

博士論文（要約）

去勢抵抗性前立腺がんで発現上昇する遺伝子の機能
ならびにその臨床的意義の解析

木村 直樹

博士論文の要約

論文題目 去勢抵抗性前立腺がんで発現上昇する遺伝子の機能ならびに
その臨床的意義の解析

氏名 木村 直樹

《背景》

2017年の前立腺がん罹患数は91,215例で、男性におけるがん罹患数第1位であり、2030年頃には死亡者数は約15,000人に達すると予測されている。そのため、前立腺がんの発生や増悪、再燃の原因となるメカニズムを解明することは重要である。

前立腺がんは、アンドロゲン受容体 (androgen receptor: AR) およびリガンドであるアンドロゲンに依存して増殖することが知られている。ARのリガンドであるアンドロゲンはおよそ95%が精巣で、5%が副腎で産生され、アンドロゲンの1つであるテストステロンは5 α 還元酵素により、さらにARとの結合が強いジヒドロテストステロン (dihydro testosterone: DHT) に転換され前立腺へ作用する。ARはDHTと結合すると、細胞質から核へ移動し、標的遺伝子のandrogen response element (ARE) と呼ばれる特異的なゲノム配列に結合する。AREは標的遺伝子の発現を制御するプロモーターやエンハンサー領域に存在するため、標的遺伝子の転写を促進する。

局所前立腺がんの治療は、前立腺全摘除術や放射線治療を行う一方で、進行性前立腺がんでは、アンドロゲン遮断療法 (androgen deprivation therapy: ADT) が第1選択の治療法となる。しかし、次第にADTの効果がなくなり、去勢抵抗性前立腺がん (castration-resistant prostate cancer: CRPC) へ至ることが臨床上的問題である。CRPCの治療には、抗アンドロゲン剤のエンザルタミドや、アンドロゲン合成阻害薬のアピラテロン、ドセタキセル (docetaxel: DTX) やカバジタキセル (cabazitaxel: CBZ) などの化学療法を行う。しかし、CRPCの約15%はこれらの治療にも抵抗性を示し、ARシグナルの消失したneuroendocrine prostate cancer (NEPC) へ至る。NEPCの治療は確立されているものではなく、治療を行わずベストサポーティブケアとなることも多い。

CRPCではADTを行っているにも関わらず、ARの上流にあるエンハンサー領域の活性化や、AR変異体の頻発などの理由によりARの発現が増加しているためARシグナルが重要と考えられている。その他にも、CRPCではp53のゲノムレベルでの欠失や突然変異、局在変化などによるp53シグナルの機能変化が局所前立腺がんには頻発している。また、CRPCからNEPCへの進展は、AURKA、Myc、p53、RB1などの遺伝子発現変化により促進されると考えられている。

本研究では臨床的に問題となっているCRPCに着目した。そこで、良性前立腺、局所前立腺がんと比較し、CRPCで発現が増加している遺伝子 *Ribonuclease H2 subunit A (RNASEH2A)* の臨床的意義及び機能の解析を行った。

Ribonuclease (RNase) はあらゆる生物に存在し、RNA の分解をはじめ、RNA の代謝を行う酵素である。30 種以上の RNase が知られているが、その中でも RNase H は DNA/RNA ハイブリット鎖の RNA 鎖を加水分解する酵素であり、DNA 複製時の岡崎フラグメントの除去や、転写の過程で生じ、ゲノムの不安定性に関わるとされている R-loop の除去、DNA 複製の際に誤って取り込まれた RNA やリボヌクレオチド (rNTP) の除去を行うことにより、ゲノムを安定させるものと考えられている。ヒトを含めた真核生物には RNase H1 と H2 の 2 つタイプの RNase H が存在し、ヒトの細胞では主に RNase H2 が RNase 活性を持つと考えられている。RNase H1 と H2 の働きは、R-loop の除去では RNase H1 と H2 が同様に働き、rNTP の除去修復は RNase H2 のみが行うと考えられている。

RNase H2 は A、B、C の 3 つのサブユニットから構成され、全ての臓器に発現を認める。3 つのタンパク質が複合体を形成することで RNase H2 活性を持ち、いずれかのタンパク質の欠失や変異を認めると、RNase H2 の活性は失われる。また、RNASEH2 のそれぞれのサブユニットの変異はエイカルディ-グティエール症候群 (Aicardi-Goutieres syndrom: AGS) と呼ばれる、脳内石灰沈着と髄液細胞数上昇が認められる難治性遺伝性脳症の原因遺伝子として知られている。

RNASEH2A とがんとの関わりでは、RNASEH2A は肺腺がんや直腸がんの非がん部と比較し、がん部での RNA レベルでの発現上昇や、肝がんと腎がんにおいて RNA レベルでの発現上昇が予後悪化因子であるという報告などが認められる。さらに、前立腺がんでも、限局性前立腺がんと比較し転移性前立腺がんでは RNA レベルでの発現増加を認め、前立腺がんの進行と相関する遺伝子の 1 つとして報告されている。RNASEH2A 以外のサブユニットとがんにおける報告は、RNASEH2B の欠失が前立腺がんと慢性リンパ性白血病で認められる報告や、アデノシンの脱アミノ化により RNA を編集する酵素の遺伝子である *adenosine deaminase RNA specific (ADAR)* と RNASEH2B の両方の変異が、グリオーマと前立腺がんのリスクとなる報告を認める。また、RNASEH2C は乳がんにおいて、発現抑制により T 細胞の免疫応答を増加させ、転移の発生を抑制し、過剰発現では転移が増加するという報告や、転移のある直腸がんでは正常部と比較し RNASEH2B と RNASEH2C の RNA レベルでの発現上昇を認めるという報告があり、RNASEH2B の変異や RNASEH2C の過剰発現ががんの進行に関わると考えられている。

以上より RNASEH2A ががんの進行において重要であるという報告は認められるものの、前立腺がん細胞内における機能および CRPC 進展における役割は十分解明されていない。そこで本研究では、前立腺がんにおける RNASEH2A 発現の臨床的意義の検討と、CRPC 進行における RNASEH2A の分子作用機序の解明を行った。

《方法と対象》

1. 遺伝子データベース Oncomine (<https://www.oncomine.org/resource>) を用いて、良性前立腺、局所前立腺がん、CRPC における RNASEH2A、RNASEH2B、RNASEH2C の RNA 発現量を

検討した。

2. 東京大学医学部附属病院において1987年4月から2001年12月までに行われた根治的前立腺全摘除術症例106例を対象とし、年齢、PSA、病理学的所見、予後などの臨床情報を調査した。さらに、ホルマリンにより固定された病理組織標本から厚さ6 μm のパラフィン切片を作成し、免疫組織染色を行った。RNASEH2A (Cat # 16132-1-AP, Proteintech, Tokyo, Japan) の染色強度により、高発現と低発現を定義し、臨床的背景との相関を検討した。なお、本研究を行うにあたり、倫理委員会の承諾を取得し (倫理番号 # 2283)、事前にインフォームドコンセントを行い、同意を得た。
3. American Type Culture Collection (ATCC) より購入したアンドロゲン受容体陽性前立腺がん細胞株 LNCaP (ヒト左鎖骨リンパ節転移由来前立腺がん細胞) と 22Rv1 細胞 (ヒト前立腺がん由来上皮細胞) を用いて細胞実験を行った。short interfering RNA (siRNA) で遺伝子発現抑制を行い、設計した siRNASEH2A 及び sip53 を Lipofectamine RNAiMAX を用いてトランスフェクションし実験に使用した。siControl を同様にトランスフェクションしコントロールとして用いた。また、遺伝子過剰発現の実験には、RNASEH2A の発現ベクターを作成し、LNCaP 細胞へトランスフェクションを行い、安定発現細胞株を作成した。また比較対象としてコントロールベクター (空ベクター) をトランスフェクションした安定発現細胞も作成した。Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) により RNA レベルの発現量を、western blot 法でタンパク質レベルでの発現量変化を検討した。細胞増殖を 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)2H-tetrazolium, inner salt (MTS) assay、遊走能を Transwell migration assay、アポトーシスに与える影響を TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) 法により解析した。
4. 作成した安定発現細胞株を BALB-c/ヌードマウスの皮下へ移植し、RNASEH2A の過剰発現が細胞増殖へ与える影響を *in vivo* で検討した。さらに、CRPC モデル 22Rv1 細胞を BALB-c/ヌードマウスの皮下へ移植し、腫瘍形成を確認した後、去勢術を行った。去勢術後 siRNASEH2A を腫瘍内へ注射し、RNASEH2A の発現抑制が CRPC モデル細胞由来の腫瘍形成へ与える影響を *in vivo* で検討した。

《結果》

遺伝子データベース Oncomine を用いた前立腺がんでの RNASEH2A の RNA レベルでの発現量は正常前立腺、局所前立腺がんでは有意に増加を認め、さらに CRPC でより発現の増加を認めた。その一方で、RNASEH2B、RNASEH2C は正常前立腺組織と局所前立腺がんでは有意差は認められなかった。

前立腺がん病理組織の RNASEH2A 抗体を用いた免疫組織染色の解析では、RNASEH2A の高発現は Gleason score (GS) 8 以上との有意な相関を認めた ($P = 0.0082$)。さらに、Log-rank test により RNASEH2A の高発現が、がん特異的生存率 ($P = 0.002$)、PSA 無

再発生存率 ($P < 0.001$) を有意に悪化させる因子であることを見出した。加えて、PSA 無再発生存率における Cox 比例ハザード解析では、RNASEH2A の高発現は、GS 8 以上 ($P < 0.001$)、pT3b 以上 ($P < 0.001$)、pN1 以上 ($P = 0.0061$) とともに有意に PSA 無再発生存率を悪化させる因子であり ($P < 0.001$)、さらに、多変量解析では GS 8 以上とともに ($P = 0.0035$)、PSA 無再発生存期間を有意に悪化させる独立した因子であることが分かった ($P < 0.001$)。

前立腺がん細胞株を用いた実験では、RNASEH2A の過剰発現がアポトーシスを抑制し、細胞増殖、遊走能を亢進させることを示した。逆に RNASEH2A の発現抑制ではアポトーシスの亢進、細胞増殖、遊走能を低下させることが分かった。また RNASEH2A 安定発現前立腺がん細胞をヌードマウスへ皮下移植したところ、腫瘍増殖の亢進が確認された。その機序として、p53 及び AR の RNA、タンパク質レベルでの発現量に着目したところ、ベクター導入細胞 (コントロール) と比べ、RNASEH2A 安定発現細胞株では、DTX により誘導される p53 の発現量増加が抑制され、さらに、AR 発現量が増加していた。逆に、RNASEH2A の発現抑制では、コントロールと比較し、p53 発現量の増加と AR 発現量の減少が認められた。そこで、RNASEH2A の AR 発現量を制御するメカニズムとして、p53 に着目し検討を行った。その結果、sip53 処理は siControl 処理と比較し、AR の RNA、タンパク質レベルでの発現量が一部増加することが分かった。さらに、CRPC モデル 22Rv1 細胞をヌードマウスの皮下へ移植し、腫瘍発生後に去勢術を行い、去勢抵抗性腫瘍モデルマウスを作成した。モデルマウスの腫瘍内へ siRNASEH2A を局注することにより有意な腫瘍増殖の抑制と、RNA、タンパク質レベルでの p53 発現の増加、AR 発現の抑制を確認した。

《結論》

良性前立腺、局所前立腺がんと比較し、CRPC で発現上昇している遺伝子である RNASEH2A の機能及び臨床的意義の解析を行った。前立腺がん組織を用いた臨床病理学的検討により、RNASEH2A は前立腺がんにおける予後悪化因子であることを示した。さらに、前立腺がんモデル細胞および腫瘍モデルマウスを用いた実験により、RNASEH2A が p53 を負に、AR を正に制御することで、アポトーシスを抑制し、前立腺がんの増殖、遊走能を亢進させることを見出した。本研究により、RNASEH2A は前立腺がんにおける治療標的や診断マーカーとなる可能性が示唆された。