

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791507

研究課題名(和文) 前立腺癌におけるDD3による癌抑制候補遺伝子BMCC1の制御と癌化への関わり

研究課題名(英文) A long ncRNA DD3 promotes cell growth by suppressing pro-apoptotic BMCC1 expression in prostate cancer.

研究代表者

巽 康年(Tatsumi, Yasutoshi)

千葉県がんセンター(研究所)・研究所 がんゲノム研究室・研究員

研究者番号：00450578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：BMCC1遺伝子座にコードされるLong non-coding RNA・DD3遺伝子の機能を調べた所、前立腺癌細胞株において、DD3がBMCC1の発現をmRNAレベルで負に制御することを明らかにした。前立腺癌で高発現するDD3に対して、抗BMCC1抗体を用いた免疫組織染色の結果、BMCC1は癌組織で発現低下傾向にある事が判明した。さらにBMCC1が、Bcl-2との結合およびAKTのリン酸化抑制を介して細胞死を促進し、抗癌剤感受性に寄与することを示したが、これはDD3の発現抑制によりBMCC1が発現亢進した細胞でも見られ、DD3のsiRNAと抗癌剤の組合せがより有効な治療法となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The Long non-coding RNA, DD3, gene was mapped at the intron 6 within BMCC1 gene in an opposite way. In prostate cancer cell lines, there occurred inverse regulation in BMCC1 and DD3 expression. These suggested that DD3 targets BMCC1 for its expression to be decreased in prostate cancer cells. In contrast to higher expression of DD3 in prostate cancer tissues, lower expression of BMCC1 in primary prostate cancers in compared with corresponding normal tissues were detected by immunohistochemistry using anti-BMCC1 antibody. In addition, we found that BMCC1 is a key facilitator of mitochondrial apoptosis and DNA damage-induced drug sensitivity through AKT attenuation and associates with Bcl-2. Because DD3 knockdown facilitated the reduction of cell viability and promotion of Cisplatin sensitivity through pro-apoptotic BMCC1 accumulation, we proposed that combination therapy with DD3 siRNA and Cisplatin would be of potential value for treating DD3 positive aggressive prostate cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺がん BMCC1蛋白質 アポトーシス促進因子 siRNA ノンコーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

申請者らのグループはこれまでに、神経増殖因子 (NGF、BDNF、NT-4/5) からのシグナルおよびそのレセプター (TrkA、TrkB) が小児神経芽腫の増殖、分化およびプログラムされた神経細胞死を制御することを示してきた。TrkA の高発現は予後良好な小児神経芽腫で認められるが、これら TRkA を発現する細胞は特に小児において癌の退縮に繋がるプログラムされた神経細胞死を誘導しうるあるいは良性の神経節種へと分化する能力を保持していると考えられる。このように神経芽腫細胞も正常な交感神経と同様にシユワン細胞や繊維芽細胞から供給される NGF 量を介して部分的ではあるが細胞分化あるいはプログラムされた神経細胞死が制御されている。一方で、TrkB は予後不良の神経芽腫で高発現する傾向にあり、BDNF や NT-4/5 と結合して autocrine あるいは paracrine 的に増殖を促進することから、癌細胞の転移・浸潤に関わることが示唆されている (Nakagawara *et al.*, N. Engl. J. Med., 1993; Nakagawara *et al.*, Mol. Cell. Biol., 1994)。我々が見出した新規遺伝子 *BMCC1* は 350kDa の蛋白質をコードしており、その産物の COOH-末端には BNIP2 や Cdc42GAP と同性的のある BCH ドメインを保持している。BNIP2 は BCH ドメインを介して Bcl-2 等のアポトーシス抑制因子と結合しアポトーシスを促進することが知られるが、同様に *BMCC1* も NGF 依存的な神経細胞のアポトーシス促進因子として働くことを明らかにしている (Machida *et al.*, Oncogene, 2006)。また Cdc42 は JNK-MAP キナーゼ経路を介して神経細胞死を促進することが知られる因子であるが、Cdc42GAP と同様に *BMCC1* も BCH ドメインを介して Cdc42 を活性化させて神経細胞死の促進に関与することが予想される。このように *BMCC1* は BNIP2 や Cdc42GAP と同じく神経細胞の分化と死を司る因子であると考えられるが、BNIP2 と Cdc42GAP の発現は *BMCC1* とは異なり神経芽腫の予後と相関がないことから、*BMCC1* のみが予後良好な神経芽腫の細胞分化あるいはプログラムされた神経細胞死に関わることが示唆される (Machida *et al.*, Oncogene, 2006)。さらに興味深いことに *BMCC1* が TrkA と結合することを見出し、*BMCC1* は NGF による TrkA の活性化を介した細胞内シグナル伝達経路を直接制御することによって神経細胞の増殖・分化・細胞死を決定する際の鍵となる因子である可能性が考えられる。

それと平行して申請者らは、*BMCC1* は神経系のみならずあらゆる組織で発現していることを見出し、神経細胞以外においても細胞の増殖・分化・細胞死を決定する際の鍵となる因子である可能性が示唆されて

いる (Machida *et al.*, Oncogene, 2006)。中でも *BMCC1* は *DD3* と同様に前立腺で高発現することを見出しているが、前立腺におけるこれら因子の機能および発現制御は不明である。近年 non-coding RNA の幾つかは、そのターゲットとなる遺伝子の発現制御を介して細胞の癌化に関わることが報告されつつあり、癌化のメカニズムを明らかにする上でも癌化に関わる non-coding RNA のターゲット遺伝子およびその制御機構を明らかにすることは非常に重要であると考えられる。申請者が本研究課題で着目している *DD3* 遺伝子は、男性ホルモンのアンドロゲン依存的に発現することおよび前立腺癌で高発現することが知られている。しかし、4 個の exon から構成される約 4kb の ORF を持つ大きな遺伝子であるのにも関わらずストップコドンが高頻度に出現して蛋白質をコードできない事から non-coding RNA の可能性が示唆されるが、そのターゲットおよび癌における機能については全く明らかにされていない。そこで、申請者らは *DD3* 遺伝子が *BMCC1* 遺伝子の第 6 イントロンに逆向きにコードされている事から *BMCC1* 遺伝子の発現を制御する可能性を考え本研究課題の着想に至った。実際に non-coding RNA が同じ遺伝子座に逆向きにコードされる他の遺伝子の発現を制御する可能性が提唱されており (Lapidot *et al.*, EMBO Rep., 2006) その具体的な事例についてもヒトを含む種々の生物種において報告されつつあった。

2. 研究の目的

近年激増傾向にある前立腺癌の新規診断治療を念頭に、予想される *DD3* による *BMCC1* の発現制御とその癌化への関わりについて解明する事を目的として以下の項目で研究を進めた。

(1) 前立腺癌細胞株における non-coding RNA の *DD3* による *BMCC1* の発現制御機構の解明。

申請者らは、前立腺癌を含む種々の癌において *BMCC1* の発現が *DD3* の発現と一部逆相関することを明らかにしており、同じ遺伝子座に存在する *DD3* と *BMCC1* の二つの遺伝子がそれぞれ相手方の遺伝子の発現を制御する可能性を考えている。特に、予備的な実験結果より *DD3* が *BMCC1* の発現制御に関わる事を見出しているが詳細は不明である。そこで本研究課題では、*BMCC1* および *DD3* の過剰発現と siRNA を用いた *BMCC1* および *DD3* の発現抑制法とを組み合わせ、これら因子の発現変化を検討することを手がかりとして発現制御機構を明らかにした上で、シグナル経路の下流因子 (JNK-MAP キナーゼ経路

等)への影響および前立腺癌細胞の増殖・分化・細胞死への影響について解明する。

(2) 前立腺癌における BMCC1 と DD3 の発現様式の解明と新規診断法への可能性の検討。

千葉県がんセンター泌尿器科の協力の下、各ステージの前立腺癌組織より作成したパラフィン切片を用いて抗 BMCC1 抗体による免疫染色と HE 染色を組み合わせることで癌部と非癌部における発現様式を統計的に明らかにする。さらに、BMCC1 と DD3 の発現を調べることがより精度の高い前立腺癌の診断法になり得るかについて検討する

(3) DD3 による BMCC1 の発現制御機構を標的とした前立腺癌の新規治療法の検討。

上記の研究より解明した前立腺癌における DD3 と BMCC1 の関係、特に non-coding RNA であり前立腺癌で高発現する DD3 が癌抑制候補因子でありアポトーシス促進因子でもある BMCC1 の発現を負に制御するという関係から、siRNA による DD3 の発現抑制は BMCC1 の発現亢進を介して細胞増殖抑制および細胞死の促進が予想され、これを利用した前立腺癌治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌細胞株における non-coding RNA の DD3 による BMCC1 の発現制御機構の解明。

Non-coding RNA の DD3 (がん遺伝子の候補)が同じ遺伝子座に逆向きにコードされる BMCC1 (がん抑制遺伝子の候補)の発現を負に制御する可能性を検証する為に、前立腺癌細胞株 LNCaP 細胞株を使用して BMCC1 と DD3 遺伝子の強制発現系および siRNA を用いた発現抑制系を用いることによって BMCC1 と DD3 を量的に変動させる。細胞における各 mRNA の発現は RT-PCR 法にて、BMCC1 蛋白質に関しては抗 BMCC1 抗体を用いたウェスタンブロット法等によって解析を行う。続いて DD3 が BMCC1 の発現を転写レベルで抑制するのがあるいはそれ以降(例えば mRNA あるいは蛋白質の安定性)に関与するかについて、RNA 合成阻害剤を用いて検討する。また BMCC1 は細胞内シグナルを介して細胞の増殖と細胞死を制御することが示唆されることから、DD3 を介した BMCC1 の発現抑制は自身が持つ BCH ドメイン依存的な細胞死の抑制あるいは細胞内のシグナル経路等に依存した細胞増殖抑制の解除が考えられる。このメカニズムの詳細については、BMCC1 の過剰発現と発現抑制法を組み合わせることで明らかにする。さらに DD3 による BMCC1 の発現抑制は前立腺の癌化の一過程と考えられるが、本仮説を検証する為に BMCC1 と DD3 を量的に変動させた前立腺

癌細胞株を用いて細胞の増殖能および細胞死等の表現型への影響を MTT アッセイや TUNEL 法によって検討すると共に、細胞内シグナル分子の変化をウェスタンブロット法によって解析する。

(2) 前立腺癌における BMCC1 と DD3 の発現様式の解明と新規診断法への可能性の検討。

前立腺癌における BMCC1 と DD3 の発現に関する検討は、複数の組織検体より作製したパラフィン切片を用いて抗 BMCC1 抗体による免疫染色と DD3 の *in situ* ハイブリダイゼーション、HE 染色を組み合わせることで癌部と非癌部における発現様式を解析する。

(3) DD3 による BMCC1 の発現制御機構を標的とした前立腺癌の新規治療法の検討。

項目(1)の結果をもとに、DD3 に対する siRNA が BMCC1 の発現を介して細胞増殖を抑制し細胞死を促進するか、あるいは結果として抗がん剤(シスプラチン等)の感受性を上昇させるか等について前立腺癌細胞株を用いて検討を行う。

4. 研究成果

(1) 前立腺癌細胞株における non-coding RNA の DD3 による BMCC1 の発現制御機構の解明。

前立腺癌細胞株 LNCaP 細胞株を使用して DD3 遺伝子の強制発現系と siRNA を用いた発現抑制系を用いることによって DD3 の発現量を人工的に変動させる実験系を構築した。これら細胞について、RT-PCR 法にて mRNA の発現を、抗 BMCC1 抗体を用いたウェスタンブロット法によって BMCC1 蛋白質の発現を検討した。DD3 遺伝子を過剰発現したところ、BMCC1 の発現が mRNA レベルと蛋白質レベルで有意に低下することを見出した。次に、DD3 遺伝子を siRNA によりノックダウンしたところ、BMCC1 の発現が mRNA レベルと蛋白質レベルで有意に増加することを明らかにした。すなわち、DD3 mRNA が BMCC1 の発現を負に制御することが示された。次に、DD3 が BMCC1 の発現を転写レベルで抑制するのについて、RNA 合成阻害剤のアクチノマイシン D 処理を行い、DD3 が BMCC1 mRNA の不安定化に寄与することを明らかにした。制御メカニズムの詳細についてはさらなる検討の余地を残すが、以上の結果から、前立腺癌で高発現する non-coding RNA の DD3 が BMCC1 mRNA の安定性を負に制御することを提唱することができた。

上記の制御が細胞に及ぼす影響を議論する為には、BMCC1 の発現亢進が細胞に及ぼす影響について明らかにすることが必須と考えた。BMCC1 の強制発現系と siRNA を用いた発現抑制系を用いることによって

BMCC1 の発現量を人工的に変動させる実験系を構築して解析したところ、BMCC1 はミトコンドリア経路の細胞死を促進する因子であることを明らかにした。その際、BMCC1 は BCH ドメインを含む C 末領域を介して、細胞死抑制因子の Bcl-2 と結合するとともに細胞生存シグナルの重要な因子として知られる AKT のリン酸化を負に制御することを見出した。逆に、細胞における BMCC1 の発現低下は、シスプラチン等の DNA 傷害性抗癌剤に対する感受性を低下させることを示した。以上の成果は、BMCC1 が関わるアポトーシス促進機構の一端を世界に先駆けて明らかにしたものであり、学術論文として投稿中である(Tatsumi *et. al.*, 投稿中)。

次に、DD3 のノックダウンにより BMCC1 の発現が増加した LNCaP 細胞の表現型について調べた。その結果、DD3 を発現抑制して BMCC1 の発現が亢進させると、細胞の生存率が低下することを見出した。さらに、DD3 のノックダウンはシスプラチンに対する感受性を上昇させることを明らかにした。これは、DD3 の発現抑制が前立腺癌の治療に有効である可能性を提唱するものである。さらに本知見は、DD3 の高発現が前立腺の癌化あるいは癌の進展に関わるメカニズムを理解する際の手がかりとなることが期待される。

(2) 前立腺癌における BMCC1 と DD3 の発現様式の解明と新規診断法への可能性の検討。

前立腺癌および正常な前立腺のパラフィン組織切片に対して、抗 BMCC1 抗体を用いた BMCC1 の免疫組織染色法を確立した。その結果、BMCC1 が前立腺癌組織で発現低下する傾向にあることを見出した。これは、BMCC1 の発現量が前立腺癌の新規マーカーとなり得ることを示唆するものである。同時に、前立腺癌および正常な前立腺のパラフィン組織切片中の DD3 mRNA の発現量を *in situ* ハイブリダイゼーション法にて定量的に検出するシステムの確立を試みた。今後は、症例数を増やして BMCC1 と DD3 の発現を系統的に調べ、これらを組み合わせることがより良い前立腺癌の診断法となり得るかという点について検証する必要がある。

(3) DD3 による BMCC1 の発現制御機構を標的とした前立腺癌の新規治療法の検討。

項目(1)、(2)の成果より、前立腺癌細胞株の LNCaP 細胞において、siRNA を用いた DD3 のノックダウンは、BMCC1 の発現回復を伴い、細胞の生存率を低下させるとともにシスプラチンに対する感受性を上昇させること、実際に BMCC1 の発現低下が前立腺癌で観察されることを明らかにした。したがって、前立腺癌で高発現する DD3 の発現抑制が BMCC1 の発現回復をもたらす、アンドロゲン非依存性となった難治性の再燃癌を含む DD3 が高発現した前立腺癌を治療する方法として新たな可能性を示すことができ

た。これらの内容については、学術論文として報告する準備中である(Tatsumi *et. al.*, 投稿準備中)。今後は、臨床応用を見据えて、前立腺癌細胞を移植したマウスのゼノグラフトモデルを用い、DD3 に対する siRNA を投与することによる治療効果を検証していく必要がある。

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 1 件)

Daisuke Takagi, Yasutoshi Tatsumi, Tomoki Yokochi, Atsushi Takatori, Miki Ohira, Takehiko Kamijo, Satoshi Kondo, Yoshitaka Fujii, and Akira Nakagawara · Novel adaptor protein Shf interacts with ALK receptor and negatively regulates its downstream signals in neuroblastoma. · **Cancer Science** · 査読有 · 104 · 2013 · 563-572 · DOI: 10.1111/cas.12115

[学会発表](計 15 件)

Yasutoshi Tatsumi, Mohammad S. Islam, Akira Nakagawara · The scaffold protein BMCC1 promotes apoptosis via the mitochondrial pathway and is downregulated in cancers. · 第 72 回日本癌学会学術集会 · 2013 年 10 月 3 日 · 横浜

Mohammad S. Islam, Yasutoshi Tatsumi, Jesmin Akter, Akira Nakagawara · E2F1-dependent transcriptional upregulation of proapoptotic BMCC1 in favorable neuroblastoma. · 第 72 回日本癌学会学術集会 · 2013 年 10 月 3 日 · 横浜

Mohammad Sazzadul Islam, Yasutoshi Tatsumi, Ryo Takano, Yusuke Suenaga, Yohko Nakamura, Akira Nakagawara, · TAp63 trans-activates the expression of BMCC1 and promotes apoptosis in neuroblastoma. · 6th p63/p73 International Workshop · 2013 年 9 月 16-18 日 · 木更津

Mohammad Sazzadul Islam, Yasutoshi Tatsumi, Ryo Takano, Jesmin Akter, Akira Nakagawara · E2F1-dependent Transcriptional Regulation of Pro-apoptotic BMCC1 during DNA Damage-induced Apoptosis. · 第 35 回日本分子生物学会年会 · 2012 年 12 月 13 日 · 福岡

巽 康年、高野 良、モハマド サジャドウル イスラム、中川原 章 · BMCC1, a novel pro-apoptotic protein down-regulated in cancers, is induced by DNA damage and promotes mitochondrial apoptosis through anti-apoptotic Bcl-2 proteins. · 第 35 回日本

分子生物学会年会・2012年12月11日・福岡

Mohammad Sazzadul Islam, Yasutoshi Tatsumi, Ryo Takano, Jesmin Akter, Yohko Nakamura, Akira Nakagawara・第54回日本小児血液・がん学会学術集会・2012年12月2日・横浜

巽 康年、高野 良、モハマド サジャド ウール イスラム、中村 洋子、中川原章・BMCC1, a novel protein downregulated in cancers, binds to Bcl-2 and promotes apoptosis through caspase-9 activation.・第71回日本癌学会学術総会・2012年9月20日・札幌

Yasutoshi Tatsumi, Daisuke Takagi, Atsushi Takatori, Miki Ohira, Takehiko Kamijo, Satoshi Kondo, Akira Nakagawara・SH2 domain containing adaptor protein Shf, a favorable prognostic factor of neuroblastoma, inhibits ALK-induced oncogenic signals in neuroblastoma.・Advanced in Neuroblastoma Research 2012・2010年6月18-21日・カナダ・トロント

巽 康年、高野 良、中村 洋子、植田 健、中川原 章・前立腺がん細胞においてノンコーディングRNAのDD3はアポトーシス促進因子 BMCC1 の発現抑制を介して細胞増殖を促進する。第70回日本癌学会学術総会・2011年10月5日・名古屋

高木 大輔、巽 康年、高取 敦志、大平 美紀、上條 岳彦、近藤 知史、中川原 章・予後良好な神経芽腫で高発現する Shf は ALKとの結合を介して ALK 依存的な生存シグナルを抑制する。第70回日本癌学会学術総会・2011年10月3日・名古屋

高木 大輔、巽 康年、高取 敦志、大平 美紀、上條 岳彦、近藤 知史、中川原 章・予後良好な神経芽腫で高発現する Shf は ALKとの結合を介して ALK 依存的な生存シグナルを抑制する。第20回日本癌病態治療研究会・2011年6月18日・東京

巽 康年、横山 智彰、高野 良、大平 美紀、中川原 章・新規アポトーシス促進因子 BMCC1 遺伝子座中にコードされる DD3 遺伝子の神経芽腫悪性化における意義。第26回日本小児がん学会・2010年12月18日・大阪

高木 大輔、巽 康年、高取 敦志、大平 美紀、上條 岳彦、中川原 章・予後良好な神経芽腫で高発現する Shf は ALKとの結合を介して ALK 依存的な生存シグナルを抑制する。第26回日本小児がん学会・2010年

12月17日・大阪

巽 康年、横山 智彰、高野 良、大平 美紀、中村 洋子、植田 健、中川原 章・前立腺がんにおいて large non-coding RNA の DD3 は BMCC1 の発現を抑制し細胞の生存を促進する。第69回日本癌学会学術総会・2010年9月23日・大阪

巽 康年、横山 智彰、ウー ミャット リン、高野 良、高木 大輔、大平 美紀、中川原 章・DD3, a large non-coding RNA against the pro-apoptotic BMCC1 gene, is a candidate target for treating neuroblastoma.・Advanced in Neuroblastoma Research 2010・2010年6月22日・スウェーデン・ストックホルム

〔図書〕(計 0件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 1件)

名称：がんマーカー、および、がんの治療剤
発明者：巽 康年、中川原 章
権利者：久光製薬株式会社、千葉県
種類：特許
番号：特許願 2009-267463 号
出願年月日：21年11月25日
国内外の別：国内

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〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
巽 康年 (TATSUMI, Yasutoshi)
千葉県がんセンター研究所・がんゲノム研究室・研究員
研究者番号：00450578

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：