

令和 6 年 4 月 4 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16753

研究課題名（和文）前立腺癌の去勢抵抗性増殖を起こすFAK-YAP経路を活性化する新規GPCRの探索

研究課題名（英文）Identification of GPCR which activates FAK-YAP signaling and promotes castration-resistant growth of prostate cancer

研究代表者

五島 悠介（Goto, Yusuke）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：00710576

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：網羅的RNA発現解析とゲノム科学的手法を用い、miR-15b-5pがムスカリン受容体3（CHRM3）を制御することと、miR-15b-5pによるCHRM3抑制が、CHRM3下流シグナルであるYAPの活性化を制御することを示した。よって、miR-15b-5p-CHRM3-YAP経路が、去勢抵抗性増殖の一因であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、miR-15b-5p/CHRM3/YAPシグナルの活性化が前立腺癌の去勢抵抗性増殖の機序の一因と考えられた。前立腺癌の神経依存的な去勢抵抗性増殖がこれまで報告されているが、その原因として、機能性RNAによるムスカリン受容体の遺伝子発現変化が示された。本研究成果は、前立腺癌のアンドロゲン受容体に依存しない去勢抵抗性増殖の機序の解明の一助となりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Small RNA-seq and bioinformatic method showed that miR-15b-5p regulates expression of muscarinic receptor 3 (CHRM3), and that regulation of CHRM3 by miR-15b-5p can inhibit activation of YAP signaling induced by CHRM3. microRNA-15b-5p/m3/YAP signaling axis is a novel pathway which promotes castration-resistant growth of PCa. Our findings provide novel mechanisms of muscarinic-signal-driven CRPC progression.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 去勢抵抗性増殖 ムスカリン受容体

### 1. 研究開始当初の背景

申請者の先行研究では、去勢状態の前立腺癌のアンドロゲン受容体 (AR) を介さない増殖経路の一つとして、FAK 下流シグナルの亢進があると仮定した。その根拠としては、CRPC/NEPC 臨床検体では、HSPC 臨床検体と比較して有意に FAK のコピー数増幅が見られたこと、FAK の発現亢進は前立腺癌の予後不良因子であったことが挙げられ、これらは CRPC における FAK の重要な役割を示唆している。これらを *in vitro* で検証するため、CRPC 細胞株 (PC3, 22Rv1) について、無アンドロゲン環境下で 3-D culture を行い、FAK 阻害薬を添加すると、いずれの細胞株においても Sphere 増殖は抑制された。さらに、上流シグナルを經由して FAK シグナルを亢進させると Sphere 増殖は亢進し、更新させた状態で FAK 阻害剤を用いるとやはり Sphere 増殖は阻害された。これら結果より、FAK シグナルの亢進は前立腺癌の去勢抵抗性増殖を亢進させ、逆に FAK 阻害剤はその去勢抵抗性増殖を阻害することが示された。

さらに、FAK の下流分子を探索すると、YAP シグナルの亢進が見出された。さらに、YAP のノックダウンにより、FAK シグナル更新による前立腺癌去勢抵抗性増殖を阻害することが可能であり、これら結果から、FAK-YAP シグナルの亢進が前立腺癌の去勢抵抗性増殖の一つのメカニズムであるとわかった。

また、申請者の研究グループでは、Gq シグナルが恒常的に活性化している眼内黒色腫を代表例として、G 蛋白共役型受容体 (GPCR) が FAK を介し、YAP を活性化させることを証明している。このような背景のもと、本研究では、前立腺癌においても同様に GPCR が FAK-YAP シグナルを活性化させている可能性を考えた。

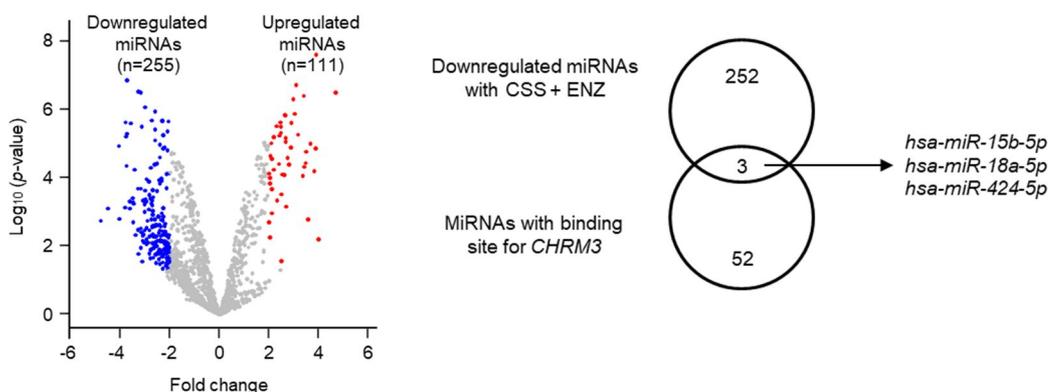
### 2. 研究の目的

去勢抵抗性増殖の一因である FAK-YAP シグナル活性化を来す GPCR 探索と、そのシグナル遮断による新規治療の探索を目的とした。

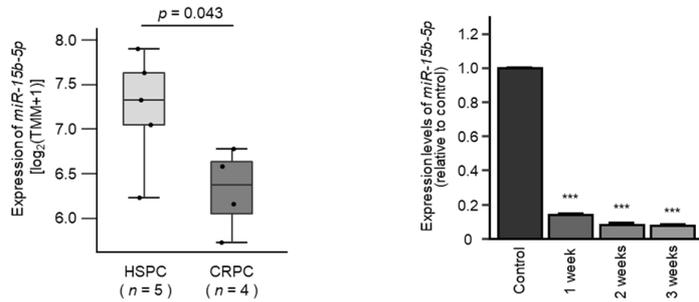
### 3. 研究の方法

公共データベースを用いて前立腺癌で発現亢進している GPCR を抽出した。GPCR を制御しうる機能性 RNA を、次世代シーケンサーと公共データベースを用いてバイオインフォマティクス解析で抽出した。この結果を *in vitro* で検証した。FAK-YAP シグナルの活性化は qRT-PCR、Western blotting を用いて確認した。さらに Sphere assay を用いて機能が制御されるか確認した。

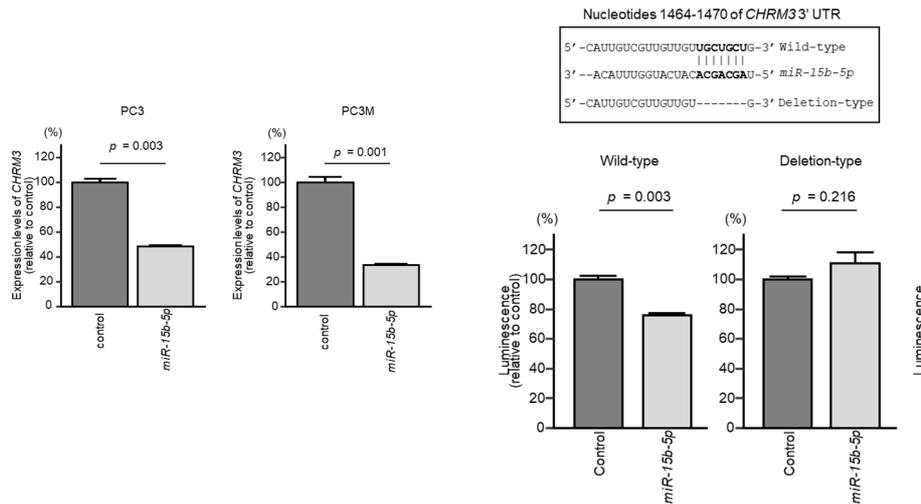
### 4. 研究成果



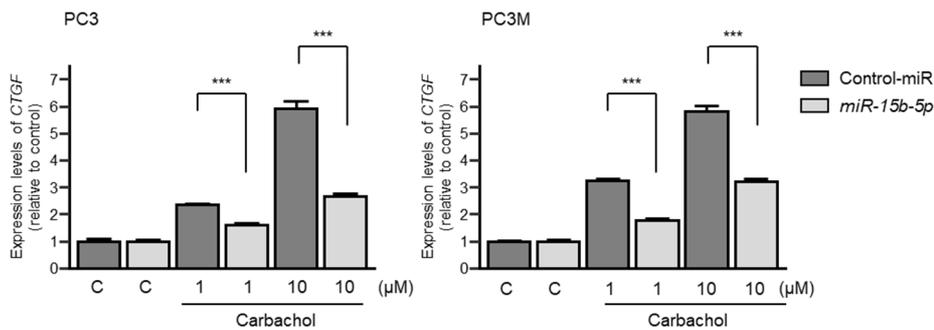
去勢感受性前立腺癌細胞株をアンドロゲン除去環境下 (去勢環境下) におき、CHRM1 と CHRM3 の発現を確かめると、これら受容体の発現は亢進した。さらに、このメカニズムを見出すため、この去勢環境下においた去勢感受性前立腺癌細胞株から RNA を抽出し、網羅的 RNA 発現解析 (Small RNA-seq) を行った。さらに、RNA 配列から CHRM3 を制御しうるマイクロ RNA を抽出した。これらデータを合わせ、解析すると、CHRM3 を制御しうるマイクロ RNA として、miR-15b-5p, miR-18a-5p, miR-424-5p が候補として挙げられた。



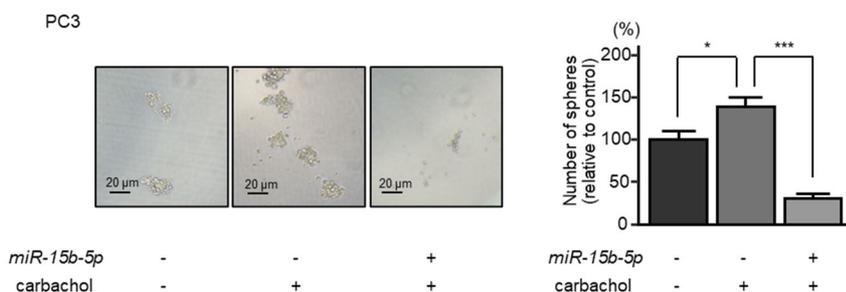
このうち、miR-15b-5p は去勢抵抗性前立腺癌臨床検体で、ホルモン感受性前立腺癌検体より発現が低下していた。さらに癌細胞を去勢環境下で培養すると発現が低下することを確認した。



次に miR-15b-5p を核酸導入すると、CHRM3 の mRNA 発現は低下した。さらに、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、miR-15b-5p が CHRM3 の 3' -UTR に直接結合することを証明した。



先行研究と合わせ、CHRM3 のリガンドであるカルバコールを用いてこのシグナルを刺激すると YAP が活性化するが、本現象は YAP 下流の CTGF や CYR61 の mRNA が亢進することで確認される。これらの発現亢進について、miR-15b-5p による効果を確認するため、カルバコール刺激下すなわち CHRM3 が活性化された状態で、miR-15b-5p を核酸導入したところ、この mRNA 発現亢進は核酸導入により抑えられることがわかった。さらに、Western blotting を用いて、CHRM3 刺激による YAP 活性化が、miR-15b-5p 核酸導入により制御されることを見出した。



さらに、カルバコール刺激による前立腺癌細胞株の Sphere 形成が、miR-15b-5p 添加により抑制されることを示した。

これら結果より、CHRM3の活性化によりFAK-YAPが活性化すること、さらにCHRM3の発現亢進の一因として去勢によりmiR-15b-5pの発現低下が起こることが分かった。本研究結果は前立腺癌の去勢抵抗性増殖の機序の解明の一助となりうると考えられた。

参考文献: MiR-15b-5p inhibits castration-resistant growth of prostate cancer cells by targeting the muscarinic cholinergic receptor CHRM3. Asai S, Goto Y, Tanigawa K, Tomioka Y, Kato M, Mizuno K, Sakamoto S, Seki N. FEBS Lett. 2023 Apr;597(8):1164-1175. doi: 10.1002/1873-3468.14598. Epub 2023 Feb 20.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asai Shunichi, Goto Yusuke, Tanigawa Kengo, Tomioka Yuya, Kato Mayuko, Mizuno Keiko, Sakamoto Shinichi, Seki Naohiko	4. 巻 597
2. 論文標題 <i>MiR 15b 5p</i> inhibits castration resistant growth of prostate cancer cells by targeting the muscarinic cholinergic receptor <scp>CHRM3</scp>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1164 ~ 1175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14598	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yusuke Goto*, Shunichi Asai, Shinichi Sakamoto, Tomokazu Sazuka, Yusuke Imamura, Naohiko Seki, Tomohiko Ichikawa, Chiba, Japan
2. 発表標題 microRNA-15b-5p/ Muscarinic receptors/ YAP signaling Contributes to Castration-resistant Growth of Prostate Cancer
3. 学会等名 2023年 米国泌尿器科学会年次総会（国際学会）
4. 発表年 2023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
研究協力者	浅井 俊一  (Asai Shunichi)		
研究協力者	関 直彦  (Seki Naohiko)		

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