

論文内容の要旨

論文題目 Identification and functional analysis of novel molecular targets for prostate cancer therapy and biological function of non-coding RNA in *8q24* with prostate cancer susceptibility

(前立腺がんに対する新規治療標的遺伝子の同定と機能解析および前立腺がん感受性領域 *8q24* 上の non-coding RNA の機能解析)

氏 名 鄭 秀 蓮

1. Identification and functional analysis of novel molecular targets for prostate cancer therapy

[背景]

前立腺がんは、欧米において男性の悪性腫瘍罹患患者数で第1位、死亡者数では肺がんにつき第2位を占めている。近年では、日本を含むアジア諸国においても、生活様式の欧米化、高齢者数の増加に伴い、前立腺がんの罹患率および死亡率がともに急増している。前立腺がんの発症および進行には、男性ホルモンであるアンドロゲンによるシグナル経路が深くかかわっていることが明らかになっているため、アンドロゲンの産出を抑制し、その機能を阻害する内分泌療法（内科的または外科的去勢）が外科的切除や放射線療法とともに前立腺がんに対する標準的治療として行われ、高い有効性を示している。多くの患者においては、このホルモン療法による治療効果が期待できるが、約20-30%の患者においては、治療期間中にホルモン療法の効果がなくなり、骨やリンパ節に転移のあるホルモン不応性前立腺がんとして再燃する。ホルモン不応性前立腺がんは、既存の抗がん剤を中心とする化学療法はあまり奏功せず、現在の医療では有効な治療法がないため、新たな分子標的治療薬の開発が急務である。

本研究では、ホルモン不応性前立腺がんの発症・進展メカニズムの解明と新規治療法開発を目的として、ホルモン不応性前立腺がん細胞で発現が亢進している分子、PKIB (cAMP-dependent protein kinase inhibitor β) と STYK1 (Serine/Threonine/Tyrosine Kinase 1)を見出し、その機能解析を行った。

[方法と結果]

当研究室で作成された前立腺がんに対する遺伝子発現プロファイルから前立腺がん、特にホル

モン不応性前立腺がんで高頻度に高発現している遺伝子の抽出を行い、臨床検体と前立腺がん細胞株の cDNA を用いて実際の発現を半定量的 RT-PCR で確認した。また、これら遺伝子産物を治療薬のターゲットとした場合の副作用を回避できるようにするため、正常組織での発現を northern blot 解析にて確認し、その結果から、正常重要臓器（脳、心臓、肺、肝臓、腎臓）での発現が低く、前立腺がん細胞で高発現している 2 つの遺伝子、*PKIB* と *STYK1* を同定した。

候補遺伝子に対しては、まず、RNAi 実験にて前立腺がん細胞の増殖に与える影響について検討を行った。それぞれの遺伝子に特異的な siRNA 配列を選択し、shRNA として細胞内で発現させたところ、ノックダウン効果がみられた細胞では、増殖が抑制されることが確認され、これらの遺伝子の発現が前立腺がん細胞の増殖に重要であることが示唆された。次に、タンパク質レベルでの発現を確認するため、それぞれの分子に対する特異的抗体を作製して前立腺がん組織を用いた組織免疫染色を行った。*PKIB*、*STYK1* ともに前立腺がん、特にホルモン不応性前立腺がん組織での顕著な発現上昇が確認された。

PKIB は、組織免疫染色で前立腺がんの悪性度を表す組織学的分類であるグリーソンスコアに相関して発現が上昇しており、前立腺がんの増殖だけでなく浸潤や転移にも関わっている可能性が示された。そこで、*PKIB* の発現を siRNA で抑え、細胞の浸潤能に与える影響について Matrigel invasion assay を行ったところ、*PKIB* の発現が抑えられた細胞では浸潤能の顕著な低下が観察された。また、*PKIB* は相互作用タンパク質である protein kinase A (PKA) を介して Akt のリン酸化を上昇させることが明らかになった。*PKIB* を一過性に高発現させた細胞では、Akt のリン酸化の増加が認められ、反対に *PKIB* の発現を抑えた細胞においては Akt リン酸化の減少が観察された (Fig.1)。Akt は、多くの癌細胞で、リン酸化によりその機能が活性化され、細胞死の抑制や増殖促進、運動能の増加などを誘導することから、*PKIB* の発現上昇による前立腺がん細胞の増殖促進や浸潤能の亢進は Akt シグナル経路を介して起こることが明らかになった。

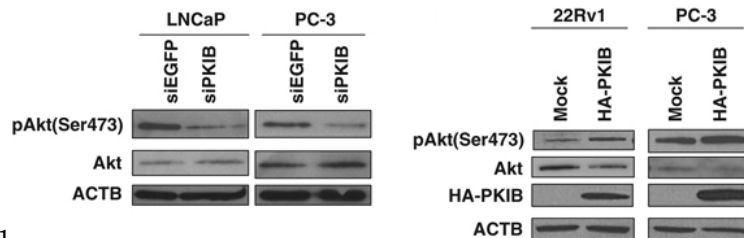


Figure 1

STYK1 はそのアミノ酸配列から kinase domain を持つと予測されており、実際に kinase としての活性を持っているのかについて検討を行うため、リコンビナントタンパク質を作製して in vitro kinase assay を施行した。*STYK1* の基質は同定されていなかったため、前立腺がん細胞株の cell lysate を用いて検討したところ、リン酸化されていると考えられるバンドが確認できた (Fig.2)。このような *STYK1* の kinase 活性ががん細胞の増殖に重要であることを調べるために、wild type(wt)*STYK1* と kinase-dead(KD)*STYK1* の発現ベクターを作成して細胞に導入した。その結果、wt では細胞増殖が促進されていたが、KD では増殖促進効果は観察されず、*STYK1* の kinase 活性が前立腺がん細胞の増殖に重要であることが明らかになった (Fig.3)。

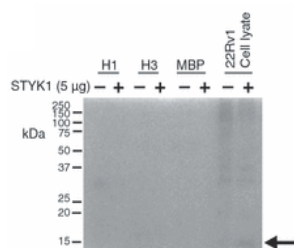


Figure 2

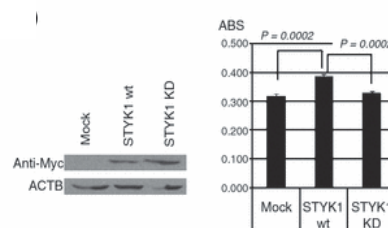


Figure 3

[考察]

今回同定した 2 つの遺伝子はともに悪性度の高いホルモン不応性前立腺がんで高発現しており、前立腺がんの増殖に重要であることが認められた。特に、PKIB は、がんの進展によって発現が上昇し、がん細胞の浸潤にも関与していること、さらに、PKA を介してがん細胞の増殖に関わる Akt を活性化させることが明らかになった。この結果は、過去に報告されている PKIB の機能とは異なったものであり、前立腺がん特異的かつ新しい機能であると考えられる。

今後、さらなる検討が必要ではあるが、本研究の結果はホルモン不応性前立腺がんの進行メカニズム解明や新規治療薬開発につながるものと考えられる。

2. Biological function of non-coding RNA in *8q24* with prostate cancer susceptibility

[背景]

がんは、遺伝的要因と環境要因の 2 つが相互作用することで引き起こされると考えられている。がんに対するリスク因子は、がん種によって様々であり、遺伝的要因が強く関わるものもあれば、環境因子がより強く働く場合もある。前立腺がんの発症リスクを高める環境要因として代表的なのは、食生活である。いくつかの研究結果により、動物性脂肪の高摂取が前立腺がんの発症を高めるとことが明らかになってきており、実際に、食生活の欧米化に伴い、日本でも前立腺がんの罹患者数は急増している。しかしながら、欧米に比べるとその割合は低く、さらに家族歴がある場合は発症する確率が高いという統計結果から、前立腺がんの発症には遺伝的背景が大きく関与しているのではないかと推測される。

最近では、国際 HapMap 研究やシーケンス技術の発展によりゲノムワイドな解析が可能になったことから、疾患に関連する遺伝子多型解析が盛んに行われている。前立腺がんに対する解析も行われており、2007 年には欧米人における前立腺がん発症リスクに関連する複数の遺伝子多型が同定された。それらの多型は染色体 8 番の長腕 q24 の複数箇所に位置しており、関連領域から約 200kb 下流にがん遺伝子である *Myc* が存在していることから、*Myc* の発現などに影響を及ぼし前立腺がんの発症リスクを上げるのではないかと予測されているが、いまだ詳しいメカニズムはわかっていない。日本人集団においても *8q24* 領域は前立腺がんとも最も強い相関を示すことがわかったが、最低でも 5 か所あると考えられる *8q24* 領域の内、*8q24 region2* が最も強く前立腺癌の発症に関わっていることが確認された。

本研究では、日本人の前立腺がん患者集団における *8q24* 領域内の疾患感受性遺伝子の同定を目的として行われ、日本人集団でもっとも強い関連を示す領域を確定し、その領域において新規の non-coding RNA(ncRNA)を同定して機能解析を行った。

[方法と結果]

8q24 領域内で最も強く関連する領域を特定するため、1504 例の前立腺がん患者 DNA サンプルと 1554 例の健常人 DNA サンプルを用いて fine mapping と re-sequencing を行った。Fine mapping では、HapMap-JPT から *8q24 region2* (chr8:128.14-128.28MB) 内の 57 tag SNP を選択して multiplex PCR と invader assay にてタイピングし、強い関連を示す SNP, rs1456315(chr8: 128,173,119, p=2.31x10⁻²¹)を確認した。この SNP を含んだ約 22kb に対して、94 例の前立腺がん患者 DNA を用いてダイレクトシーケンス法による re-sequencing を行い、前立腺がんとも有意に関連している新規の 34SNP を含む 95SNP を同定した。その中で新規の SNP(SNP34)が最も強い関連(p=1.68x10⁻²³, OR=1.75, 95% CI=1.57-1.95)を示しており、この

SNP を含む約 15kb (rs1016342-SNP34)の領域を候補領域として遺伝子の探索を行った(Fig.4)。

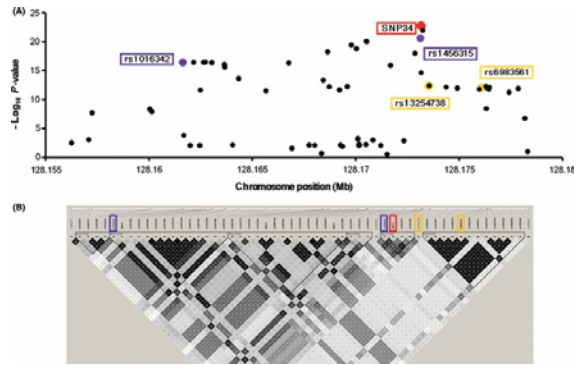


Figure 4

遺伝子の探索は、RT-PCR と RACE (Rapid Amplification of cDNA End)法を用いて行った。候補領域にはデータベースに登録されている遺伝子(EST を含む)がなかったため、任意でプライマーを設計し、RT-PCR にて転写産物の有無を検討したところ、前立腺がん細胞株で転写産物が発現していることを確認することができた。Northern blot 解析の結果では約 13kb のサイズにバンドを認めており、RACE 法にて全長の同定を試みたところ、約 12kb のイントロンを持たない polyA が付加された non-coding RNA(ncRNA), *PRNCR1* を同定した(Fig.5)。

前立腺がん細胞での機能について、*PRNCR1* に特異的な siRNA を作製して検討を行った。細胞増殖に与える影響について MTT assay を施行した結果、前立腺がん細胞の増殖が抑制されることが明らかになった(Fig.6)。さらに、前立腺がん重要な役割を担っているアンドロゲン受容体(AR)への影響について luciferase reporter assay を用いて検討したところ、*PRNCR1* の発現を抑えた細胞では AR の転写活性が低下していることが確認された(Fig.7)。

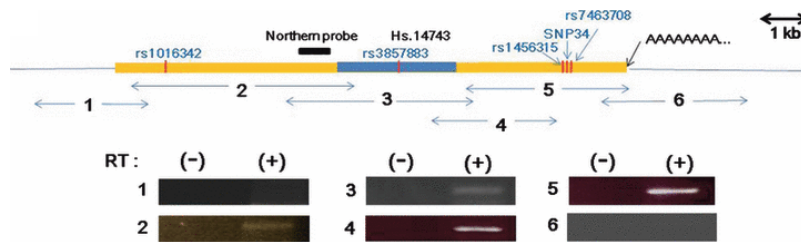


Figure 5

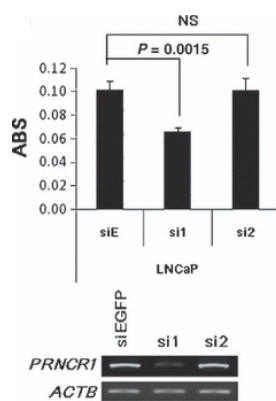


Figure 6

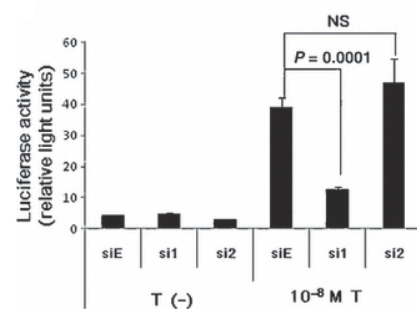


Figure 7

[考察]

日本人集団において最も強い前立腺がんに対する感受性領域を同定し、候補領域に発現している新規の non-coding RNA の存在を確認した。また、*PRNCR1* に対する機能解析を行った結果、*PRNCR1* が前立腺がん細胞の増殖に関与していることや AR の転写活性を制御していることが明らかになった。さらに、機能解析の結果では *PRNCR1* が前立腺がんの発症に関わっている可能性が示唆されたことから、前立腺がん発生メカニズムの解明にもつながると考えられる。