

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18557

研究課題名(和文) 前立腺癌のSuper-Enhancerを介した増殖の分子機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Exploration of the proliferation mechanism of prostate cancer via Super-Enhancer and its application to therapy

研究代表者

永澤 誠之(Nagasawa, Masayuki)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：30750525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アンドロゲン受容体非依存性PC3特異的にSuper-enhancerを形成する遺伝子を同定したところ、上皮間葉転換に関連する遺伝子群で多くを占めた。PC3にJQ1を投与したところ、遊走能と浸潤能の低下を認めた。JQ1の新たな標的遺伝子の同定を目的としてPC3におけるJQ1投与群とControl群におけるRNA-seqデータを比較したところ、Mitotically-Associated lincRNA (MANCR)というlong noncoding RNAがJQ1投与で顕著に低下することを見出した。そこでsiRNAを用いてPC3のMANCRを低下させたところ、遊走能と浸潤能の低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌は日本における男性の癌罹患率において第1位になっている。転移性前立腺癌は致死性になることもあり、特に去勢抵抗性前立腺癌においては予後が限られていることが分かっている。今回の研究から、去勢抵抗性前立腺癌における標的遺伝子となりえる遺伝子を同定した。今後、前立腺癌の予後予測因子や治療標的としての有用性を検討したい。

研究成果の概要(英文)：We show that Super-Enhancer-associated genes specific for androgen receptor-negative CRPC PC3 cells include genes involved in migration and invasion, and that JQ1 impairs migration and invasion of PC3 cells. We identified a long non-coding RNA, MANCR, which was markedly down-regulated by JQ1, and found that BRD4 binds to the MANCR locus. MANCR knockdown led to a significant decrease in migration and invasion of PC3 cells. Furthermore, RNA sequencing analysis revealed that expression of the genes involved in migration and invasion was altered by MANCR knockdown. In summary, our data demonstrate that MANCR plays a critical role in migration and invasion of PC3 cells.

研究分野：泌尿器

キーワード：前立腺癌 Super-Enhancer MANCR 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の多くは Androgen receptor (AR) を発現し、アンドロゲン遮断療法が有効である。しかし AR 非依存性去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) は進展が早く、多くの治療に抵抗性を示す。BET プロモドメインタンパク質 BRD4 は、Super-enhancer (SE) に結合し、多くの癌の癌遺伝子を高発現させる。CRPC に対して、BET プロモドメインタンパク質 BRD4 の阻害薬の有効性が検討されているが、AR 非依存性の CRPC に対する効果は限定的と考えられている。また BET 阻害薬は SE で制御される遺伝子の発現を阻害するが、前立腺癌において SE で制御される遺伝子は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

今回の研究では、AR 非依存性の CRPC において SE で制御される遺伝子を解析することで、BRD4 によって制御される新規治療標的遺伝子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

SE のマーカーである H3K27ac の高い遺伝子を抽出するために、AR 非依存性の前立腺細胞株 PC3 と AR 依存性の前立腺癌細胞株 LNCaP の H3K27ac ChIP-seq データを比較し、PC3 特異的な SE 関連遺伝子を解析した。BET 阻害薬 JQ1 を投与し、PC3 特異的な SE 関連遺伝子の発現量低下に伴う表現型を検討した。次に、JQ1 投与における Transcriptome 解析から新たな治療標的となりえる遺伝子を同定した。標的遺伝子の Knockdown、Overexpression による表現型の検討と Transcriptome 解析により機序を検討した。

4. 研究成果

PC3 と LNCaP、それぞれの H3K27ac ChIP-seq データを比較し、PC3 特異的に SE を形成する 792 個の遺伝子を同定した。それらの遺伝子の pathway 解析を行うと、TGF β の下流である SMAD2/3 経路、p38 シグナル経路や HIF1 α 経路といった上皮間葉転換 (EMT) に関連する遺伝子群の頻度が高いことが示された。そこで PC3 を JQ1 存在下で培養したところ、Migration assay と Wound healing assay における遊走能の低下と、Invasion assay において浸潤能の低下を認めた。

新たな標的遺伝子の同定を目的として、PC3 における JQ1 処理群と Control 群における RNA-seq データを比較し、JQ1 処理群で発現が半分以下に低下する 58 個の SE 関連遺伝子を同定した。それらの中から、*Mitotically-Associated lincRNA (MANCR)* という long non-coding RNA が、JQ1 により顕著に低下することを見出した。*MANCR* は転移能が高い乳癌で発現量が高く、乳癌の細胞増殖や細胞周期に関連していることが報告されている。また前立腺癌細胞株においても、PC3 と DU145 といった AR 非依存性の前立腺細胞株でのみ発現が見られた。BRD4 の ChIP-seq において、BRD4 が *MANCR* locus に結合し、JQ1 によって結合しなくなることから、*MANCR* は BRD4 を介した SE の制御下にあると考えられた。

次に siRNA を用いて *MANCR* を低下させたところ、PC3 の遊走能、浸潤能の低下を認めた。一方、*MANCR* が低下しても、PC3 の細胞増殖の低下は認めなかった。*MANCR* が低下した細胞の RNA-seq において、発現量が低下した遺伝子を Gene ontology 解析すると、EMT 関連遺伝子群が上位をしめることが分かった。

さらに *MANCR* を発現していない LNCaP に *MANCR* overexpression をすると、遊走能、浸潤能が増加した。これらの結果から、*MANCR* が前立腺癌細胞において遊走や浸潤といった EMT を正に制御することが考えられた。

考察：

BET 阻害薬は、SE により制御される癌遺伝子の発現を阻害することで、種々の癌において抗癌作用を認める。今回の研究においては、AR 非依存性前立腺癌細胞株 PC3 で BET 阻害薬投与による遊走能、浸潤能の低下を認めた。JQ1 によって低下する SE 関連遺伝子群から long non-coding RNA *MANCR* を同定した。*MANCR* は、悪性度の高い乳癌において高発現する遺伝子として同定され、甲状腺癌、胃癌、マンツル細胞リンパ腫、肝癌において細胞増殖や EMT に関連することが示されている。今回の研究では、*MANCR* が前立腺癌においては、細胞増殖ではなく遊走能や浸潤能に関連することが示された。*MANCR* の作用機序については、microRNA への結合を介するものが考えられているが、種々の癌において別の microRNA が関連している可能性が報告され、前立腺癌での作用機序についてはさらなる研究が必要と考えられる。

結論：

AR 非依存性前立腺癌細胞株 PC3 の SE 関連遺伝子は、EMT pathway に関連した遺伝子の頻度が高い。lncRNA *MANCR* は BRD4 の標的であり、前立腺癌細胞の遊走、浸潤において重要な役割を持っている。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masayuki Nagasawa, Kosuke Tomimatsu, Koji Terada, Kenta Kondo, Kazuko Miyazaki, Masaki Miyazaki, Daisuke Motooka, Daisuke Okuzaki, Tetsuya Yoshida, Susumu Kageyama, Hiroshi Kawamoto, Akihiro Kawauchi, Yasutoshi Agata	4. 巻 526
2. 論文標題 Long non-coding RNA MANCR is a target of BET bromodomain protein BRD4 and plays a critical role in cellular migration and invasion abilities of prostate cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 128-134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.043	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 該当する

〔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 Masayuki Nagasawa, Akinori Wada, Susumu Kageyama, Akihiro Kawauchi, Yasutoshi Agata
2. 発表標題 Long non-coding RNA MANCR plays a critical role in cellular migration and invasion abilities of prostate cancer
3. 学会等名 第79回 日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永澤誠之, 富松航佑, 寺田晃士, 和田晃典, 吉田哲也, 影山 進, 成田充弘, 縣保年, 河内明宏
2. 発表標題 前立腺癌のSuper-enhancerを介した新規治療標的の同定
3. 学会等名 第108回 日本泌尿器科学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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