region related to androgen receptor in prostate cancer

研究代表者

稗田 圭介 (Hieda, Keisuke)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：60625630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Uc.63+の強制発現させたLNCaPではドセタキセル耐性が亢進した。またアンドロゲン受容体の発現のないDU145ではUc.63+をノックダウンさせてもドセタキセル耐性は特に変化は認められず、これらの結果よりUc.63+はアンドロゲン受容体を介して、ドセタキセル耐性に関わっていることが示唆された。血清中のUc.63+は限局性前立腺癌に比べ、転移性前立腺癌で高発現していた。また転移性前立腺癌の中でドセタキセル治療を受けた27例でUc.63+の発現を検討したところ、Uc.63+はDTX効果不良群で有意に発現が高く、Uc.63+高発現群は有意に予後不良であった。

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においてドセタキセルは1st line治療として確立しているが、その奏効率は60-70%程度であり、無効症例が存在するため、治療効果予測マーカーの開発が求められる。今回、転写超保存領域であるUc.63+が高値群においてドセタキセル治療抵抗であり、さらに予後が悪いことを明らかにした。ドセタキセル治療における治療効果予測マーカーとしての可能性について今後、研究を継続していく。

研究成果の概要(英文)：Overexpression of Uc.63+ promoted docetaxel (DTX) resistance in LNCaP cells. On the contrary, knockdown of Uc.63+ had no effect on DTX resistance in PC3 and DU145 which are well known AR negative prostate cancer (PCa) cell lines. These results suggest that Uc.63+ may be involved in DTX resistance. The serum expression of Uc.63+ was higher in metastatic PCa than that in primary PCa. We analysed the role of Uc.63+ as biomarker for DTX treatment. The serum expression of Uc.63+ was higher in patient with resistance to DTX than that in patients with favourable response to DTX. Kaplan-meier analysis showed that high Uc.63+ expression was associated with poor overall survival.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 バイオマーカー ドセタキセル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

進行性前立腺がん治療の現状と課題

進行性前立腺がん治療の第一選択はホルモン療法であるが次第に治療抵抗性となる。前立腺がんのホルモン療法抵抗性の獲得には、アンドロゲン受容体(AR)が深く関わっている。主な耐性獲得機序として、AR 遺伝子の発現増幅や変異が示されている。これに着目したのが新規 AR 阻害剤であり、大規模臨床試験でその有効性が確認されたものの奏効率や期間は満足のいくものではない。前立腺がんにおける AR とその関連遺伝子との相互作用が薬剤耐性に関わっていると想定されているが、そのメカニズムには不明な点が多く、新規治療法開発に向けての課題である。

非翻訳 RNA は前立腺がんにおいて重要な役割を有する

近年のゲノムワイドな解析手法によって、タンパク質をコードしない非翻訳 RNA(non-coding RNA; ncRNA)とがんとの関連が指摘されている。ncRNA は全ゲノムの実に約 98%を占める膨大な領域であるが、単なるジャンクではなく、様々な機能を有していることが明らかとなっている(Oncogene 34;5003,2015)。前立腺がんに関連する ncRNA の多くはアンドロゲン応答性、すなわち AR の標的遺伝子と考えられており、治療標的として有望視されている。

ncRNA をコードする転写超保存領域はがんの新規治療標的となりうる

転写超保存領域(Transcribed- Ultraconserved Region; T-UCR)とは、ncRNA の中でも新しいカテゴリーとして注目を集めつつある。ヒトにおいては約 500 の T-UCR が存在し(Science 304:1321,2004)、その領域に多型はほとんど存在せず、マウス、ラットなど生物種を超えて 100% 保存されるといったユニークな特徴を持つ。T-UCR は臓器あるいは組織特異的な発現パターンを示し、生物の発生段階との関連が指摘されている(Nature 444:499,2006)。近年、特定の T-UCR のがんにおける発現異常が見出され(Cancer Cell 12;215, 2007)、がん関連遺伝子としてのはたらきが注目されている。また、T-UCR に DNA メチル化やマイクロ RNA の関与が指摘されている。しかし研究は創成期にあり、得られている知見は限定的である。これまでの研究成果と本研究の着想に至った経緯

前立腺がんにおける T-UCR 発現異常

私たちは、これまでに前立腺がんを中心としてがんにおける遺伝子発現異常に関する研究を一貫して行ってきた。最近では、前立腺がんにおける T-UCR の発現異常に着目し、臨床検体を用いた解析により前立腺がんと深く関わる T-UCR の同定に成功、DNA メチル化による発現制御機構を示した(Oncogene 35; 3598, 2016)。さらに解析を進め、Uc.416+A という T-UCR が去勢抵抗性前立腺がんにおいて発現上昇することや、細胞増殖に関わっていることも突き止めている。

これらの成果を踏まえ、本研究では前立腺がんにおいて「AR 応答性 T-UCR」の同定と転写調節の解析を通じて、従来とは全く異なるアプローチから、前立腺がんにおける非翻訳 RNA ネットワークを解明し、革新的な診断治療シーズの提供を目的とする。

2. 研究の目的

進行前立腺がんは従来のホルモン療法が奏功せず、新規薬剤の効果も不十分である。アンドロゲン受容体(AR)とその関連遺伝子が薬剤耐性に関わると想定されるが、そのメカニズムには不明な点が多く、今後の研究課題である。私たちは、非翻訳 RNA である転写超保存領域(T-UCR)の発現異常に着目し、前立腺がんにおける発現・機能解析を行い大きな成果を挙げてきた。これを踏まえ本研究では、アンドロゲン応答性 T-UCR を標的とした新たな診断・治療法開発を目指す。

[1]ChIP-シーケンス法による AR 応答性 T-UCR の網羅的解析

[2]候補となる T-UCR の転写活性の検証

[3]臨床検体を用いた発現解析、生物学的な機能解析

3. 研究の方法

本研究では、アンドロゲン受容体応答性 T-UCR を網羅的に解析し候補遺伝子を絞り込み、前立腺がん特異的な T-UCR を同定する。本手法は全く新しい切り口によるアプローチであるが、実現にあたっては以下に示すような手法を組み合わせる。

[1]ChIP-シーケンス法による AR 応答領域の同定（次世代シーケンサー）

[2]AR 応答性 T-UCR の転写調節機構の解析（プロモーターアッセイ）

[3]候補遺伝子の発現・機能解析（定量的 PCR 法、細胞増殖アッセイ）

本研究を遂行する上での具体的な工夫

[1]ChIP-シーケンス法による AR 応答領域の同定

本研究では正確なシーケンス結果を得ることが最も重要である。そのため、以下に示すように複雑な実験系の各段階を検証して研究を進めていく。

(i) 実験に用いるゲノム DNA が解析に適したサンプルであることの確認

AR 発現かつホルモン療法感受性の前立腺がん細胞株 LNCaP と、AR 増幅を伴う去勢抵抗性前立腺がん細胞株 VCaP を材料に、ゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA の質は、バイオアナライザー（アジレント社）、Qubit Fluorometer（サーモフィッシュサイエンティフィック社）を用いて評価し、50ng/μl 以上の濃度かつサイズが 50~500bp の範囲内にあるサンプルを以降の実験に使用する。

(ii) ライブラリの精製（サイズセレクション）

クロマチン免疫沈降により得られた ChIP DNA については、定量的 PCR 法で目的とする領域が回収されているかを評価する。さらに AMPure XP（ベックマンコールター社）を用いて DNA を精製し、シーケンスに適したサイズの DNA 断片を得る。これによりシーケンスの際にリードの偏りを防ぐことができる。

(iii) シーケンスとデータマイニング

シーケンサーから得られた配列データは、専用ソフトウェアを用いてトリミングの後、T-UCR 配列情報 (<https://users.soe.ucsc.edu/~jill/ultra.html>) と照合、NCBI データベース上にデポジットされているヒト遺伝子配列を参照として、マッピングを行う(Re-sequence)。得られた結果については、専用ブラウザ (Intergative genomic viewer) を用いて、特異的な DNA 結合部位に形成されるピークを確認する。T-UCR 領域に認められるピークを AR 応答性 T-UCR としてリストアップする。

[2]AR 応答性 T-UCR の転写調節機構の解析

(i) ルシフェラーゼアッセイによるプロモーター活性の評価

同定された T-UCR の転写活性を評価するために、ルシフェラーゼアッセイを行う。目的の T-UCR 配列を組み込んだルシフェラーゼベクターを作製し、前立腺がん細胞株へトランスフェクションさせる。ベクター導入後の細胞を回収後、Dual Luciferase reporter assay system（プロメガ社）を用い、ルシフェラーゼ活性を測定し、転写活性を評価する。

(ii) AR 応答性の転写調節機構の評価

ルシフェラーゼアッセイに用いる細胞の条件（アンドロゲン存在下 / 除去下）の違いによる転写活性を比較することで、目的とする T-UCR が AR 応答性に転写されているか検証する。

[3]候補遺伝子の発現・機能解析

(i) AR 応答性 T-UCR と臨床病理学的事項・治療情報との関連解析

ここまでで同定された T-UCR に関しては、前立腺がん組織および正常前立腺組織を用いた定量的 PCR 法で発現比較を行う。前立腺がんにおける高発現が証明された T-UCR においてはビオチン標識した LNA プローブ (Exiqon 社) を設計し、病理組織切片を用いた in situ hybridization (ISH) 法により前立腺がんにおける発現と局在を検討する。T-UCR の発現と組織学的悪性度などの臨床病理学的事項との関連を評価し、治療後の予後との解析を生存曲線により調べる。

(ii) 前立腺がん細胞株を用いた機能解析

解析対象の T-UCR に対し siRNA を設計し、RNAi によるノックダウンを行うとともに、T-UCR

発現ベクターを作製、前立腺がん細胞株にトランスフェクションし、細胞増殖や浸潤能に与える影響を調べる。細胞増殖はMTTアッセイ、浸潤能はボイデンチャンバーを用いた invasion アッセイにて評価する。以上の解析を通じて、AR 応答性 T-UCR を前立腺癌における新たな診断・治療標的として臨床応用へ繋げていく。

4. 研究成果

転写超保存領域 (T-UCRs) とは long non-coding RNA の中で人、マウス、ラットといった生物種を超えて保存されている領域である。このような特徴的な性質より、biological process において重要な役割を担っていると考えられている。また、近年では癌特異的な T-UCRs が癌の発生、進展に関与しているという報告も散見される。前年度までに前立腺癌で高発現している Uc.63+ を同定した。Uc.63+ がアンドロゲン受容体および miR-130b と関連することを確認した。

前立腺癌のバイオロジーにアンドロゲン受容体は大きく関わっており、ドセタキセル耐性への関与について検討した。Uc.63+ の強制発現させた LNCaP ではドセタキセル耐性が亢進した。またアンドロゲン受容体の発現のない DU145 では Uc.63+ をノックダウンさせてもドセタキセル耐性は特に変化は認められず、これらの結果より Uc.63+ はアンドロゲン受容体を介して、ドセタキセル耐性に関わっていることが示唆された。

また近年、T-UCR が血清中で確認できるという論文が散見され、Uc.63+ について血清マーカーとしての有用性を検討した。一般的なリアルタイム PCR よりも感度、特異度が高いデジタル PCR で Uc.63+ の発現を検討した。限局性前立腺癌に比べ、転移性前立腺癌で高発現していた。また転移性前立腺癌の中でドセタキセル治療を受けた 27 例で Uc.63+ の発現を検討したところ、Uc.63+ は DTX 効果不良群で有意に発現が高く、さらに Kaplan-Meier 法で予後を解析すると Uc.63+ 高発現群は有意に予後不良であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	松原 昭郎 (Matsubara Akio) (10239064)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	
研究分担者	亭島 淳 (Teishima Jun) (20397962)	広島大学・医系科学研究科(医)・准教授 (15401)	
研究分担者	安井 弥 (Yasui Wataru) (40191118)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	
研究分担者	池田 健一郎 (Ikeda Kenichirou) (50624863)	広島大学・病院(医)・病院助教 (15401)	
研究分担者	林 哲太郎 (Hayashi Tetsutarou) (60612835)	広島大学・医系科学研究科(医)・助教 (15401)	