

博士論文

前立腺がんの進展に関わるバイオマーカーとなる
DNA 損傷応答関連遺伝子の同定

自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系専攻 泌尿性器病態学
大島将

目次

第1章 序論

1-1 前立腺がんと疫学	5
1-2 前立腺がんにおけるアンドロゲン受容体とアンドロゲンの働き	6
1-3 前立腺がんの治療	10
(i) 限局性前立腺がんの治療	10
(ii) 進行前立腺がんの治療	11
(iii) 去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)の治療	14
1-4 DNA 損傷応答(DNA damage response: DDR)とは	20
(i) DNA 一本鎖損傷(single strand break: SSB)の修復機構	22
(ii) DNA 二本鎖損傷(double strand break: DSB)の修復機構	23
(iii) がんにおける DDR	25
(iv) PARP 阻害剤	26
1-5 CRPC における DDR 関連遺伝子の変異と PARP 阻害剤	32
1-6 Replication factor C (RFC) の構造と機能	36
1-7 他臓器原発のがんでの RFC の発現に関する報告	41
1-8 本研究の目的	42

第2章 材料および実験方法

2-1 細胞培養	43
2-2 small interfering RNA (siRNA)	44
2-3 細胞増殖能の解析	44
2-4 RNA の抽出と定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: qRT-PCR)	45
2-5 Western blot 法.....	47
2-6 臨床検体の入手	48
2-7 組織免疫染色	49
2-8 免疫組織学判定基準	50
2-9 統計学的検討	51

第3章 結果

3-1 DDR 関連遺伝子は CRPC において発現上昇がみられる	52
3-2 公共データベースを用いた CRPC における DDR 関連遺伝子発現と予後に 関する解析	57
3-3 DDR 関連遺伝子は CRPC 細胞株および CRPC 組織において発現上昇がみ られる	67

3-4	CRPC 細胞の増殖に対する RFC2 発現の制御機構	73
3-5	前立腺がん組織における組織免疫染色を用いた RFC2 タンパク質発現量の 解析.....	90
第 4 章 考察		
4-1	RFC2 は CRPC の増殖やアポトーシスに関わり有望な治療標的となりうる	103
4-2	RFC2 を介した効率のよい DDR に関して.....	105
4-3	RFC2 は前立腺がんから CRPC への進行に関与し予後予測因子となりうる	107
4-4	RFC2 の発現抑制による CRPC 治療への期待	108
第 5 章	要旨.....	113
謝辞	114
引用文献	115

第1章 序論

1. 前立腺がんと疫学

前立腺は男性のみに存在する臓器で、小骨盤腔内で膀胱頸部と骨盤底筋群の間で尿道の起始部を取り囲むように存在する。前立腺の働きは精液の一部(25-30%程度)を占める前立腺液の産生であり、前立腺液は精子の運動能に影響を与える[1]。前立腺は発生学的に異なる中心域、辺縁域、移行域、前葉線維筋性間質に分類され、前立腺がんはこのうち辺縁域に好発(70-80%)し、組織学的にはほとんどが腺がんである[2]。

本邦における前立腺がん罹患数や粗罹患率は増加しており、1982 年、1992 年、2002 年および 2012 年における前立腺がん罹患数(括弧内は人口 10 万人に対する粗罹患率)はそれぞれ 4,362 人 (7.5), 9,855 人 (16.1), 29,345 人 (47.1), 73,145 人 (117.9) であり、2018 年の部位別罹患数では、男性がん総数 558,874 人のうち前立腺がんは 92,021 人 (149.5) で、全体の 16.5%を占め男性の第 1 位であった。2021 年の推定罹患数予測でも 95400 人で男性がんの第一位と予測されている。このように前立腺がんの罹患数および粗罹患率は極めて急速に上昇しており、他の部位のがんと比較しても、増加割合は前立腺がんが最も高い[3]。

2. 前立腺がんにおけるアンドロゲン受容体とアンドロゲンの働き

前立腺がんはアンドロゲン依存性があることがほかのがん種と比較して大きな特徴であり、前立腺がんの増殖や進行にはアンドロゲン受容体 (androgen receptor: AR) とそのシグナルが非常に重要である[4]。

AR はエストロゲン受容体やプロゲステロン受容体などと共に核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子の一つである。AR をコードする遺伝子は X 染色体の q11-12 に存在し、全長 2.8kb で約 919 個のアミノ酸をコードし、8 つのエクソンからなる。エクソン 1 は N 末端の転写活性ドメイン (activation function 1: AF1)、エクソン 2 と 3 は DNA 結合ドメイン (DNA binding domain: DBD)、エクソン 4 はヒンジ領域 (hinge region: HR)、エクソン 5-8 は AF2 を含むリガンド結合ドメイン (ligand binding domain: LBD) をそれぞれコードしている[5]。 (図 1)

図 1

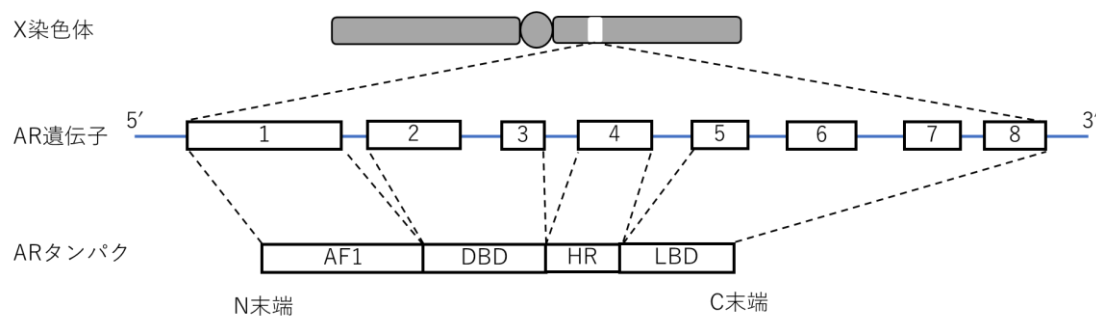


図1 アンドロゲン受容体(androgen receptor: AR)遺伝子の位置、遺伝子配列、各ドメインの配列

AR 遺伝子は X 染色体の q11-12 に存在し 8 つのエクソンと 7 つのイントロンからなる。エクソン 1 は N 末端の転写活性ドメイン (activation function 1: AF1)、エクソン 2 と 3 は DNA 結合ドメイン (DNA binding domain: DBD)、エクソン 4 はヒンジ領域 (hinge region: HR)、エクソン 5-8 は AF2 を含むリガンド結合ドメイン (ligand binding domain: LBD)をそれぞれコードしている。

AR のリガンドであるアンドロゲンは炭素数が 19 個のステロイドホルモンの総称で、精巣由来でリガンド活性の高いテストステロンや副腎由来でリガンド活性の低いアンドロステンジオン、デヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone: DHEA) およびその硫酸塩などが含まれる。DHEA の AR のリガンドとしての活性はテストステロンの 5%程度である [6]。

テストステロンは脳下垂体から分泌されるゴナドトロピンである黄体形成ホルモン (luteinizing hormone: LH) の刺激により主として精巣の Leydig 細胞で産生される。血漿中に存在するテストステロンの 98% は性ホルモン結合タンパク質 (sex hormone binding globulin: SBG) と結合しており 1~2% は遊離型として存在している [6]。遊離型テストステロンは前立腺で 5α リダクターゼと補酵素の nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) により、強力な AR 結合能を持つジヒドロテストステロン (dihydrotestosterone: DHT) に変換される。副腎由来のアンドロゲンは前立腺内で 3β ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼや 17β ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼなどの酵素によりテストステロンに変換され、最終的に DHT に変換される。

細胞質に局在する AR は通常、熱ショックタンパク質 (heat shock protein: HSP) の HSP70 や HSP90 と結合しているが、DHT などのリガンドが結合すると構造変化を起こし HSP と解離し活性型となる [7]。活性型の AR は

細胞質から核内へと移動して 2 量体を形成し、さらに共役因子と複合体を形成して標的遺伝子のアンドロゲン応答配列 (androgen response element: ARE) と呼ばれるゲノム配列に結合する。ARE は標的遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域に存在し、標的遺伝子の転写を促進する [8]。さらに AR は ARE への結合による転写促進作用以外にも forkhead box A1 (FOXA1)や GATA binding protein 2 (GATA2)、homeobox protein 13 (HOXB13)、octamer transcription factor 1 (OCT1)などの転写因子とも相互作用することでさまざまな遺伝子発現を調節している [9]。

3. 前立腺がんの治療

(i) 限局性前立腺がんの治療

病巣が前立腺内にとどまっている限局性前立腺がんの場合、局所治療として手術(前立腺全摘除術)や放射線治療を行う。前立腺がんは治療方法が多く存在するため、局所治療においては制がん性を担保したうえで機能の温存が追及されている。

(a) 手術療法

1979 年に Walsh らが恥骨後式逆行性前立腺全摘を提唱して以降、手術療法は 1990 年代の PSA 検診の普及により急増した限局性前立腺がんに対する標準治療に位置づけられていた[10]。1991 年に Schuessler らにより腹腔鏡下前立腺全摘除術が初めて行われ[11]、気腹下、拡大視野での手術により出血量が大幅に減少したが、手術難易度が高くなかなか普及しなかった。手術治療における革新的な変化は 2001 年に Binder らが初めて da vinci システムによるロボット支援前立腺全摘除術(robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy: RARP)を報告したことである[12]。本邦でも 2012 年に RARP が保険適応となると急速に普及し、2017 年には年間 15600 例の RARP が施行されている。

(b) 放射線療法

前立腺がんに対する放射線治療は体への侵襲が少ないことから、高齢

者や併存疾患により手術が困難な場合も含め多くの症例で適応となる治療法で、組織外照射と組織内照射が行われている。組織外照射では 1988 年に Brahme により強度変調放射線療法(intensity-modulated radiation therapy: IMRT)の概念が提唱され[13]、前立腺に X 線照射を集約させ、周囲正常組織への線量を低減することで従来の 60-66Gy 程度から 72Gy 以上の高線量照射が可能となり、2008 年に本邦でも保険適応となり広く行われている。また、近年では陽子や炭素イオン(重粒子)を用いた粒子線治療も開始され良好な治療成績が報告されている[14]。組織内照射としては主に低リスク症例に対して密封小線源永久挿入療法や高線量率組織内照射などが行われている [15, 16]。

(ii) 進行前立腺がんの治療

前述のように前立腺がんはアンドロゲン依存性があることがほかのがん種と比較して大きな特徴であるため、アンドロゲン遮断療法 (androgen-deprivation therapy: ADT) が局所治療後の再発症例や転移性前立腺がんなどの進行性前立腺がんに対する第一選択の治療法であり、治療初期には非常に有効である [17]。

ADT は 1941 年に Huggins と Hodge が転移性前立腺がんに対して外科的去勢やエストロゲン投与を行うことで腫瘍が著明に縮小したことを報告[18]

したことに端を発する。1971 年に Schally ら[19]が黄体形成ホルモン放出ホルモン（luteinizing hormone-releasing hormone: LH-RH）の構造を解明し、LH-RH アゴニストが開発され、内科的な去勢が可能となった。LH-RH は視床下部から分泌され、脳下垂体に作用して LH の分泌を刺激し、LH は精巣でのテストステロンの合成及び分泌を促進する。LH-RH アナログは脳下垂体において持続的に LH-RH 受容体を刺激し、結果的に受容体の感受性を低下させる。これにより LH の分泌が抑制されテストステロンの合成が阻害される。この LH-RH アゴニストであるリュープロレリンやゴセレリンは現在においても ADT の主流を占めている。LH-RH アゴニストは LH-RH 受容体の持続的な刺激により受容体のダウンレギュレーションを起こす薬剤であることから、テストステロンが低下する前に LH サージにより一過性のテストステロン上昇をきたし、これはフレアアップ現象と呼ばれる。これを防ぐために 2008 年には LH サージを生じない LH-RH アンタゴニストであるデガレリクスが開発され[20]、2012 年に本邦でも使用可能となっている。これらの LH-RH アゴニスト/アンタゴニストの開発により従来の外科的去勢による永久的な去勢から一時的な内科的去勢が可能となったことで、局所治療前に一時的にホルモン治療を併用する neoadjuvant 療法や局所治療後に一時的に併用する adjuvant 療法、ADT により PSA 値が低下した際に一度休薬とする間欠ホルモン療法などが選択可能となっ

た。

1982 年に Labrie らは前立腺がんに対するホルモン治療は去勢のみでは不十分であるとし、血中アンドロゲン濃度を低下させる去勢と、核内におけるアンドロゲンの AR への結合を阻害する抗アンドロゲン剤を併用する combined androgen blockade (CAB)の必要性を提唱した[21]。海外では CAB はあまり行われておらず CAB の去勢単独に対する優位性に関しては議論があるところだが、日本人における RCT において転移性前立腺がんに対するホルモン療法では CAB は CAB 以外のホルモン療法に比べ、5 年生存率を改善させると報告[22]されていることから本邦では現在まで CAB が広く行われている。

ADT は非常に有効な治療である一方、長期間の ADT を行うと最終的に ADT に抵抗性を示し、致死的となりうる去勢抵抗性前立腺がん(castration-resistant prostate cancer: CRPC)へと進展することが臨床上の問題となっている[23]。CRPC とは Scher らによって提唱された概念[24]で、外科的あるいは内科的去勢状態で、血清テストステロン値が 50 ng/dL 未満にもかかわらず、①前立腺がんの腫瘍マーカーである prostate specific antigen (PSA) 値が 2.0 ng/mL 以上で、1 週間以上の間隔で測定した PSA 値が 3 回連続上昇し、最低値から 50%以上の上昇を認める場合、②もしくは画像上の増悪や新規病変の出現を認める場合、と定義されている[25]。

前立腺がんの去勢抵抗性獲得の機序に関してはこれまで多くの研究が行われているが、CRPC 患者の多くで AR の高発現や AR の応答遺伝子の発現上昇がみられることから、CRPC への進展においても AR や AR シグナルを介した機序が中心と考えられている[26]。これまでに報告されている主な AR を介した去勢抵抗性獲得の機序としては、①AR 遺伝子の増幅と AR の過剰発現 ②AR の点突然変異 ③リガンド結合部位が欠損した AR-V7 などの AR splice variant(AR-Vs)の発現 ④AR 転写共役因子の発現や機能の変化 ⑤AR 翻訳後修飾の異常 などが挙げられる[27]。さらに、CRPC 組織ではがん細胞が *de novo* でコレステロールからアンドロゲンを合成する経路が促進され、血清のアンドロゲン濃度は低いにも関わらず前立腺組織内でのアンドロゲン濃度はむしろ上昇していることが報告されている[28]。このように CRPC においても AR やアンドロゲンシグナルは重要であり、CRPC 治療においてもこれらを標的とした治療が開発されている。

(iii) 去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)の治療

CRPC の治療薬としては 2008 年にタキサン系抗がん剤のドセタキセルが初めて使用可能となったことを皮切りに新規の治療薬が多数開発され、本邦においても 2019 年までに第二世代抗アンドロゲン剤のエンザルタミド、アパ

ルタミド、ダロルタミド、アンドロゲン合成阻害薬のアビラテロン、タキサン系抗がん剤のカバジタキセルなどが使用可能となっている[29]。

(a)第二世代抗アンドロゲン薬(エンザルタミド、アパルタミド、ダロルタミド)

ビカルタミドやフルタミドなどの従来の抗アンドロゲン剤はアンドロゲンと AR との結合を競合阻害する薬剤[30]だが、エンザルタミドやアパルタミド、ダロルタミドはいずれも AR へのアンドロゲンの結合を阻害すると同時に、AR の核内移行及び ARE との結合を抑制することで AR シグナルを抑制する第二世代の抗アンドロゲン薬である[31]。

CRPC では AR の発現が亢進しており[32, 33]、従来の抗アンドロゲン薬は AR 発現亢進下では AR に対してアゴニストとして作用してしまい AR シグナルを介して CRPC を増殖させてしまうことが報告されていた[31, 33, 34]。そこでエンザルタミドは AR に対して高い親和性を持ち、類似するホルモン受容体(エストロゲン受容体やプロゲステロン受容体など)に対する親和性が低い化合物からスクリーニングされ、さらにビカルタミドに比較して AR に対して 5-8 倍の親和性を有し、かつアゴニスト作用を有さない化合物として抽出され開発された薬剤である[31]。

アパルタミドはエンザルタミドとほぼ同様の構造を持つが、CRPC 異

種移植モデルマウスにおいてエンザルタミドよりも高い抗腫瘍効果を示し、腫瘍組織での血中濃度が高いことや中枢神経系での濃度が約 1/4 に低減されていることが特徴である[35]。

ダロルタミドはエンザルタミドやアパルタミドとは異なるピラゾール環の極性基をもち、さらに中央部に環構造を持たないためにエンザルタミドやアパルタミドと違って柔軟に屈曲する特徴を持ち、非臨床モデルにおいてエンザルタミドやアパルタミドより血液脳関門の透過性が低く、めまいや記憶障害などの中枢性の毒性が低く、また臨床容量では cytochrome P 450 (CYP)阻害作用を持たないことから CYP で代謝される薬剤との併用の問題が生じにくいといった特徴がある[36]。

いずれの薬剤も国際第三相臨床試験の結果を受けて（エンザルタミド：PREVAIL 試験[37]、アパルタミド；SPARTAN 試験）[38]、ダロルタミド：ARAMIS 試験）[39]）CRPC に対して予後改善効果を認めたため本邦でも2014 年、2019 年、2019 年にそれぞれ承認されている。

(b)CYP17 阻害剤(アビラテロン)

血中のアンドロゲンの 90%は去勢により除去されるが、副腎由来のアンドロゲンは去勢では除去できず、さらに CRPC においては組織内でのアンド

ロゲン合成が亢進していることから従来の去勢治療では効果が乏しい[28]。
cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) 阻害剤であるアビラテ
ロンはアンドロゲン合成経路の代謝酵素 CYP17A1 を選択的に阻害することで、
コレステロールからアンドロゲンを合成する経路を遮断し(図 2)、副腎由来の
アンドロゲンや、CRPC 細胞で de novo に合成されるアンドロゲンの合成阻害
が可能である[40]。国際第Ⅲ相試験(COU-AA-302 試験)において化学療法前の
転移性 CRPC 患者の全生存期間を有意に延長した [41]ことから転移性 CRPC
に対して 2014 年に本邦で承認された。

図 2

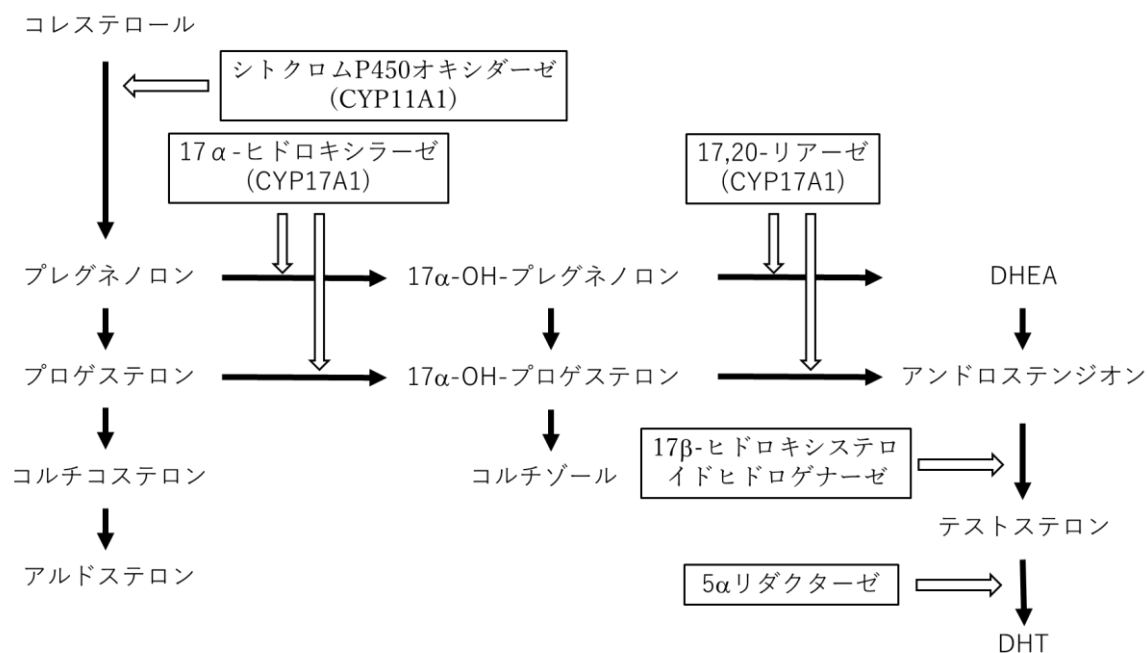


図 2 アンドロゲンの合成経路

他のステロイドホルモンと同様にテストステロンもコレステロールを原料として合成される。ミトコンドリアのシトクロム P450 オキシダーゼ (CYP11A1) によってコレステロールの側鎖が酸化的に切断され、プレグネノロンが得られる。次に 17α -ヒドロキシラーゼ および $17,20$ -リアーゼ活性をもつ小胞体の CYP17A1 によってデヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone: DHEA) やアンドロステンジオンが生成される。最終的に C17 ケト基を持つアンドロステンジオンが 17β -ヒドロキシステロイドヒドロゲナーゼによって還元され、テストステロンが生成される。テストステロンは 5α リダクターゼにより活性型のジヒドロテストステロン (dihydrotestosterone: DHT) となる。

(c)タキサン系抗がん剤(ドセタキセル、カバジタキセル)

ドセタキセルは乳がんや胃がんなど、さまざまな固形がんに対して使用されるタキサン系の抗がん剤であり、細胞の β チューブリンサブユニットに結合し、微小管の脱重合を阻害することによる細胞周期の停止、及び B-cell/CLL lymphoma 2 (Bcl-2)タンパク質をリン酸化することでアポトーシスを誘導する作用を持つ[42]。2004 年に欧米で施行された国際第Ⅲ相臨床試験で CRPC に対する生存期間延長が示されて以降、CRPC に対する初の治療薬として現在まで広く使用されている [43]。

カバジタキセルは ドセタキセル と同様のタキサン系の抗がん剤であるが、Multidrug resistance-1 (MDR-1)遺伝子によりコードされる多剤耐性因子である p 糖タンパク質との親和性が低く、細胞外に排泄されにくいことからドセタキセル耐性となった CRPC に対しても有効性が期待できる。

国際第Ⅲ相臨床試験(TROPIC 試験)においてドセタキセル治療後の転移性 CRPC に対し、CRPC に対して海外で以前使用されていたアントラキノン系抗がん剤であるミトキサトロン投与群と比較して全生存期間の延長を認めた [44] ことから 2014 年に本邦で承認された。

4. DNA 損傷応答(DNA damage response: DDR)とは

細胞のゲノムはさまざまな内因性や外因性の要因によって絶えず損傷を受けている[45]。例えば、通常の細胞代謝によって発生する活性酸素やDNA複製中のデオキシリボヌクレオチド (deoxyribonucleotide: dNTP) の誤取り込みなどにより 1 細胞あたり 1 日に最大 1×10^5 の内因性の損傷が起きる可能性がある。外因性の要因としては、太陽光に含まれる紫外線や電離放射線も 1 日に細胞あたり最大で 1×10^5 個の DNA 損傷を引き起こすと報告されている [46]。その他喫煙や化学療法に使われる薬剤、産業廃棄物などが DNA 損傷の要因として挙げられる[45]。

ゲノムが不安定になると細胞生存に壊滅的な影響を及ぼす可能性があるため、細胞はゲノムの完全性を維持するための様々なメカニズムを進化させてきた。これらの DNA 損傷に対する応答機構は DNA 損傷応答 (DNA damage response: DDR) と呼ばれている[47]。DNA の損傷には大きく分けて一本鎖損傷 (single strand break: SSB) と二本鎖損傷 (double strand break: DSB) が存在し、DDR には損傷の種類や程度に応じて様々な種類が存在し、各 DDR の経路は相補的に機能することでゲノムの完全性を保っている[48, 49]。(図 3)

図 3

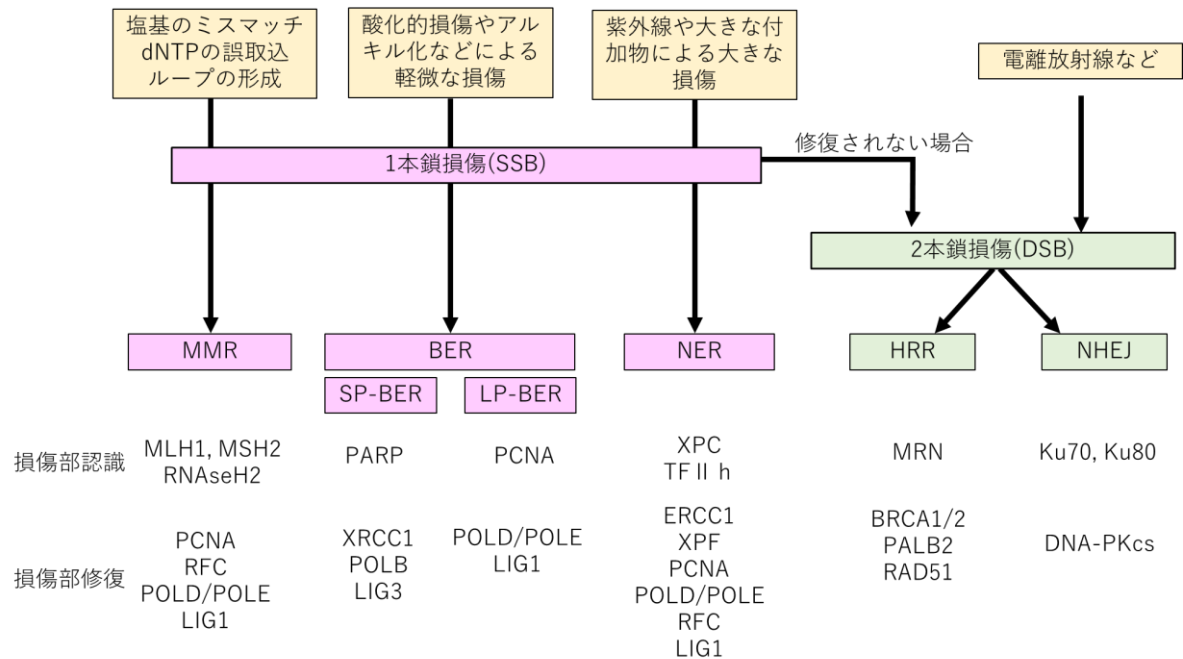


図 3 DDR pathway の概要

DNA の損傷には大きく分けて 1 本鎖損傷 (single strand break: SSB) と 2 本鎖損傷 (double strand break: DSB) が存在する。損傷の程度や種類に応じて SSB はミスマッチ修復 (mismatch repair: MMR) や塩基除去修復 (base excision repair: BER)、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) により修復される。SSB は修復されずに残ると細胞周期の S 期で複製の際に DSB に至る。この場合や電離放射線など一期的に DSB が起きる場合などには相同組み換え修復 (homologous recombination repair: HRR) と非相同末端連結 (non-homologous end joining: NHEJ) の機構により修復が行われる。

(i)DNA 一本鎖損傷(single strand break: SSB)の修復機構

SSB の修復にはミスマッチ修復(mismatch repair: MMR)や塩基除去修復(base excision repair: BER)、ヌクレオチド除去修復(nucleotide excision repair: NER)などの機構が存在する。

MMR は DNA 複製中に発生する塩基のミスマッチや RNA の構成成分である NTP の誤取り込み、複製中のヌクレオチドの重複や欠失によって生じる DNA のループの形成などを修復する[50]。塩基のミスマッチは MutL homolog 1 (MLH1) や MutS homolog 2 (MSH2) によって[51]、NTP の誤取り込みは Ribonuclease H2 複合体 (RNASEH2) によって[52] それぞれ認識され、増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen: PCNA) や replication factor C subunit (RFC)、DNA polymerase δ (POLD)、DNA ligase 1 (LIG1) など DNA 複製機構と同様のタンパク質群により修復される [53]。

DNA の酸化的損傷やアルキル化生成物など、軽微な SSB は BER によって修復される[54]。BER では 1 塩基の損傷と 2-8 塩基の損傷によってそれぞれ short patch BER (SP-BER) と long patch BER (LP-BER)に大別されるが、いずれにおいてもまず損傷した塩基が DNA グリコシラーゼと Apurinic/apyrimidinic (AP) エンドヌクレアーゼにより二重らせんから取り除かれる。SP-BER では主にポリ ADP リボースポリメラーゼ [poly (ADP-ribose)

polymerase: PARP] により修復に関与するタンパク質がリクルートされ、DNA polymerase β (POLB)、DNA ligase 3 (LIG3)により新生鎖が合成される。LP-BER では主に PCNA より修復に関与するタンパク質がリクルートされ、POLD や DNA polymerase ϵ (POLE)、LIG1 により新生鎖が合成される [55]。

紫外線によるピリミジン二量体や大きな DNA 付加物、DNA 鎖間架橋など DNA のらせん構造が大きく乱されるような SSB は NER によって修復される。NER においても全ゲノムにおける損傷部の修復を行う全ゲノム修復(global genome repair: GGR)と転写の際にポリメラーゼ反応が進行しないことで起きる転写共役修復(transcription-coupled repair: TCR)に大別されるが、いずれも xeroderma pigmentosum group C (XPC)により損傷部を認識し、それを取り囲む DNA が excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1)や xeroderma pigmentosum group F (XPF)などにより切除され、PCNA や RFC、POLD/POLE などにより修復される[56]。

(ii) DNA 二本鎖損傷(double strand break: DSB)の修復機構

α 線などの電離放射線は DNA2 本鎖を同時に損傷し分断する[57]。また、SSB が修復されないまま細胞周期が進むと S 期で DNA 複製の際に DSB へと至る[58]。このような DSB に対する修復機構は相同組み換え修復(homologous

recombination repair: HRR) と非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ) が存在する [59]。HRR は、主に細胞周期の S 期および G2 期で起こり、相同性のある姉妹染色体上の DNA 配列をテンプレートとして、新しい DNA が合成される正確性の高い修復機構である。HRR では損傷部が Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) 複合体により認識されて、E3 ユビキチンリガーゼである RNF8 が結合し、損傷部の γ H2Ax および H2A を基質としてポリユビキチン化される。ここに Breast cancer 1 (BRCA1) タンパク質が結合し、Partner And Localizer Of BRCA2 (PALB2) を介して Breast cancer 2 (BRCA2) や RAD51 と複合体を形成する。RAD51 により相補鎖の相同部位への鎖侵入が起きることで修復が進行する [60, 61]。

一方、HRR とは対照的に、NHEJ は細胞周期を通じて行われる。NHEJ は、相同性のある DNA 配列は用いず DSB の末端を直接結合させる修復機構である。NHEJ においては、まず、Ku80 と Ku70 のヘテロダイマーが二本鎖 DNA の末端に結合する。次に、タンパク質リン酸化酵素活性を有する DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) が Ku80/70 を介して二本鎖 DNA の末端に結合し、DNA polymerase λ (POL λ) や DNA polymerase μ (POL μ)、DNA ligase 4 (LIG4) などの修復関連タンパク質をリクルートして活性化する。この過程で、DSB 部位やその周辺の DNA 配列が欠失したり変異し

たりすることがあるため、HRR と比較して NHEJ は正確性が低い[62]。HRR 関連遺伝子の変異や欠失により HRR が正常に機能しない細胞は NHEJ により DSB を修復するが [63]、そのエラーの多さゆえに細胞の生存にとって有害である[64, 65]。そのため、HRR を欠損した細胞にとって正常な 1 本鎖修復機構は細胞生存のために必須である[66]。

(iii)がんにおける DDR

がんにおいて広くみられる特徴の一つとしてゲノムの不安定性が挙げられる[67]。がん細胞ではこのゲノムの不安定性により突然変異の頻度が上昇し、がん細胞の生存に有利な形質を獲得し、治療抵抗性を獲得している。このゲノム不安定性をもたらしている大きな要因が DDR 関連遺伝子の変異や欠失であり、がんにおいては DDR 関連遺伝子の変異や欠損が高頻度で認められることがわかっている[67]。DDR 関連遺伝子の変異や欠失はゲノムの不安定性によりがん細胞の生存や増殖に有利な側面がある一方で、DNA 損傷を与える薬剤に対して脆弱であるという欠点ももたらしめている。この脆弱性を利用したがん治療は歴史的に多くの化学療法や放射線治療に利用されている[45]。例えば、プラチナ系抗がん剤のシスプラチンは DNA の鎖間および鎖内架橋を引き起こす薬剤であり、通常 NER によって修復される[68]。また、テモゾロミドは塩

基にアルキル基を結合する薬剤である[69]。

これらの薬剤は以前より使用されており一定の効果を有しているが、DNA に損傷をきたすため正常細胞への副作用も強い。そこで近年、従来の化学療法とは異なる新規の治療標的として DNA の修復を阻害する DDR 関連遺伝子の阻害剤が開発され、PARP 阻害剤が臨床で使用されている。

(iv)PARP 阻害剤

poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)は BER の進行に必須の DNA 結合タンパク質の 1 種で[70]、DNA における SSB を検出すると N 末端の Zn フィンガーを介して切断部の DNA に結合して構造変化を起こし、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) を基質として PARP 自身や DNA 修復関連タンパク質、ヒストンタンパク質、DNA 自体に ADP-リボースを付加する働きをもつ(ADP-リボシル化)。損傷部の DNA やヒストンタンパク質が ADP リボシル化されると染色体構造が変化して損傷部 DNA が露出し、鎖状の ADP リボシル基(poly (ADP-ribose) chain: PAR 鎖)を足場としてほかの DNA 修復に必要なタンパク質(LIG3 や POLB、X-ray repair cross-complementing protein 1(XRCC1)など)がリクルートされ BER が進行する。PARP 阻害剤は PARP を阻害することで BER を阻害する薬剤である。

遺伝性乳がん卵巣がん症候群 (hereditary breast and ovarian cancer syndrome: HBOC) は常染色体優性の遺伝形式を持つ遺伝性疾患で、DDR 関連遺伝子のうち HRR に関するタンパク質である BRCA1 あるいは BRCA2 をコードする遺伝子の変異により乳がん、卵巣がんへの易罹患性を持つ疾患であり [71]、35-64 歳の乳がん女性の約 5% に [72]、卵巣がん患者の 15% に BRCA 変異を認めたと報告されている [73]。BRCA1/2 の変異を有するがん細胞では、DDR において HRR がうまく働かず、主に BER が代替的に作用することで DNA を修復し細胞生存を維持している [74]。(図 4)

図 4

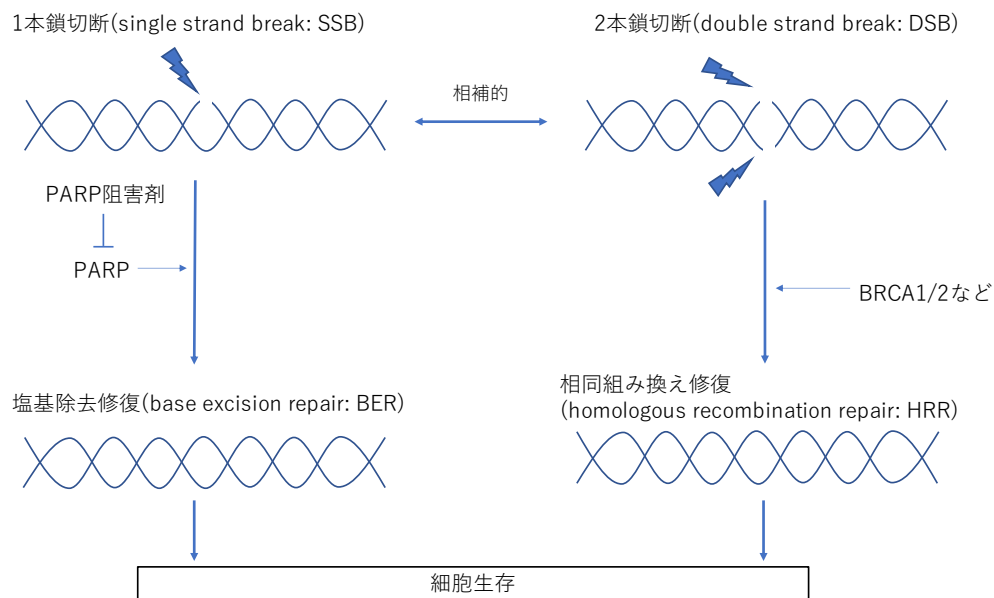


図 4 塩基除去修復(BER)と相同組み換え修復(HRR)による DNA 損傷応答 (DDR)

BRCA1/2 の変異を有するがん細胞では、DDR において HRR がうまく働かず、主に BER が代替的に作用することで DNA を修復し、細胞生存を維持している。

ここに BER の阻害剤である PARP 阻害剤を投与すると、BER と HRR の双方の経路が働かずに DNA 損傷が修復できず、細胞死に至る。このような機序を合成致死(synthetic lethality)と呼ぶ。(図 5)

図 5

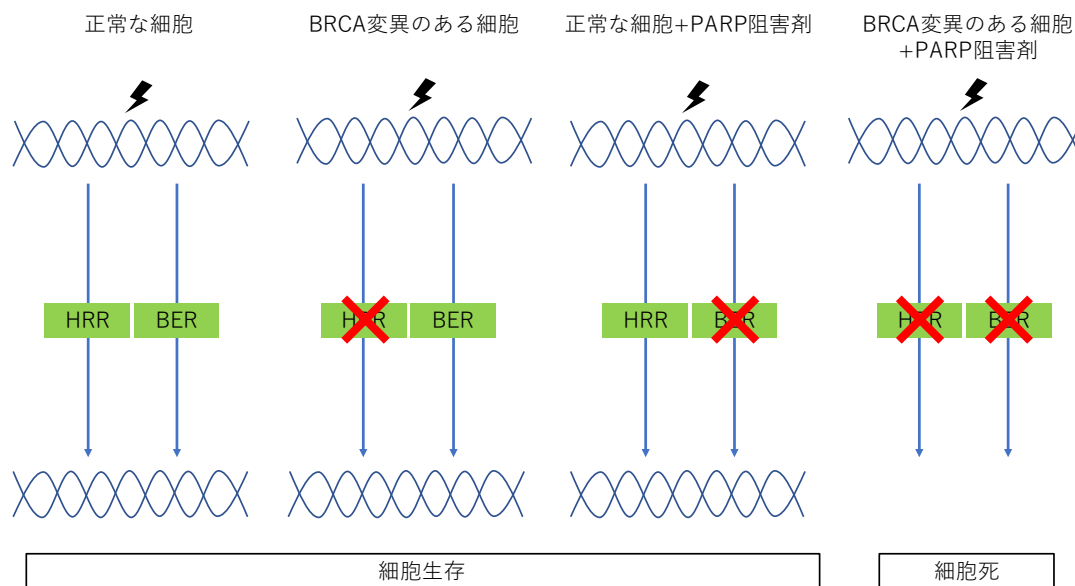


図 5 BRCA1/2 変異のある細胞に対する PARP 阻害剤による合成致死

正常な細胞では DNA 損傷に対して相同組み換え修復(HRR)と塩基除去修復(BER)の 2 つの修復機構が作用し、PARP 阻害剤により BER を阻害しても HRR による修復が行われ細胞は生存する、一方 BRCA 変異のある細胞では HRR が正常に作用しないため BER に依存した DNA 修復が行われるが、PARP 阻害剤により BER が阻害されると DNA を修復できず合成致死が起きる。

初の PARP 阻害剤であるオラパリブは国際第三相臨床試験を経て、BRCA1/2 に変異を有する進行性の卵巣がんに対して 2014 年に承認となり [75]、2018 年には BRCA1/2 変異と HER2 陰性の進行性乳がんに対しても承認となった [76]。

5. CRPC における DDR 関連遺伝子の変異と PARP 阻害剤

III章で概説したような CRPC に対する新規の薬剤の開発により CRPC 患者の予後は改善した一方で、これらの作用機序はいずれも従来の治療の枠を超えるものではなく予後改善効果も限定的であることから新規の作用機序を持つ薬剤の開発が望まれていた。

2011 年に Jarai らは前立腺がんにおいても BRCA1, BRCA2 の変異を有する男性はそれぞれ 2 倍、4-5 倍の前立腺がんリスクを有すると報告し[77]、前立腺がんにおいても DDR を標的とした治療が注目されるようになった。2015 年に次世代シーケンサーを用いて転移性 CRPC の遺伝子変異に関する網羅的解析が行われ、その結果、CRPC 最も変異が多かった遺伝子として AR の増幅を 62.7%に認め、次いで E26 transformation specific (ETS) 融合遺伝子を 56.7%に、p53 の変異を 53.3%に、PTEN の欠失を 40.7%に認めた。これらに次ぐ 5 番目に多い変異として DDR 関連遺伝子の変異を 22.7%に認めた[78]。DDR 関連遺伝子の変異のうち、BRCA2 の変異が 13.3%と最も多く、次いで ATM が 7.3%、CDK12 が 4.7%、CHEK2 が 3.0%、PALB2 が 2.0%、BRCA1 が 0.7%などであった。

これらの結果を受けて HBOC と同様に CRPC に対しする PARP 阻害剤の有効性を評価する臨床試験が複数行われ[79, 80]、BRCA1/2 に変異を持つ

CRPC に対する有効性が認められたことから 2020 年に BRCA1/2 または ATM 変異を有する転移性 CRPC に対してオラパリブが本邦で承認された。

PARP 阻害剤は新規の作用機序を持つ CRPC 治療薬であり、現時点では既存の薬剤に不応性となった CRPC に適応となっているが、今後は既存の薬剤と PARP 阻害剤の併用やより早い段階での PARP 阻害剤の使用など、大きく治療への適応方法が変わっていく可能性がある。(図 6)

図 6

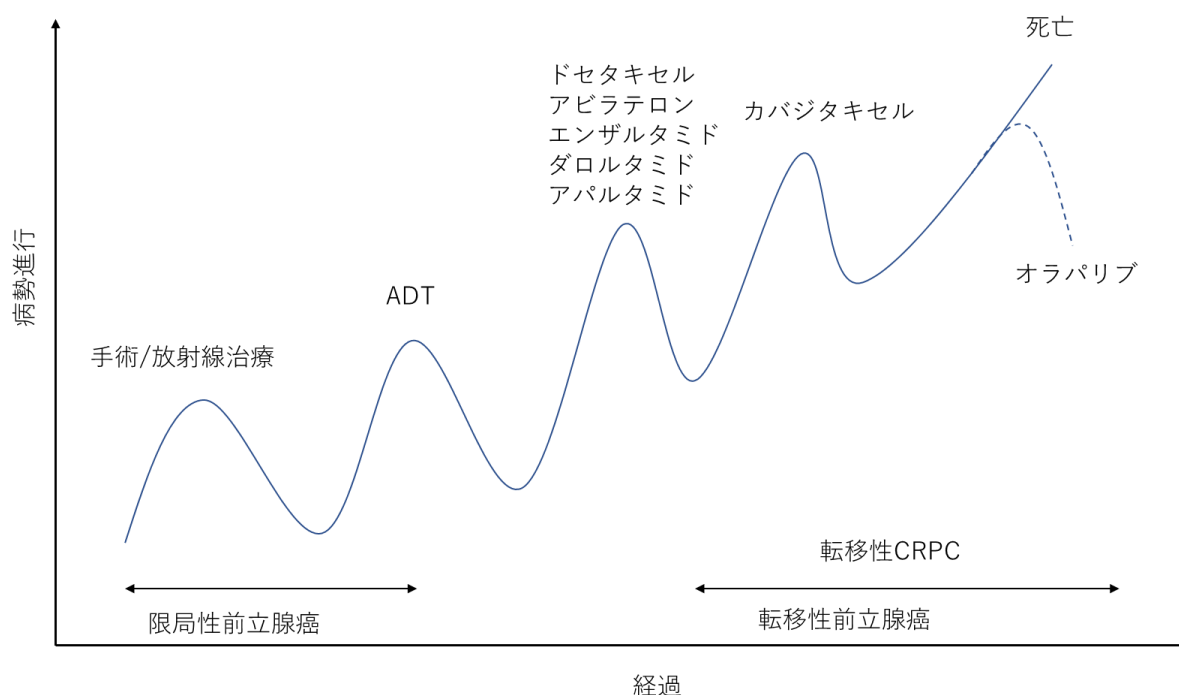


図 6 前立腺がんの進行と治療

限局性前立腺がんは手術や放射線照射による局所治療を行う。局所治療後の再発や診断時に転移を有する症例ではアンドロゲン除去療法 (androgen deprivation therapy: ADT)を行うが一部の症例は抵抗性を示し去勢抵抗性前立腺がん (castration-resistant prostate cancer: CRPC)となる。CRPC に対する薬剤は多数開発されているがいずれも効果は限定的である。2020 年に DNA 損傷修復機構 (DNA damage response: DDR)を標的とした新規薬剤の PARP 阻害剤 (オラパリブ)が使用可能となった。

前述のように CRPC では DDR 関連遺伝子の変異が多く、HR が正常に機能しない細胞が多いと考えられることから PARP 阻害剤を含め代替の SSB 修復経路を阻害する治療は有効と考えられる。HRR の代替経路としては BER 以外に NER や MMR などが想定される。

6. Replication factor C (RFC)の構造と機能

Replication factor C subunit (RFC)は DNA 合成を行う DNA ポリメラーゼのプライマー認識因子であり、DNA 複製、MMR や NER などの DNA 修復、テロメアの維持、細胞増殖や細胞周期チェックポイントの制御など、生体内で重要な役割を担っている[81]。RFC は 5 つのタンパク質の複合体であり、大サブユニットの RFC1(140 kDa)、と 4 つの小サブユニットの RFC2-5 (RFC2(40 kDa)、RFC3(38 kDa)、RFC4(37 kDa)、RFC5(36 kDa)) から構成され、それぞれのタンパク質をコードする遺伝子は 4p13-p14、 7q11.23、 13q12.3-q13、 3q27、 12q24.2-q24.3 に存在する[82, 83]。RFC の各サブユニットは円形に配列され、RFC1 と RFC5 の間には間隙がある[84]。RFC1-5 は互いに相同性のある領域を持ち[85]、この相同性の高い領域は ATPases associated with diverse cellular activities (AAA+)領域と呼ばれ、この領域を持つタンパク質は AAA+ファミリーと呼ばれ多くは円形の 6 量体を形成し(RFC は例外的に 5 量体) [86]、AAA+タンパク質は複製のプロセスに関与するものが多数存在する(cc6/cdc18、Mcm2-7 ヘリカーゼなど)。AAA+領域は N 末端側に WalkerA/B モチーフと呼ばれる構造を含む ATPase 活性を持つドメインとその C 末端側に 4 本の α ヘリックスを含む球状ドメインの 2 つのドメインをコードしており、これらは ATP 結合部位を形成する[87]。(図 7)

図 7

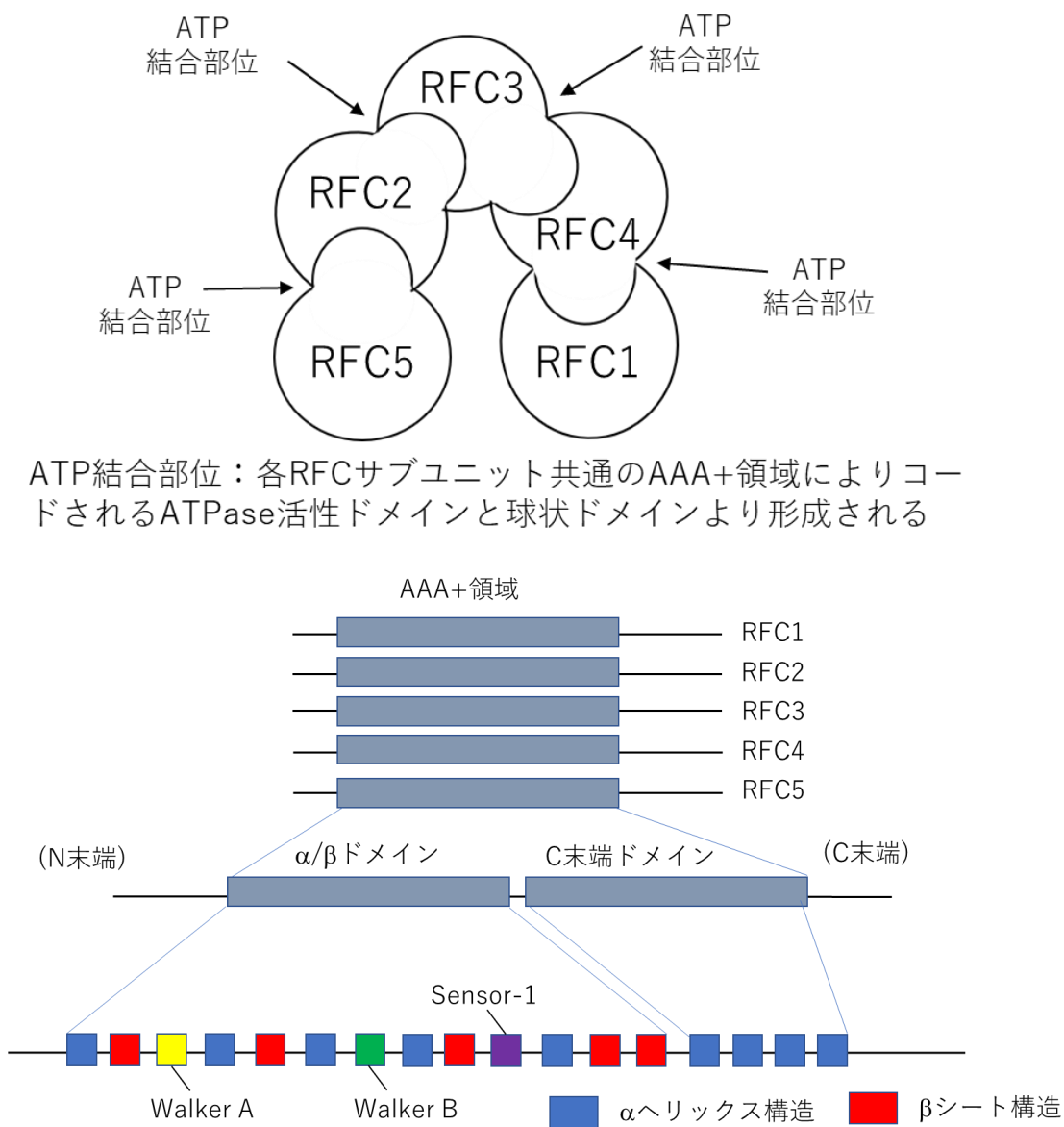


図 7 Replication factor C subunit(RFC)の構造

RFC は RFC 1 (140 kDa)、RFC2(40 kDa)、RFC3(39 kDa)、RFC4(38 kDa)、RFC5(37 kDa)の 5 つのタンパク質の複合体で、RFC1 と RFC5 の間には間隙がある。RFC1-5 は互いに AAA+領域と呼ばれる相同性のある領域を持ち、

AAA+領域は N 末端側の ATPase 活性を持つドメインと C 末端側の球状のドメインをコードし、各サブユニットの界面に存在し ATP 結合部位を形成する。

DNA 複製や DNA 損傷修復の際には、2 重らせん構造がほどかれ、複製や修復のためのタンパク質が多数集まるフォークを形成する(図 8)。ここで中心的な役割をもつのがリング状タンパク質の PCNA であり[88]、RFC に ATP が結合すると RFC は N 末端側にある PCNA interacting peptide(PIP)モチーフを介して PCNA と結合してこれを開環させる[89, 90]。開環した PCNA-RFC 複合体は DNA に結合し、その後 RFC は ATP を加水分解して PCNA から外れ、DNA の複製や修復が進行する。PCNA はホモ三量体であるため各サブユニットに 1 つずつタンパク質結合部位を持ち DNA ポリメラーゼやその他の関連タンパク質と結合することでフォークを形成し複製や修復が進行する。

図 8

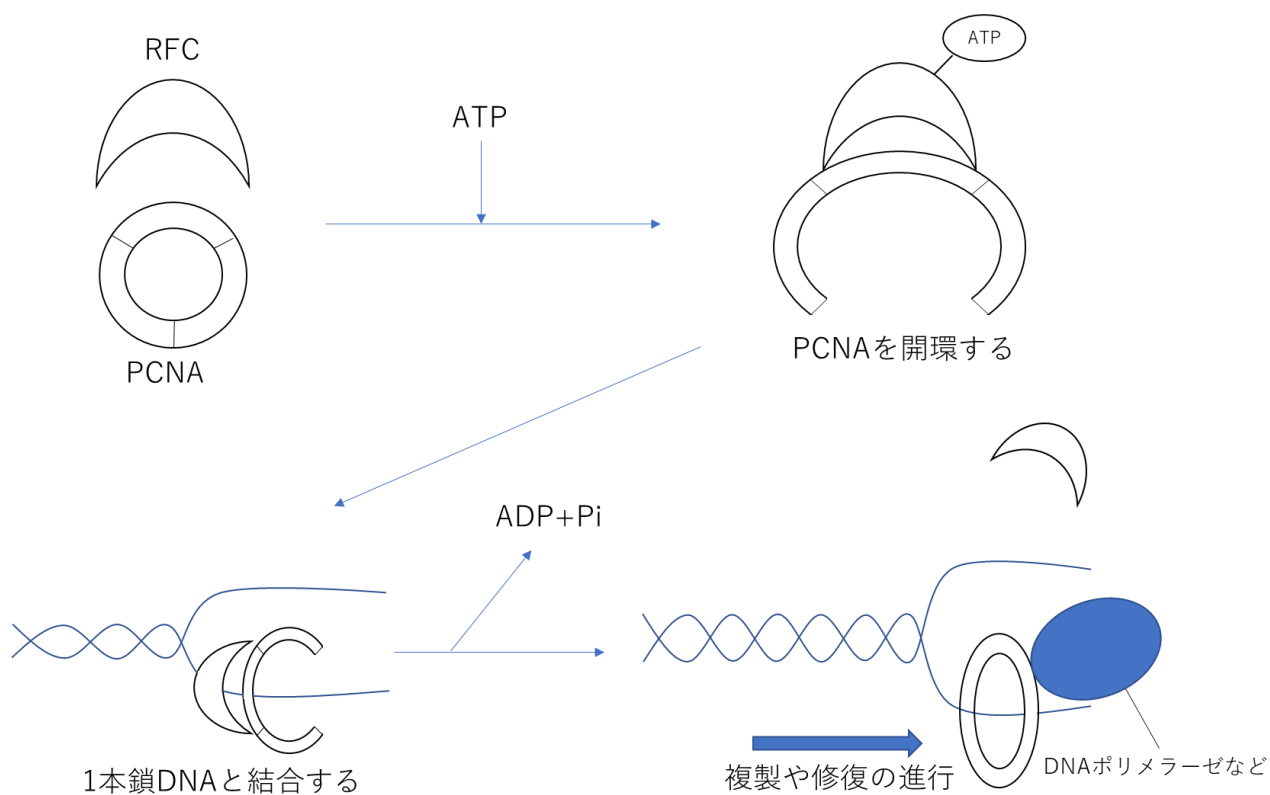


図 8 RFC と PCNA の相互作用による DNA 複製/修復フォークの形成

RFC は ATP 結合部位を持ち、ATP が結合することでリング状の 3 量体タンパク質である proliferating cell nuclear antigen (PCNA) に結合しこれを開環させる。開環した PCNA は 1 本鎖 DNA と結合し、RFC は ATP を加水分解して PCNA から外れる。PCNA は 3 か所のタンパク質結合部位によりクランプとして働き、複製や修復に関するタンパク質とともにフォークを形成する。

7. 他臓器原発のがんでの RFC の発現に関する報告

RFC 各サブユニットの遺伝子はいくつかのがん種において発現が上昇していることが報告されている。RFC1 は RFC2-5 の小サブユニットとは異なり、がんにおける発現上昇の報告は少ないが、Fung らは鼻咽頭がんにおいては正常鼻咽頭組織と比較して RFC1 の mRNA 発現量が有意に多かったと報告している[91]。RFC2 は直腸がん[92]、上咽頭がん[93]などにおいては正常組織と比較してがん組織では RNA レベルでの発現上昇がみられることが報告されている。RFC3 は急性骨髄性白血病[94]や卵巣がん[95]、乳がん[96]などで、RFC4 は舌がん[97]や胃がん[98]などで、RFC5 は頭頸部がん[99]などで RNA レベルの発現上昇が報告されている。

以上のように RFC の各サブユニットががん組織で発現上昇しているという報告は多く認められ、前立腺がんにおいても RFC4 や RFC5 などの発現上昇の報告はあるが[100]、前立腺がんにおける RFC2 の機能や CRPC への進展との関連については未だに解明されていない。

8. 本研究の目的

東京都健康長寿医療センター研究所 高山らは前立腺がんから CRPC への進展に関わる分子機序の解明のため、良性前立腺組織、限局性前立腺がん (Pca) 組織 (ホルモン感受性)、CRPC 組織より RNA を抽出し、RNA sequencing (RNA-seq) 法により、それぞれの組織特異的な転写産物の包括的解析を行った[101]。そこで RNA-seq の解析の結果から DDR 関連遺伝子群の重要性が示唆された。このことを基にして私は RFC2 を含む DDR 関連遺伝子の CRPC における役割に注目し、各種スクリーニングを行い、新たなバイオマーカーや治療標的となりうる遺伝子を探索することを目的として研究を行った。

第2章 材料および実験方法

1. 細胞培養

本研究では Lonza Bioscience (Lonza, Basel, Switzerland) より購入した正常前立腺上皮初代培養細胞として PrEC と、American Type Culture Collection (ATCC)より購入した正常前立腺細胞株 RWPE、アンドロゲン受容体陽性前立腺がん細胞株 LNCaP、アンドロゲン除去下で LNCaP を9か月以上培養することで樹立した CRPC モデル細胞の long-time androgen-deprived (LTAD)[101]、CRPC 細胞株 PC3, DU145, 22Rv1 細胞を用いた。すべての細胞は2019年に Short Tandem Repeat (STR) 解析 (BEX co. Ltd., Tokyo, Japan) により細胞株の確認を行った。またマイコプラズマの汚染がないことを Mycoplasma Detection Kit (Jena Bioscience, Jena, Germany) で確認した。

すべての細胞は 37°C、5% CO₂ の条件下で培養し、PrEC 細胞は PrEBM Prostate Epithelial Cell Growth Medium Bulletkit (Lonza)を、RWPE、LNCaP、LTAD、PC-3、DU145、22Rv1 は Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、LTAD ではフェノールレッドを含まない RPMI に 10% Fetal bovine serum (FBS) (LTAD ではチャコール/デキストラン処理した FBS)、50 U/mL ペニシリン、50 µg/mL ストレプトマイシンを

加えたものをメディウムとして使用した。

2. Small interfering RNA (siRNA)

siRNA を細胞内に導入して標的とする遺伝子の発現抑制を行った。コントロール siRNA と DDR 関連遺伝子の siRNA を Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)より購入した。(siRFC2 #1: s11944, siRFC2 #2: s11945, siRFC2 #3: s11946, siRFC4: s11952, siLIG1: s8173, siPOLD1: s616, siPOLE4: s32216) RNASEH2A に関しては siDirect (<http://rna.co.jp/>) を用いて siRNA 配列の設計を行った。siRNA の細胞内への導入は Lipofectamine RNAi MAX (Thermo Fisher Scientific) を用いてプロトコールに従って行った。以下に使用した siRNAaseH2A の配列を示す。

siRNASEH2A S: 5'-CAGCAUCCGAGAAUCAGGAGG-3'

siRNASEH2A AS :5'-UCCUGAUUCUCGGAUGCUGAG-3'

3. 細胞増殖能の解析

実験に使用する細胞を 1000 個ずつ 96 穴プレートに播種し、24 時間後に siRNA での遺伝子発現の抑制を行った。Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) を用いて 3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)2H-

tetrazolium, inner salt (MTS) assay により細胞増殖の検討を行った。siRNA 添加後 24、72、120 時間後に 10 μ l ずつ試薬を添加し、1 時間後に吸光度を測定した。解析は各群 6 well ずつ行い、平均値と標準偏差を計算し評価した。

4. RNA の抽出と定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: qRT-PCR)

Total RNA の抽出は ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いてプロトコールに則り行った。complementary DNA (cDNA)は PrimeScript (TAKARA bio, Kyoto, Japan)を用いてプロトコールに則り行った。Applied Biosystems Step one plus real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific)を用いて、KAPA SYBR Green (KAPA Biosystems, Boston, MA, USA)で定量的 PCR 法により mRNA 発現量の定量を行い、発現レベルは Δ Ct 法を用いて計算し GAPDH の発現量を用いて補正を行った。以下に qRT-PCT に用いた各プライマーの配列を示す。

GAPDH forward: 5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3'

GAPDH reverse: 5'-GTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'

RNASEH2A forward: 5'-TGGCAGTTCGTGGAGAACT-3'

RNASEH2A reverse: 5'-TAACATCTTCCGCCTC-3'

RFC2 forward: 5'-TCCGGTACACAAAGCTGACC-3'

RFC2 reverse: 5'-GGCTCGTCACAGACCTTGAA-3'

RFC4 forward: 5'-AAGTCGCTCAGATGGGAAGC-3'

RFC4 reverse: 5'-TCTGACAGAGGCTTGAAGCG-3'

LIG1 forward: 5'-GGAATGGAGTGGTGTCCGAG-3'

LIG1 reverse: 5'-TGGGAGAGGTGTCAGAGAGG-3'

POLD1 forward: 5'-ATCCGGTTCATGGTGGACAC-3'

POLD1 reverse: 5'-GGCTCAGGGAAGATGCCTTT-3'

POLE4 forward: 5'-GAGGGACCTGCTGGGGAG-3'

POLE4 reverse: 5'-AGCGCAACAGTAGGCATCTT-3'

5. Western blot 法

培養細胞に 1%のプロテアーゼ阻害剤 (Nacalai Tesque)を添加した NP40 バッファー (50 mmol/L Tris-HCl [pH 8.0], 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40)を加えて溶解し、タンパク質の抽出を行った。BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて抽出したタンパク質濃度を測定し、サンプル間でタンパク質濃度が等しくなるよう NP40 バッファーで希釈した。Sodium Dodecyl sulfate (SDS)サンプルバッファーを加えて 100°Cで 5 分間加熱し、10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。その後 Immobilon-P Transfer Membranes (Merck Millipore, Burlington, MA, USA)へ転写し、Blocking one (Nacalai Tesque)で 1 時間ブロッキングを行い、TBS-T(0.1% Tween 20)で洗浄後(5 分、1 回)、1 次抗体を 4°Cで 1 晩反応させた。一次抗体は抗 RFC2 抗体 (ab251796 [Abcam, Cambridge, UK])300 倍、抗 β -actin 抗体 (Wako)1000 倍、抗 cleaved PARP 抗体 (ab32064[Abcam])1000 倍、抗 γ H2Ax 抗体 (ab11174[Abcam])1000 倍に希釈して使用した。その後 TBS-T で洗浄し(5 分、

3 回)、TBS-T で 6000 倍に希釈した 2 次抗体を 1 時間反応させ、ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific)を用いて反応させた。シグナルの検出には Fusion Solo 7s (VILVER, Marne-la-Vallee cedex, France)を用いた。

6. 臨床検体の入手

qRT-PCR による解析を行うために、自治医科大学医学部附属病院および東京大学医学部病院で行われた根治的前立腺全摘除術、経尿道的前立腺切除術および前立腺生検から、良性前立腺 (Benign) 組織 (N = 9)、限局性前立腺がん (Pca)組織 (N = 9)、去勢抵抗性前立腺がん (CRPC)組織 (N = 11) を入手し RNA を抽出して使用した。また、免疫組織化学的な解析を行うために、東京大学病院において 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症例 103 例を対象として年齢や PSA、病理学的所見や予後などの臨床情報を遡及的に調査した。さらに、自治医科大学医学部附属病院より経尿道的前立腺切除術および前立腺生検により Benign 組織 (N = 12)、CRPC 組織 (N = 15) を入手した。組織切片はホルマリン固定した組織標本より 6 μ m 厚のパラフィン切片を作成し実験に使用した。CRPC 症例においては ADT 開始から

CRPC 診断までの期間(Time to CRPC)を遡及的に調査した。CRPC への移行は血清テストステロン値が 50 ng/dL 未満にもかかわらず、①血清 PSA 値が 2.0 ng/mL 以上で、1 週間以上の間隔で測定した PSA 値が 3 回連続上昇し、最低値から 50%以上の上昇を認める場合、②もしくは画像上の増悪や新規病変の出現を認める場合、と定義した。本研究は、ヘルシンキ宣言に基づいて実施され、自治医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会 (No.19-14)、東京大学倫理委員会 (No.G10044)、東京都健康長寿医療センター研究倫理委員会(No. 1183)の承認を得た。すべての患者にインフォームドコンセントを行い、書面による同意を得た。対象者の同意を得ることが不可能な既存の検体を用いる場合は個人情報と連結可能匿名化して扱うことで倫理委員会の承認を得た。

7. 組織免疫染色

プレパラートを Histo-clear (コスモバイオ,Tokyo, Japan)、100%, 95%, 70%のエタノールに順次浸して脱パラフィン後、0.2% Tween20 添加トリス緩衝生理食塩水 (Tris-Buffer Saline with Tween 20: TBS-T)で洗浄した。pH6.0 に調整したクエン酸バッファー (2 mM クエン酸無水和物+ 9 mM クエン酸三ナトリウム二水和物)に浸し、121°C、15 分のオートクレーブ処理で抗原の賦活化を行った。プレパラートの温度が室温に下がったことを確認し、TBS-T で洗浄後、

BLOXALL (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を滴下して 10 分間内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った。2.5%ウマ血清アルブミンで 20 分間ブロッキングを行い、ウマ血清アルブミンで 100 倍に希釈した RFC2 抗体を 4°C で一晩反応させた。翌日 TBS-T で洗浄し、ImmPRESS Excel Amplified HRP Polymer Staining Kit (antirabbit IgG kit: MP7601; Vector Laboratories)を用いてプロトコールに則り 2 次抗体反応を行った。抗原抗体複合体は 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB) 溶液 (1 mM DAB, 50 mM Tris HCl buffer, pH 7.6, 0.006% H₂O₂)により 5 分間発色させ、反応は精製水により停止させた。70%, 95%, 100%エタノール、Histo-clear に順次浸して脱水、透徹を行い、カバーガラスで封入した。

8. 免疫組織学判定基準

各プレパラートにおいて染色された細胞の染色強度を 0 から 3 の 4 段階 (0: 陰性、1: 弱陽性、2: 中等度陽性、3: 強陽性)で、染色範囲を 0 から 5 の 6 段階 (0: 染色なし、1: 1%未満、2: 1%以上 10%未満、3: 10%以上 33%未満、4: 33%以上 66%未満、5: 66%以上)で判定し 2 つの点数の合計を 0~8 点でスコア化しこれを IR スコアと定義した。2 人の観察者がそれぞれ評価を行い、評価が分かれた場合には 3 人目の評価者が判定を行いその結果を最終結果とした。

RFC2 の免疫染色性は、IR スコアが 4 以上の場合に「高」とした。IR スコアの中央値は 3、平均値は 3.1 であったため、4 点をカットオフとした。免疫染色にはウェスタンブロット法で使用したものと同じ RFC2 の抗体を使用した。

9. 統計学的検討

統計解析には Microsoft Excel (©Microsoft) および GraphPad Prism version 9.0 (©GraphPad Software, Inc.) を使用した。qRT-PCR や MTS assay では Student's t-test および Tukey's multiple comparison test , Dunnett's multiple comparisons test を用いて統計学的検討を行った。免疫組織学的な RFC2 の発現量と各臨床パラメータとの相関は Mann-Whitney U test および Fisher's exact test を用いて統計学的検討を行った。RFC2 高発現群と低発現群における無増悪生存期間やがん特異的生存率の比較には log-rank test を使用した。また Cox 比例ハザードを用いて免疫組織学的な RFC2 の発現量、PSA、臨床病期および Gleason score とがん特異的生存率の相関に関して単変量、多変量解析を行った。 P 値 < 0.05 で統計学的に有意とみなした。

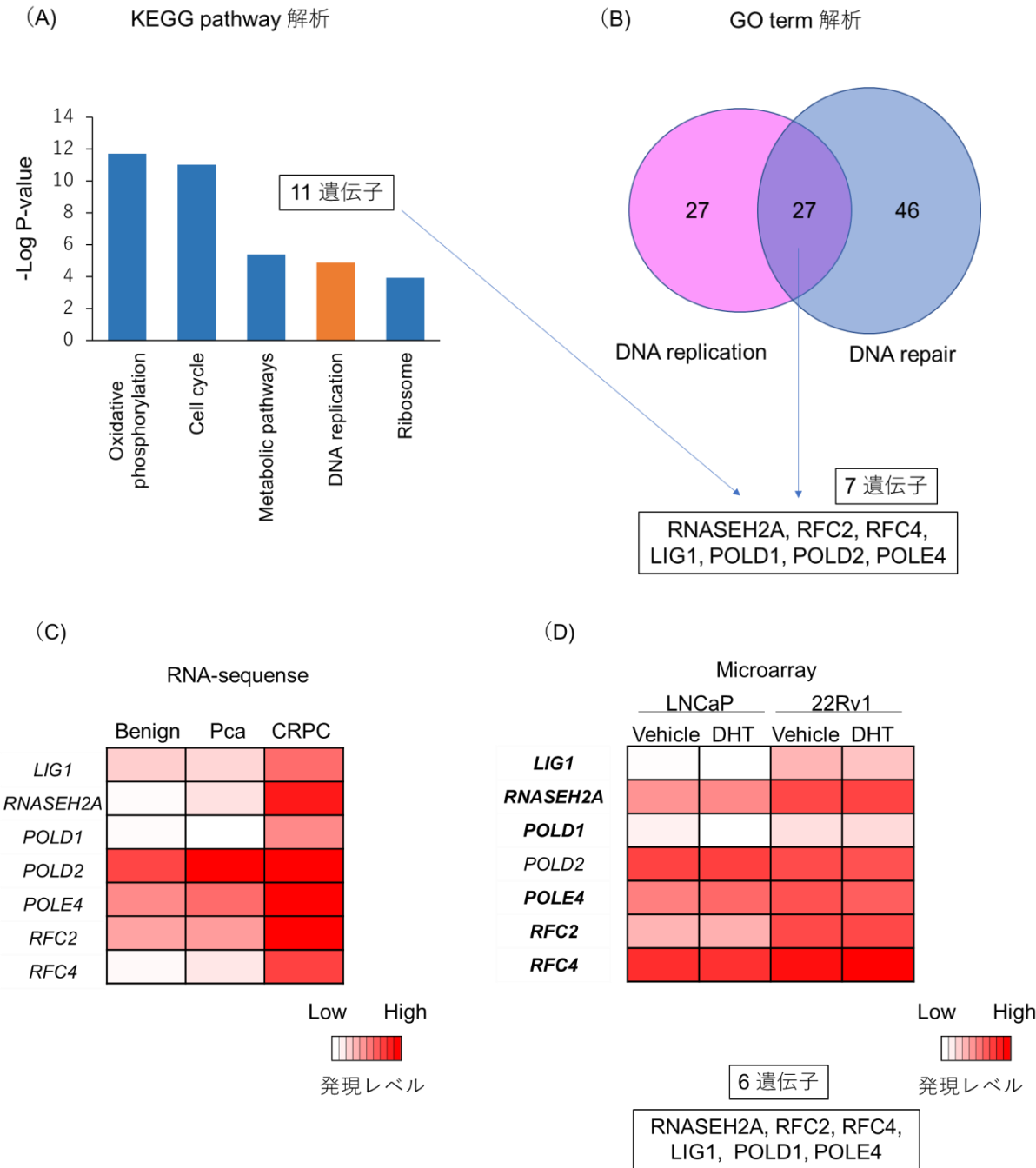
第3章 結果

1. DDR 関連遺伝子は CRPC において発現上昇がみられる

東京都健康長寿医療センター研究所 高山らが行った、良性前立腺 (Benign)組織、限局性前立腺がん (Pca) 組織、去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) 組織由来の RNA を用いた RNA-seq の結果から[101]、Pca 組織と比較して CRPC 組織で発現上昇がみられた 919 遺伝子を抽出した。さらにこれらの遺伝子に対して Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway 解析 (図9A)を行ったところ、DDR に関わる DNA replication に関わる遺伝子の濃縮を認めた。そこで DDR シグナルに注目し、Gene ontology (GO) term 解析 (図9B)も行い、KEGG 及び GO term 解析の双方で発現が上昇していた DDR(DNA repair と DNA replication)に関わる 7 遺伝子を抽出した。これら 7 遺伝子の RNA-seq の結果を図9Cに示す。さらに、我々が以前行なった AR 陽性 CRPC 細胞株の 22Rv1 とホルモン感受性前立腺がん(hormone sensitive prostate cancer: HSPC)細胞株の LNCaP より RNA を抽出して行ったマイクロアレイ解析の結果[102]を用いて、これらの 7 遺伝子発現に関する解析を行い (図9D)、LNCaP と比較して 22Rv1 において発現上昇が見られた 6 遺伝子 (*RNASEH2A*, *RFC2*, *RFC4*, *LIG1*, *POLD1*, *POLE4*)を前立腺がんの進行に関連

するバイオマーカーの候補遺伝子として同定した。(図 9 E)

図 9



(E)

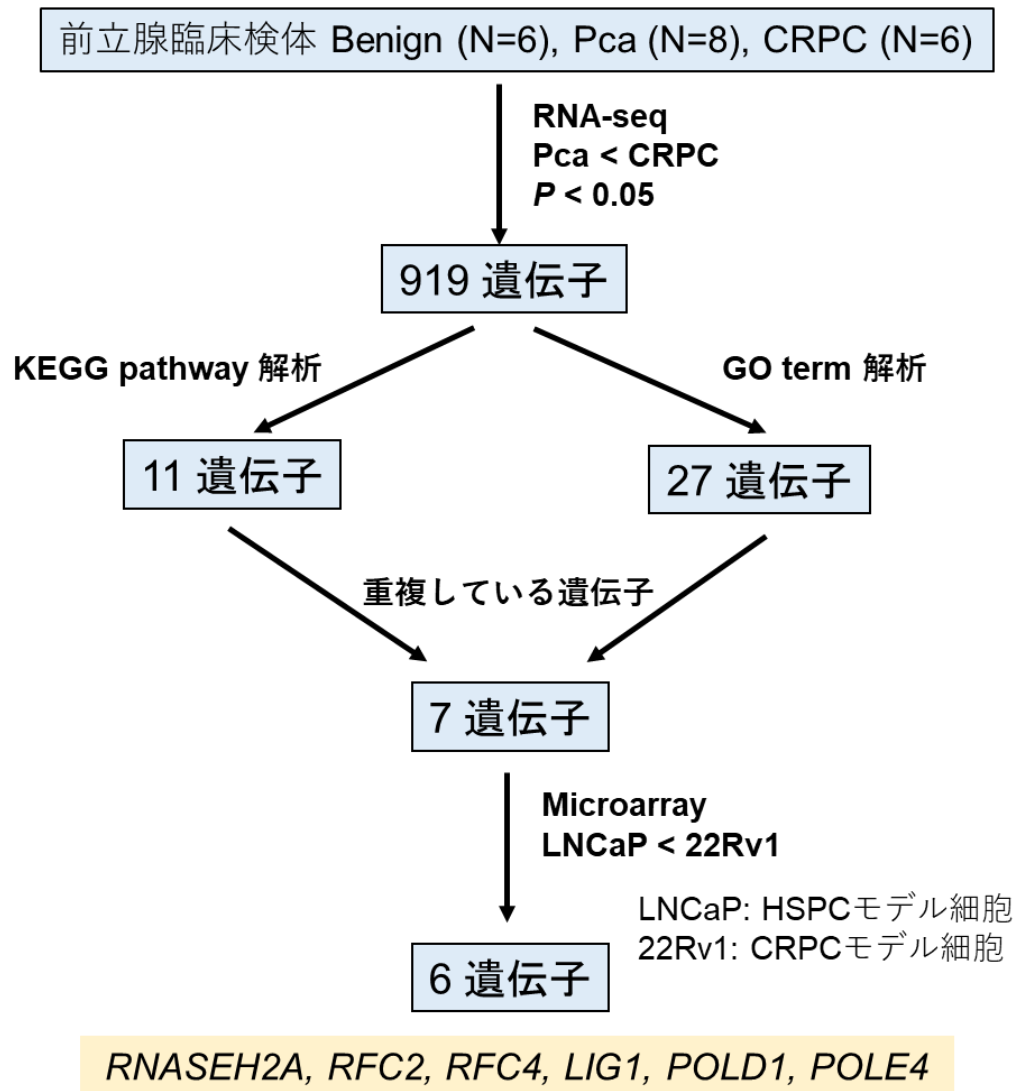


図9 CRPCにおいて発現上昇するDNA damage response (DDR)関連遺伝子群の抽出

(A, B) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics (KEGG) パスウェイ解析

(A) および Gene Ontology (GO) 解析 (B) で、限局性前立腺がん (Pca)

と比較して去勢抵抗性前立腺がん (CRPC)で発現が上昇した 919 遺伝子

(Mann-Whitney U test で $P < 0.05$ の遺伝子を抽出) の解析を行い、DDR (DNA 修復、DNA 複製) に関連する 7 遺伝子を抽出した。(C) (A)、(B)で抽出した 7 遺伝子の良性前立腺 (Benign) 組織(N = 6)、Pca 組織(N = 8)、CRPC 組織 (N = 5) における RNA-seq における遺伝子発現をヒートマップで示す。発現量の解析には、RNA-seq データ (Japanese Genotype-phenotype Archive (JGA) アクセションコード JGAS00000000198) を使用し、RNA-seq の結果を Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads (RPKM) により正規化した。(D) ホルモン感受性前立腺がん (hormone sensitive prostate cancer: HSPC)細胞株 LNCaP および CRPC 細胞株 22Rv1 における DDR 関連遺伝子の発現レベル。LNCaP 細胞および 22Rv1 細胞におけるマイクロアレイ解析の結果をヒートマップで示す。(E) CRPC において発現上昇がみられる DDR 関連遺伝子群の抽出の概要

2. 公共データベースを用いた CRPC における DDR 関連遺伝子発現と予後に 関する解析

次に、これら 6 つの候補遺伝子の発現量を公共データベースを用いて解析した。まず、Gene expression database of Normal and Tumor tissues 2 (GENT2) のデータベースを用いて gene expression omnibus (GEO) の GPL96/HG-U133A のデータセットで Benign と Pca における DDR 関連遺伝子の発現量を調べたところ、*RFC2* のみで Benign と比較して Pca で発現の上昇を認めた (図 10)。次に、ONCOMINE データベース (<https://www.oncomine.org>) を用いて Benign, Pca, 転移性 CRPC (metastatic CRPC: mCRPC) における DDR 関連遺伝子の発現量を比較した。Benign、Pca、mCRPC の 3 群間の比較が可能な GEO の 3 つのデータセット (GSE3325、GSE35988、GSE6919) を用いて解析を行った結果、*RNASEH2A* はすべてのデータセットにおいて Pca と比較して mCRPC で有意に発現が上昇していた。また、*RFC2*、*RFC4*、*LIG1*、および *POLD1* は、2 つのデータセットで Pca と比較して mCRPC で有意に発現が上昇していた。一方 *POLE4* はどのデータセットでも mCRPC における発現上昇は見られなかった (図 11A-D)。さらに、Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2) (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) を用いて、TCGA のデータセットにおける前

立腺がんの全生存期間 (overall survival: OS) と生化学的制御率 (biochemical failure-free survival: BFFS) と DDR 関連遺伝子の発現との関係を評価した。各 DDR 関連遺伝子の発現量の上位 25% と下位 75% の 2 群に分けて比較したところ、*RNASEH2A* ($P = 0.00013$)、*RFC2* ($P = 2.1\text{e-}05$)、*RFC4* ($P = 0.00094$)、*LIG1* ($P = 0.0011$) および *POLD1* ($P = 0.00019$) の高発現群は低発現群と比較して優位な BFFS の短縮を示した (図 12A)。さらに、*RFC2* の高発現は OS の短縮とも有意に相関していた ($P = 0.0056$) (図 12B)。一方、*POLE4* の高発現は、OS ($P = 0.53$) の短縮とも DFS ($P = 0.09$) の短縮とも相関しなかった (図 12A, B)。

図 10

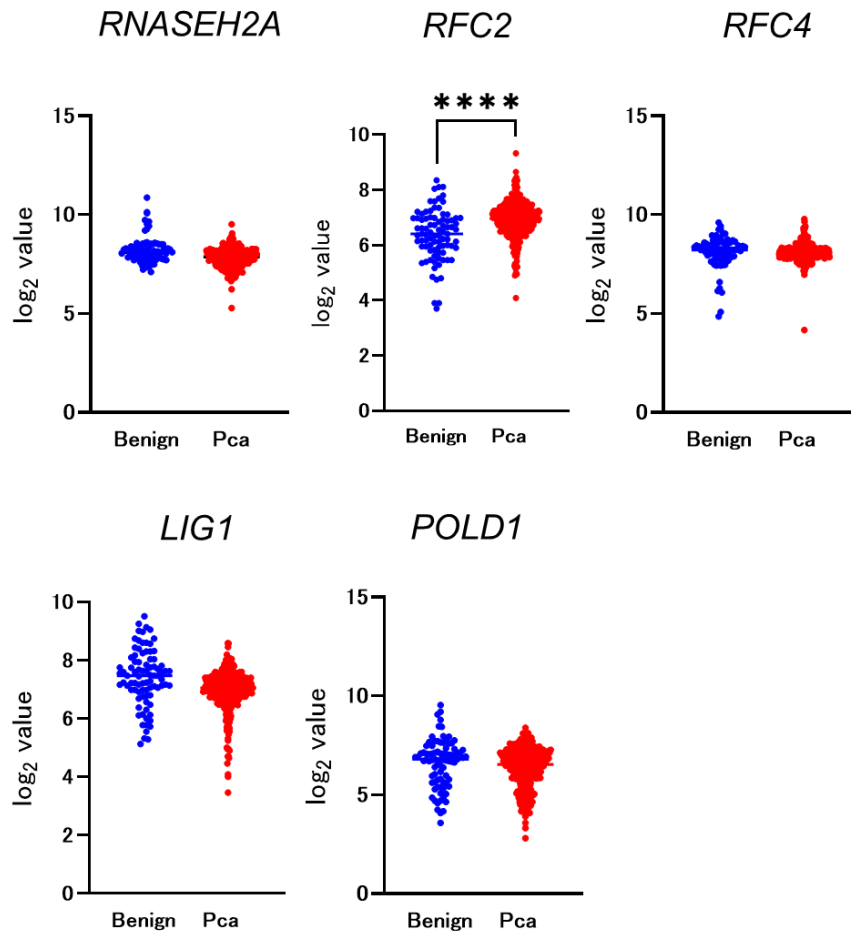
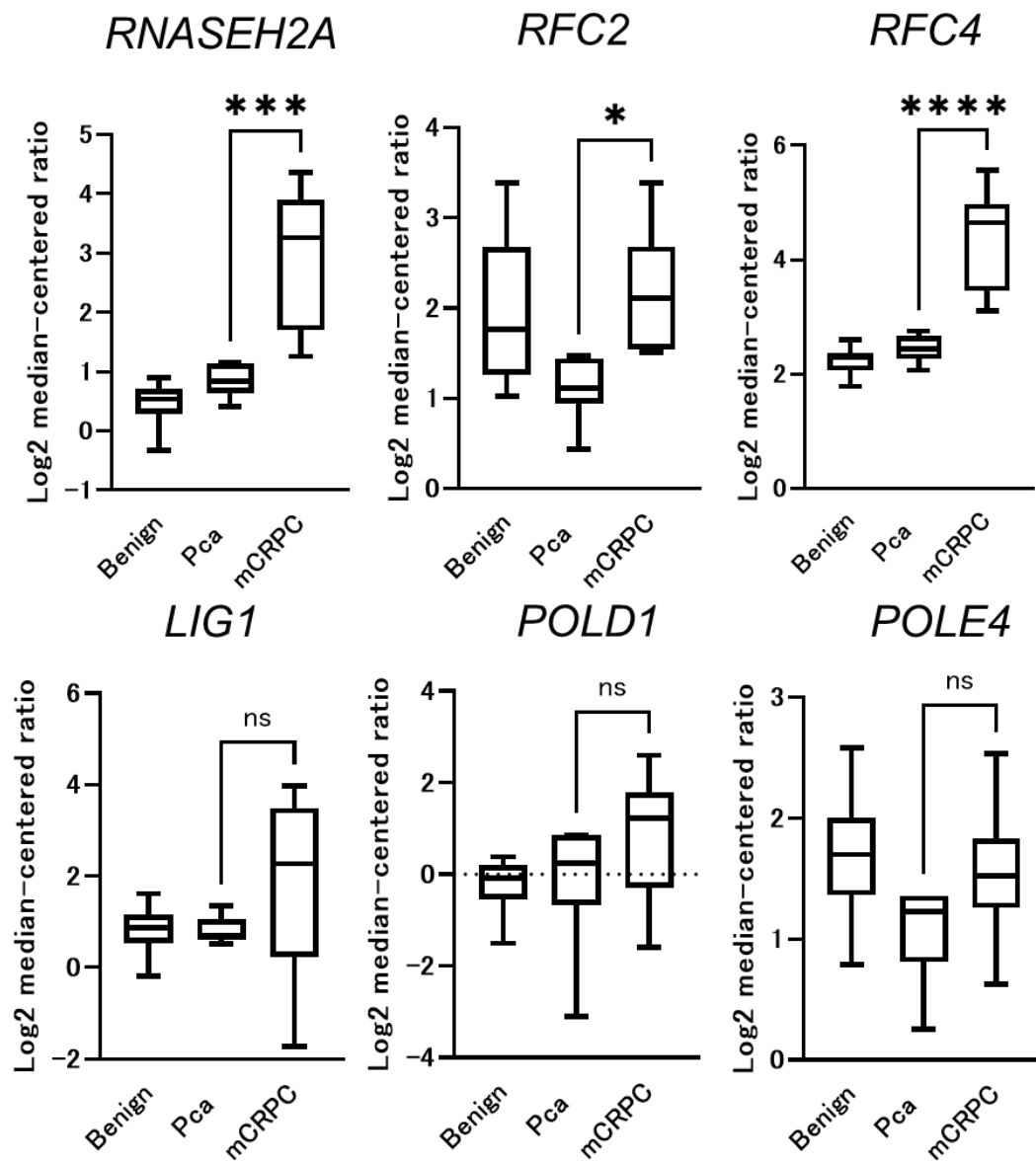


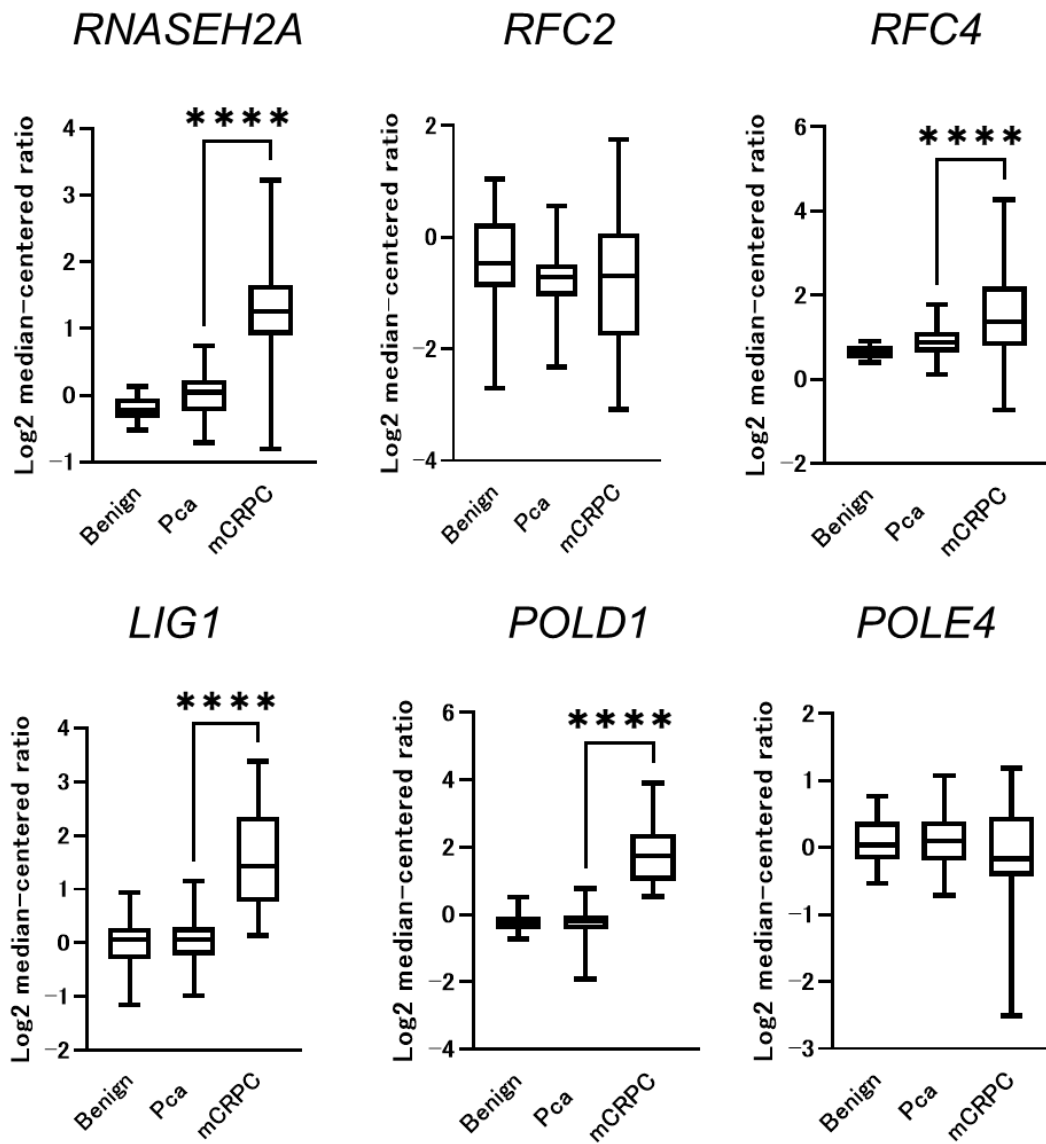
図 10 Gene expression database of Normal and Tumor tissues 2 (GENT2)を用いた正常前立腺(Benign)組織と前立腺がん(Pca)組織における DDR 関連遺伝子の発現量の比較

Gene expression omnibus (GEO)の HG-U133A のデータセットを用いて Benign と Pca における DDR 関連遺伝子の発現量を調べた。青は Benign、赤は Pca でありドットプロット図で示す。Mann-Whitney U test により統計解析を行い P 値 < 0.05 を有意差ありと判断した。**** $P < 0.0001$

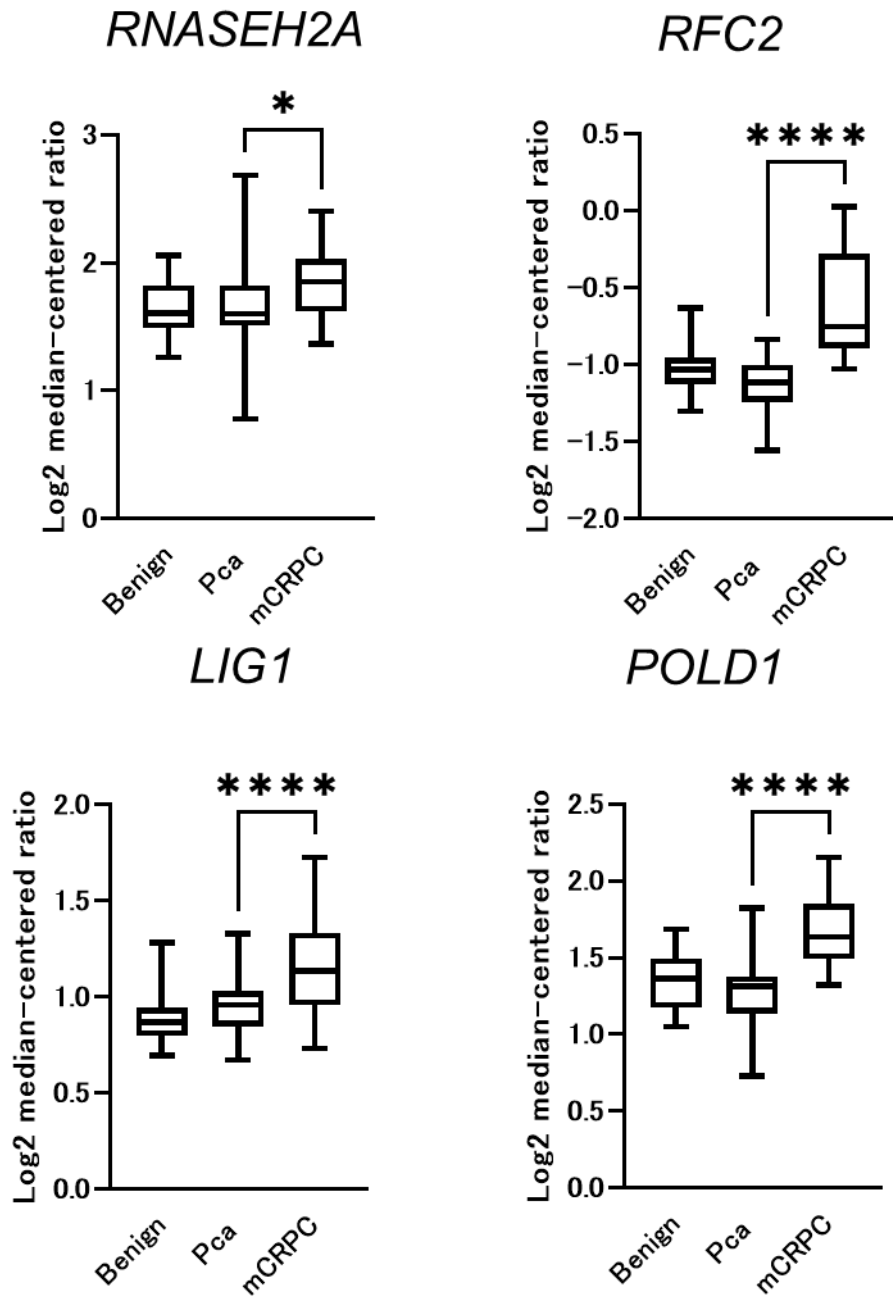
(A) Varambally dataset



(B) Grasso dataset



(C) Yu dataset



(D)

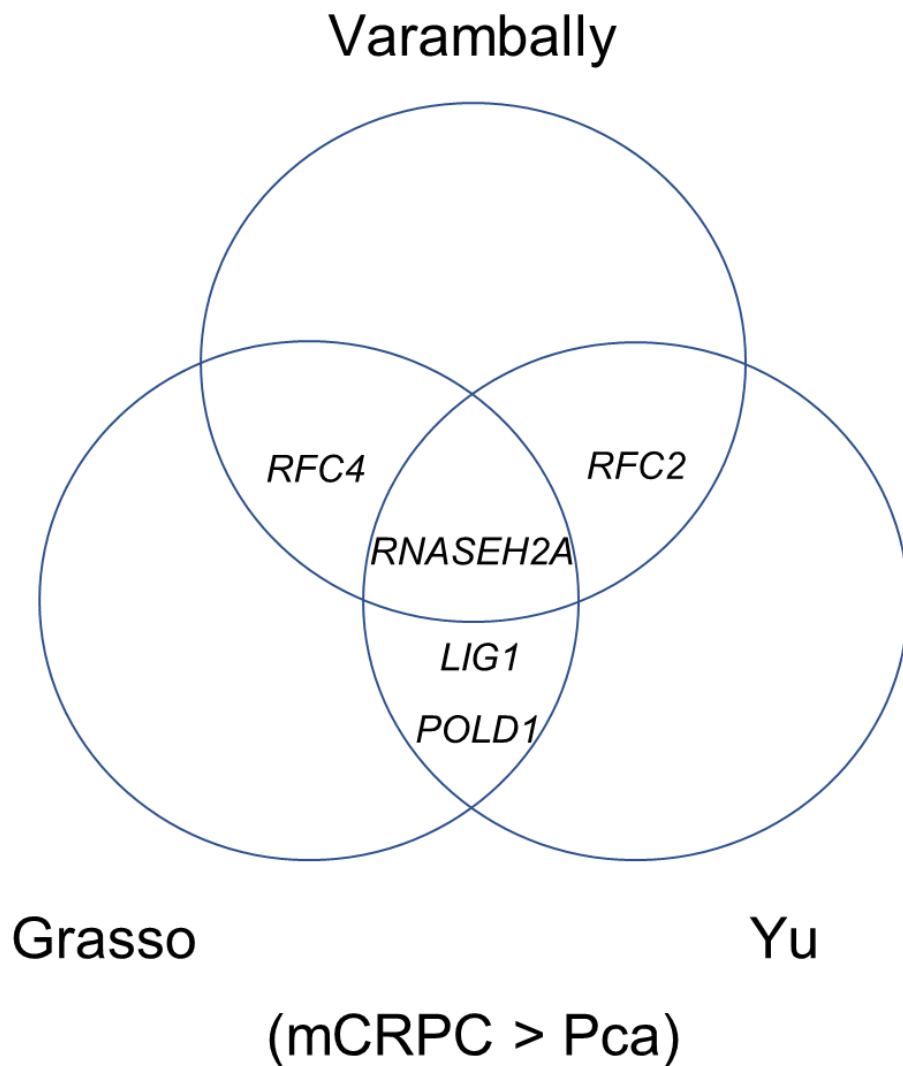
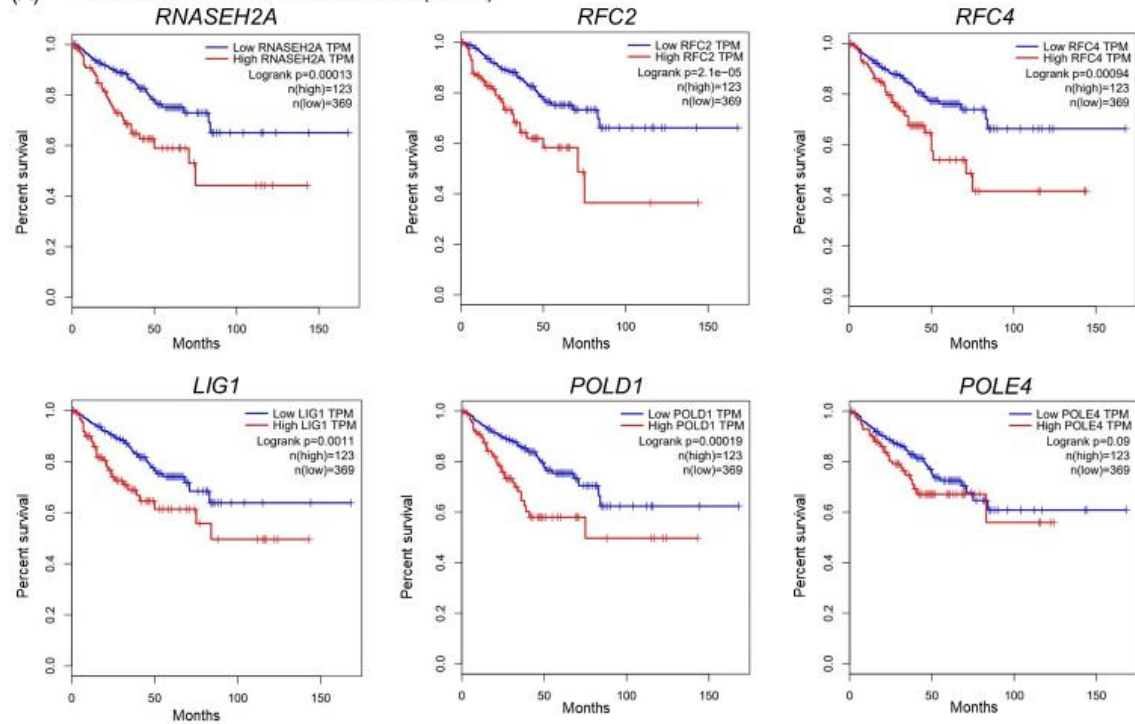


図 11 Oncomine を用いた正常前立腺組織(Benign)と前立腺がん組織(Pca)、転移性去勢抵抗性前立腺がん組織(metastatic CRPC: mCRPC)における DDR 関連遺伝子の発現量の比較

(A-C) Gene expression omnibus(GEO)の3つのデータセット (GSE3325(A)、GSE35988(B)、GSE6919(C)) を用いて DDR 関連遺伝子の3群における発現

量を比較した。グラフは平均値±標準偏差で示す。Mann-Whitney U test により統計解析を行い P 値 < 0.05 を有意差ありと判断した。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$, ns; not significant. (D) (A-C)で Pca と比較して mCRPC で有意な発現上昇がみられた DDR 関連遺伝子をベン図で示す。

(A) Biochemical Failure-Free Survival (BFFS)



(B) Overall Survival (OS)

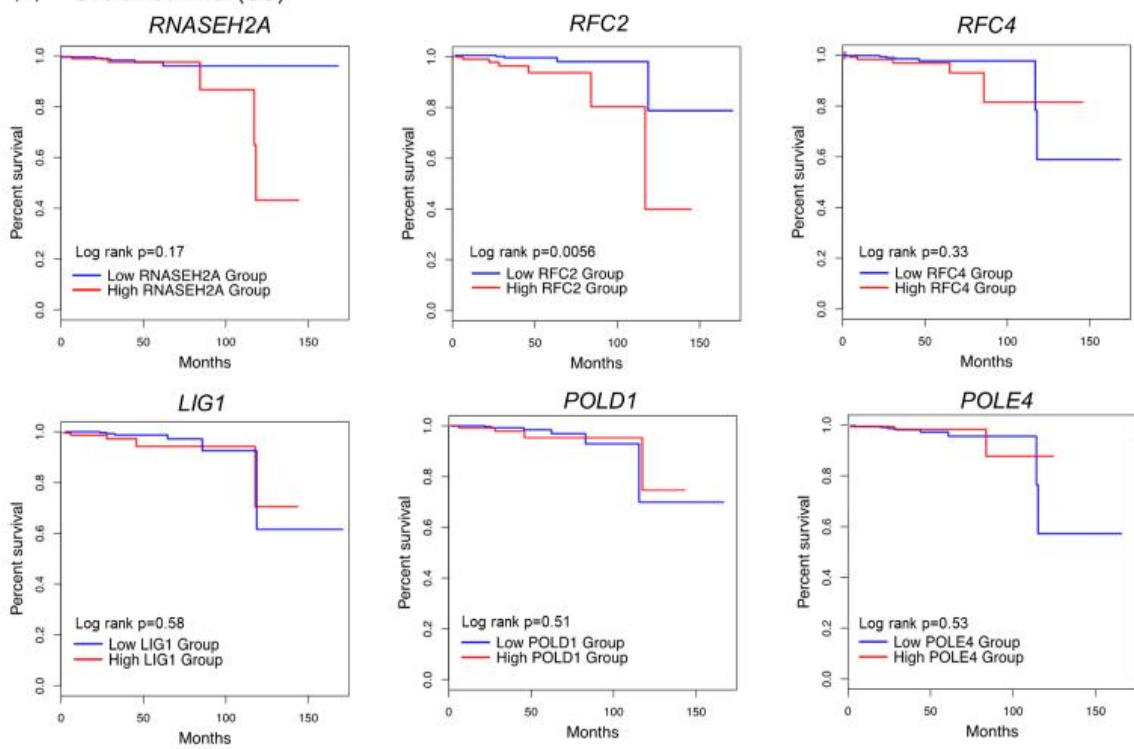


図 12 Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2) を用いた、
前立腺がんにおける DDR 関連遺伝子発現と予後の解析

The cancer genome atlas(TCGA)のデータセットを用いて、DDR 関連遺伝子を
発現量により 2 群に分けて、生化学的制御率 (biochemical failure-free survival:
BFFS) (A) と全生存期間 (overall survival: OS) (B) との関連を解析した。青
線は低発現群 (下位 75%)、赤線は高発現群 (上位 25%) を示す。Log-rank
test を用いて統計解析を行い、 P 値 < 0.05 を統計的に有意であるとみなした。

3. DDR 関連遺伝子は、CRPC 細胞株および CRPC 組織において発現上昇がみられる

次に、ヒト前立腺細胞株におけるこれら 6 つの DDR 関連遺伝子の発現レベルを調べるために、正常前立腺上皮初代培養細胞 (PrEC) と正常前立腺由来細胞株 (RWPE) および前立腺がん細胞株 (LNCaP)、CRPC 細胞株 (DU145、PC3 と 22Rv1) から抽出した total RNA を用いて、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: qRT-PCR) により mRNA 発現レベルを解析した。その結果、*RNASEH2A* の mRNA 発現レベルは、RWPE と比較して 4 つの前立腺がん細胞株で上昇し、中でも 22Rv1 細胞が高い *RNASEH2A* 発現レベルを示していた。同様に、*RFC2*、*RFC4*、*LIG1*、*POLD1* の mRNA 発現レベルも前立腺がん細胞株で RWPE と比較して有意に上昇し、それらの中で 22Rv1 において最も高い発現レベルを示した。*POLE4* もいくつかの前立腺がん細胞株で有意に発現が上昇したが、最も高い発現レベルは 22Rv1 ではなく PC3 であった (図 13)。

図 13

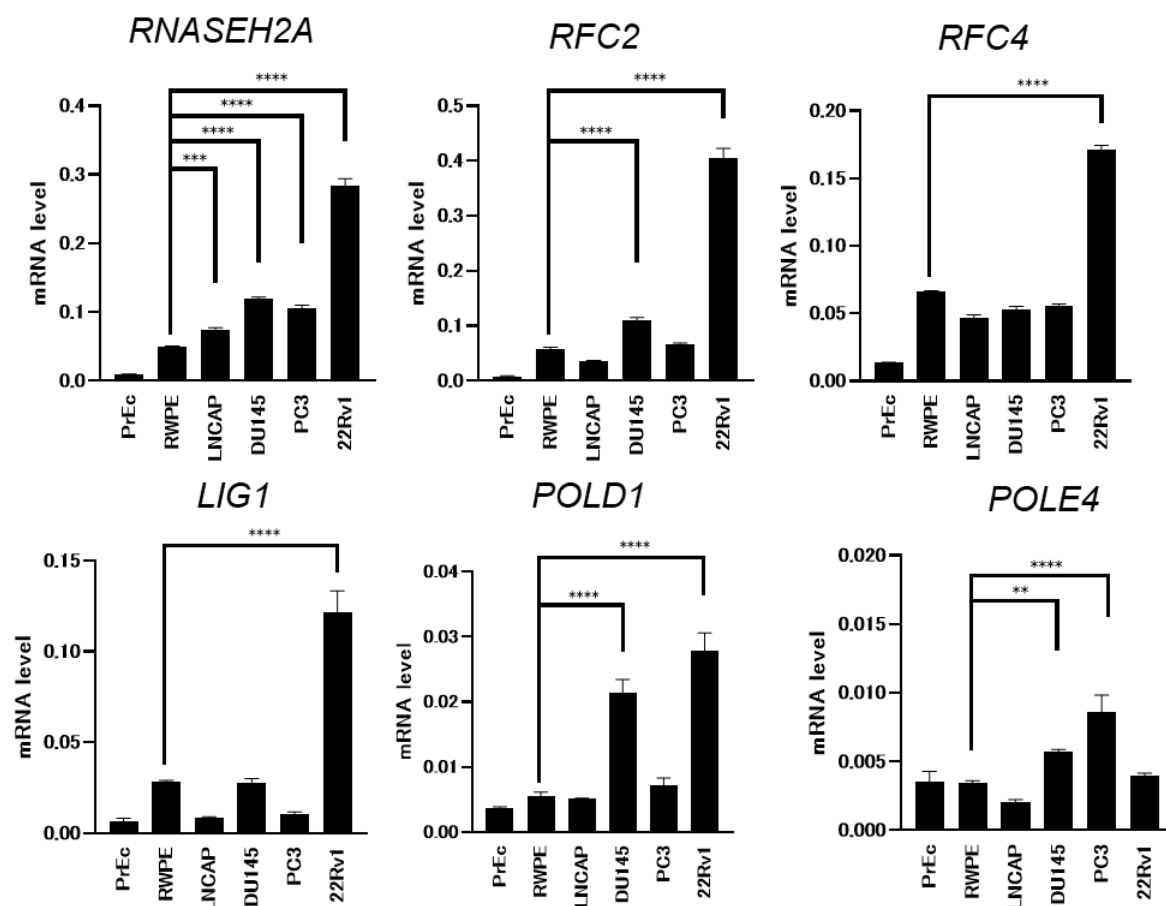


図 13 前立腺がん細胞株を用いた DDR 関連遺伝子の発現量の検証

正常前立腺上皮初代培養細胞（PrEC）と正常前立腺由来細胞株（RWPE）および前立腺がん細胞株（LNCaP、DU145、PC3、22Rv1）より RNA を抽出し、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: qRT-PCR）により遺伝子発現レベルを評価した。各遺伝子の発現量はハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) により補正した。Dunnett's multiple comparison test

により RWPE と各前立腺がん細胞株の発現量を比較し、 P 値 < 0.05 を有意差ありと判断した。グラフは、平均値 \pm 標準偏差で示した。 $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$

さらに、RNA-seq とは別の臨床サンプルセットを用いて、RNA-seq 解析の結果を検証した。Benign 組織 (N = 9)、Pca 組織 (N = 9)、および CRPC 組織 (N = 11)における DDR 関連遺伝子の mRNA 発現レベルを qPCR 分析により測定した。その結果、*RNASEH2A* ($P = 0.011$) と *RFC2* ($P = 0.011$) の発現レベルが、Benign 組織に比べ CRPC 組織で有意に上昇することが確認された。特に、*RFC2* は Pca 組織と比較して CRPC 組織で有意に発現が上昇した ($P = 0.047$)。一方、他の 4 つの遺伝子については、有意差は見られなかった (図 14)。

図 14

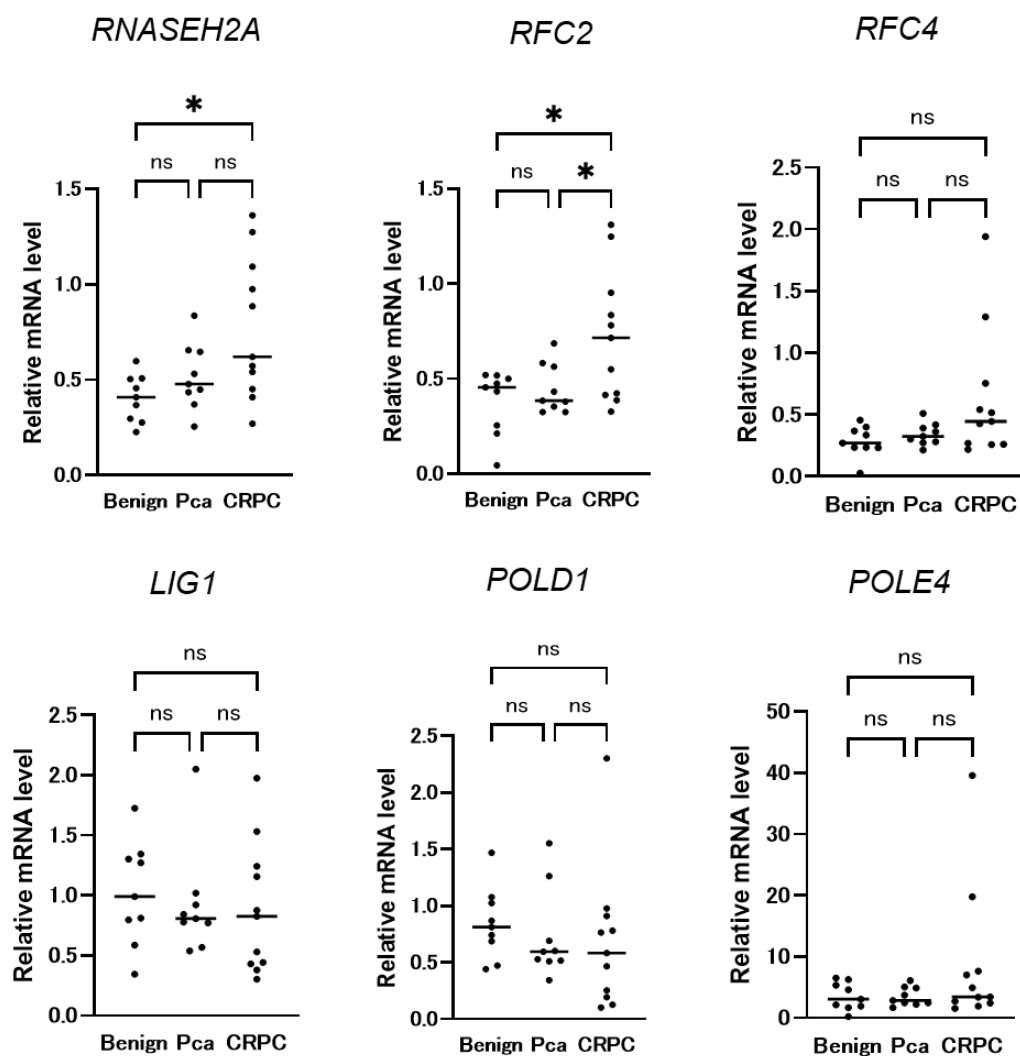


図 14 前立腺がん臨床サンプルを用いた DDR 関連遺伝子の発現レベルの検証
 良性前立腺(Benign)組織 (N = 9)、前立腺がん(Pca) 組織 (N = 9)、去勢抵抗性
 前立腺がん(CRPC)組織 (N = 11)より RNA を抽出し、各 DDR 関連遺伝子の発
 現量を qPCR により調べた。検証は各サンプル 2 回ずつ施行し、平均値をプロ
 ットした。Bar は全体の平均値を示す。Tukey's multiple comparison test により

統計解析を行い、 P 値 < 0.05 を有意差ありと判断した。 $*P < 0.05$, ns; not significant.

4. CRPC 細胞の増殖に対する RFC2 発現の制御機構

DDR 関連遺伝子が CRPC 細胞の増殖に及ぼす影響を評価するため、各遺伝子に特異的な small interfering RNA (siRNASEH2A、siRFC2、siRFC4、siLIG1、siPOLD1、siPOLE4) により処理した LNCaP、PC3、DU145、22Rv1 細胞を使って MTS アッセイによる細胞増殖の評価を行った。まず、PC3 細胞を用いて siRNA による各 DDR 関連遺伝子のノックダウン効果の検証を行った。その結果、PC3 細胞において、各 DDR 関連遺伝子の siRNA を用いた発現抑制により各 DDR 遺伝子の発現が有意に減少していることを確認した (図 15)。

図 15

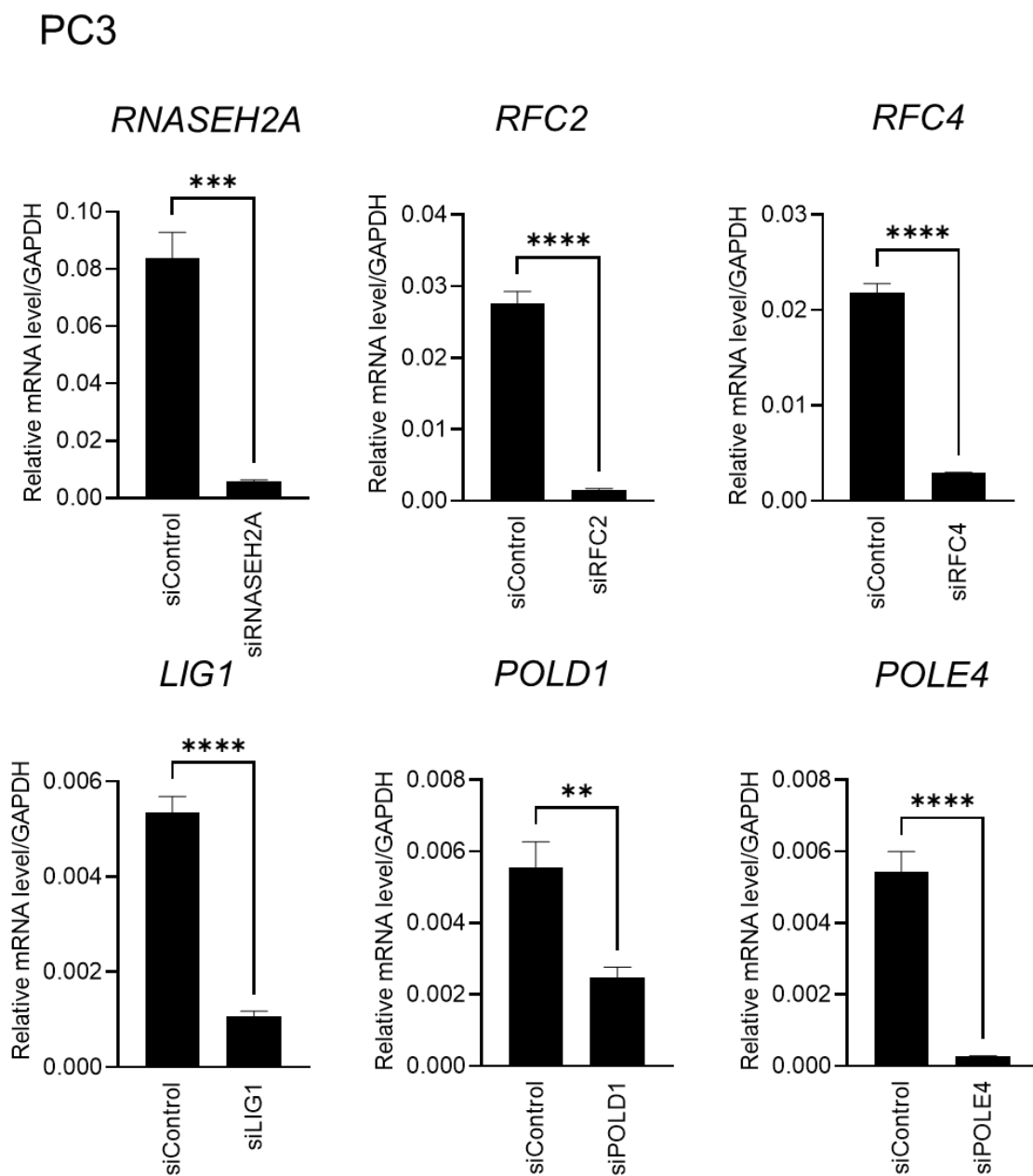


図 15 siRNA を用いて各 DDR 関連遺伝子を発現抑制した際の各 DDR 関連遺伝子の RNA 発現量の検討

PC3 細胞をおれぞれ 1×10^5 個ずつ 6 穴プレートの各ウェルに播種し、24 時間後

に 5 nM のコントロール siRNA(siControl)または各 DDR 関連遺伝子を標的とした各 siRNA を 48 時間トランスフェクションした。その後 RNA を抽出し、qRT-PCR により RNA 量を測定した。結果は平均値±標準偏差(S.D)で示した。Student's t-test により統計解析を行い、 P 値 < 0.05 を有意差ありと判断した。

** P < 0.01, **** P < 0.0001 (N = 3)

次に、前立腺がん細胞株の LNCaP と CRPC 細胞株の PC3、DU145、22Rv1 に対してこれらの siRNA を用いて発現抑制を行い、DDR 関連遺伝子の発現抑制が細胞増殖へ与える影響を MTS assay で検討した。その結果、RNASEH2A, RFC2, LIG1, POLD1, POLE4 の発現を抑制した全ての細胞株で、siControl と比較して細胞増殖が有意に抑制されることが確認された。RFC4 の発現抑制では、PC3 の細胞増殖は抑制されなかったが、LNCaP、DU145、および 22Rv1 の細胞増殖は抑制された（図 16）。

図 16

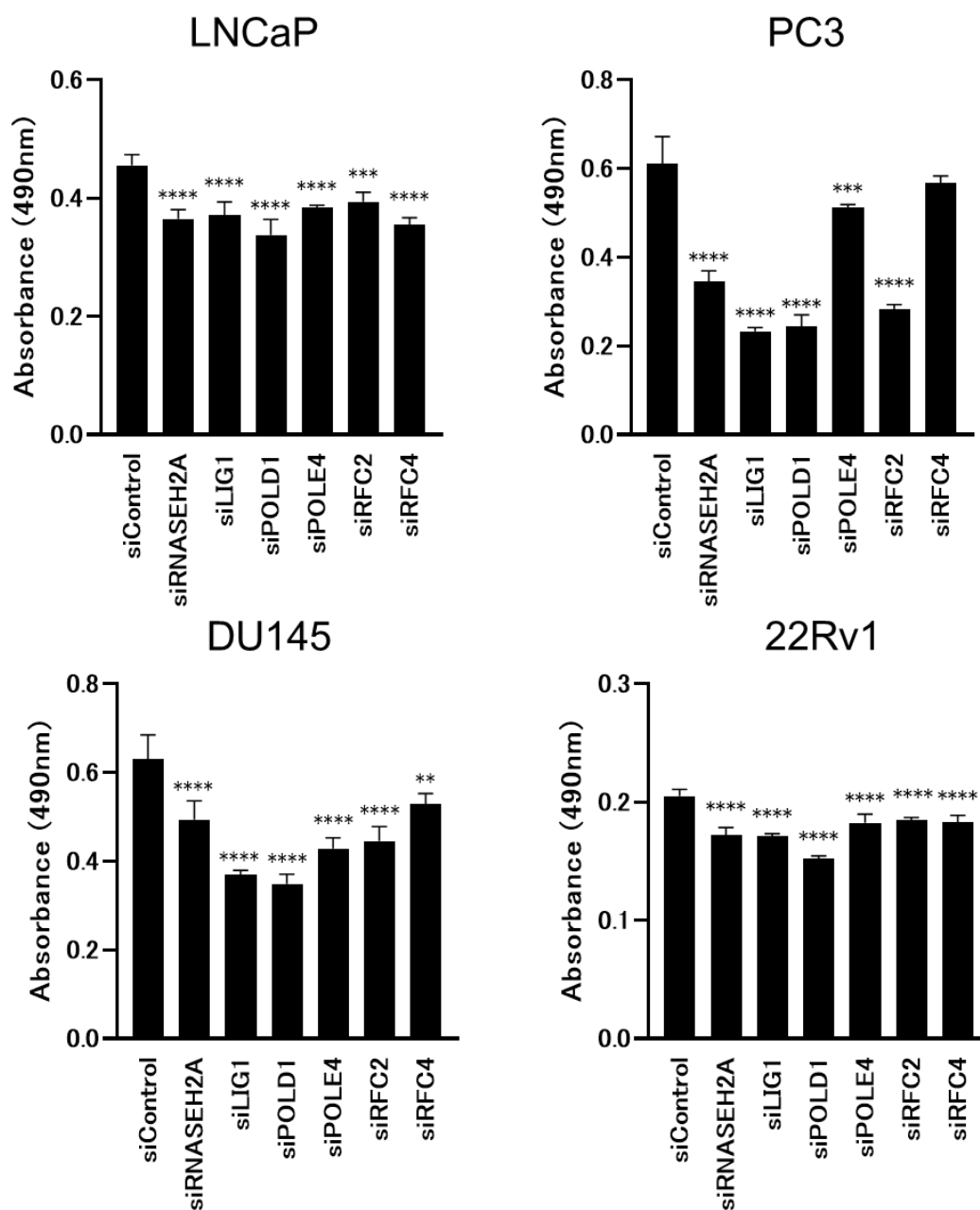


図 16 DDR 関連遺伝子の発現抑制が前立腺がん細胞の増殖能に与える影響の検討

LNCaP、PC3、DU145、22Rv1 細胞を 96 穴プレートの各ウェルに 2000 個ずつ

つ播種し、播種 24 時間後に siControl もしくは各 DDR 関連遺伝子の siRNA(5 nM)をトランスフェクションした。3 日後に MTS assay を行い各 DDR 関連遺伝子の発現抑制が細胞増殖に与える影響を検討した。グラフは平均値±標準偏差(S.D)で示す。Dunnett's multiple comparison test により siControl と各 DDR 関連遺伝子の siRNA による発現抑制群を比較し、 P 値 <0.05 を有意差ありと判断した。 $**P<0.01$, $****P<0.0001$ (N = 3)

これまでの実験の結果を統合し、この研究の基となった RNA-seq[101]と異なる、今回新たに検討した日本人由来のコホートにおいても Pca 組織と比較して CRPC 組織において RNA レベルで発現が上昇しており、公共データベースにおいても同様の結果が認められること、高発現が DFS および OS の予後不良因子であることから、6 つの DDR 関連遺伝子のうち RFC2 に注目した。

次に、RFC2 に関してさらなる検証を行うため、正常前立腺由来細胞株 (RWPE)、AR 陽性 Pca 細胞株 (LNCaP)、AR 陽性 CRPC 細胞株 (22RV1)、AR 陰性 CRPC 細胞株 (PC3、DU145) の 5 つの前立腺細胞株で RFC2 のタンパク質発現レベルを評価した。ウェスタンブロットによる解析の結果、RFC2 は 22RV1、DU145、PC3 細胞の CRPC 細胞株で高発現していることが確認された。一方 LNCaP 細胞では発現は認めるも発現量は少なく、RWPE 細胞では発現は認められなかった (図 17A)。また、LNCaP をアンドロゲン除去下で培養し樹立した CRPC モデル細胞の LTAD では LNCaP と比較して RFC2 が高発現であることが確認された。(図 17B)

図 17

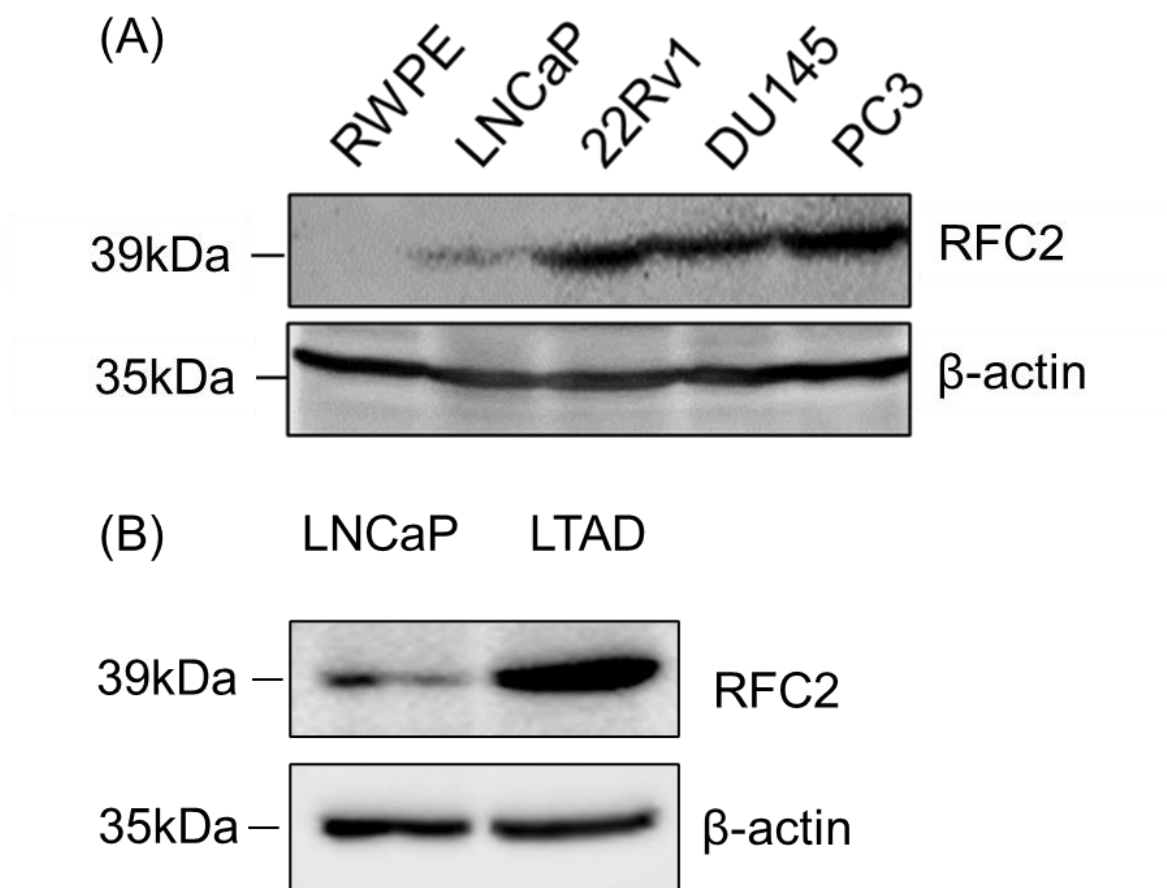


図 17 前立腺細胞株における RFC2 のタンパク質レベルでの発現量

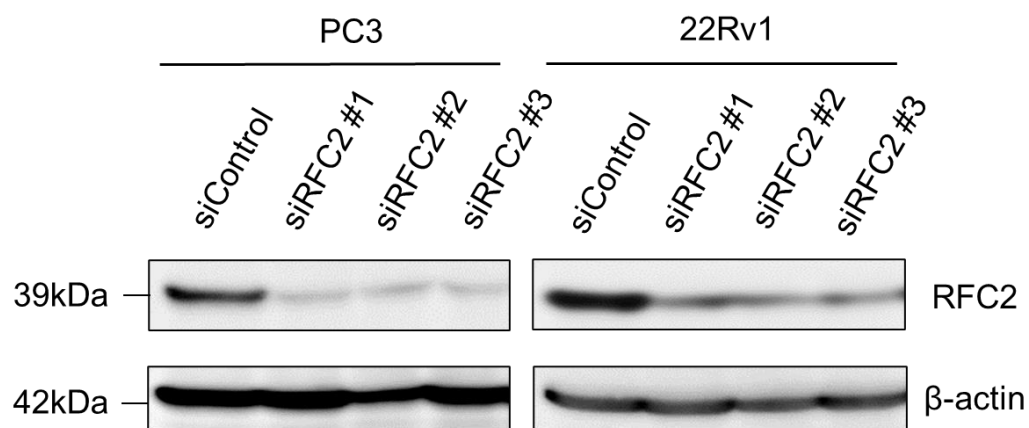
(A) 5つの前立腺細胞株（RWPE、LNCaP、22Rv1、DU145、PC3細胞）よりタンパク質を抽出し、RFC2に対する特異抗体を用いたwestern blot法により検出した。 β -actinをローディングコントロールとして用いた。

(B) LNCaP細胞とLTAD細胞よりタンパク質を抽出し、RFC2に対する特異抗体を用いたwestern blot法により検出した。 β -actinをローディングコントロールとして用いた。

次に、PC3 細胞と 22Rv1 細胞を用いて RFC2 を標的とした複数の siRNA (siRFC2 #1, siRFC2 #2, siRFC2 #3) (5nM) をトランスフェクションして発現抑制を行い、RFC2 特異抗体を用いた western blot 法にて RFC2 のタンパク質発現を検出した。siRFC2 #1-#3 で siControl と比較して RFC2 のタンパク質発現が抑制されることが確認された(図 18A)。qRT-PCR による RFC2 の mRNA 発現量計測でも、siRFC2 #1-#3 において RFC2 の mRNA 発現減少が確認された(図 18B)。

図 18

(A)



(B)

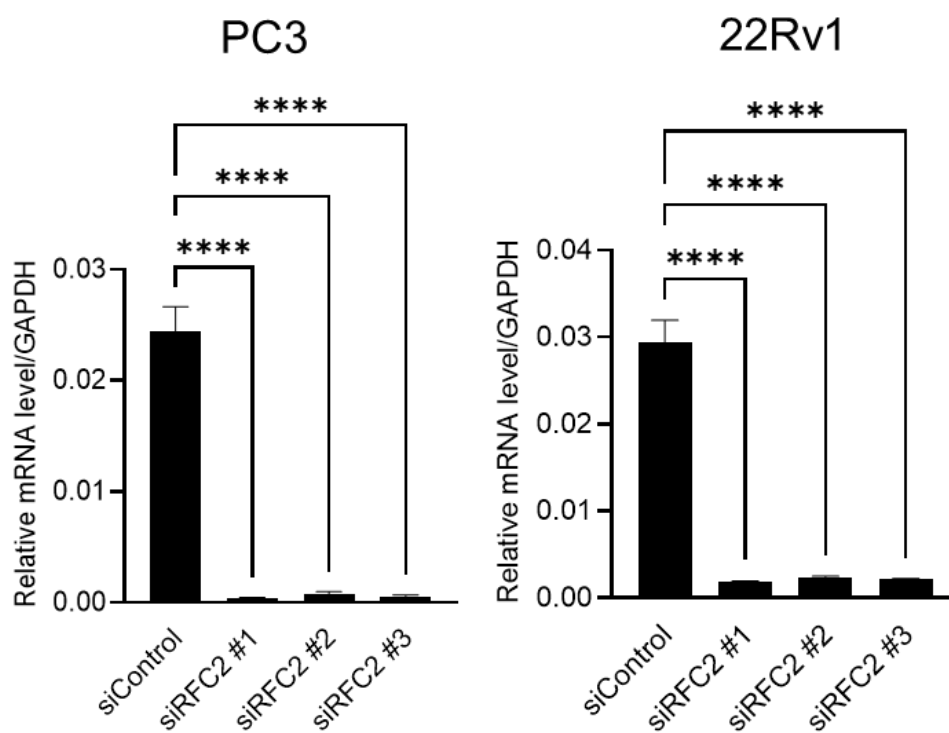


図 18 siRNA を用いて RFC2 を発現抑制した際の RFC2 タンパク質発現量および RNA 発現量の検討

PC3 細胞、22Rv1 細胞をそれぞれ 1×10^5 個ずつ 6 穴プレートの各ウェルに播種し、24 時間後にコントロール siRNA(siControl)および RFC2 を標的とする 3 種類の siRNA(siRFC2 #1, siRFC2 #2, siRFC2 #3)を各 5 nM トランスフェクションした。48 時間後にタンパク質及び RNA を抽出した。(A)RFC2 特異抗体を用いた western blot 法により RFC2 のタンパク質発現を検出した。(B)qRT-PCR により mRNA 発現量を定量した。グラフは平均値 \pm 標準偏差(S.D)で示し、Dunnett's multiple comparison test により siControl と RFC 発現抑制群を比較し、 P 値 < 0.05 を有意差ありと判断した。**** $P < 0.0001$ (N = 3)

また、同様に siRFC2 を用いて RFC2 の mRNA 発現を抑制すると DNA2 本鎖損傷のマーカである γ H2AX のタンパク質発現が上昇し、アポトーシスのマーカである cleaved PARP のタンパク質発現も上昇した(図 19)。

図 19

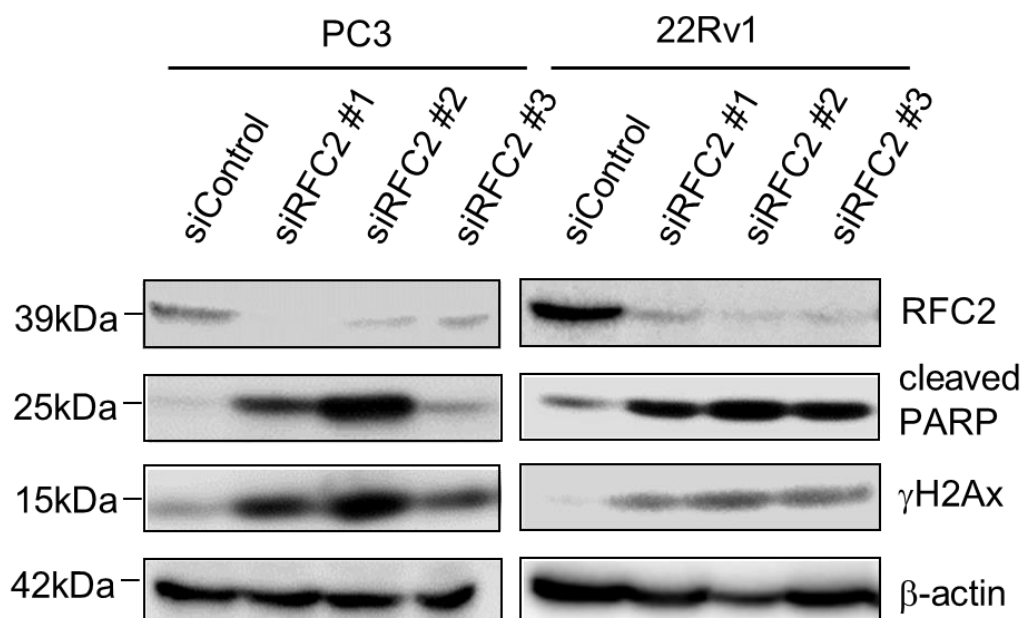


図 19 siRNA を用いて RFC2 を発現抑制した際の γ H2AX タンパク質および cleaved PARP タンパク質の発現量の検討

PC3 細胞、22Rv1 細胞をそれぞれ 1×10^5 個ずつ 6 穴プレートの各ウェルに播種し、24 時間後にコントロール(siControl)siRNA および RFC2 を標的とする 3 種類の siRNA(siRFC2 #1, siRFC2 #2, siRFC2 #3)を各 5 nM トランスフェクションした。48 時間後にタンパク質を抽出した。RFC2, γ H2Ax および cleaved PARP に特異的な抗体を用いた western blot 法によりそれぞれのタンパク質発現を検出した。

次に、siRFC2#1, #2, #3 をトランスフェクションして RFC2 を発現抑制した LNCaP、PC3、22Rv1 細胞を用いて、MTS assay を実施した。その結果、すべての細胞株において siControl と比較して、siRFC2 の発現抑制により、細胞増殖が有意に抑制された（図 20）。

図 20

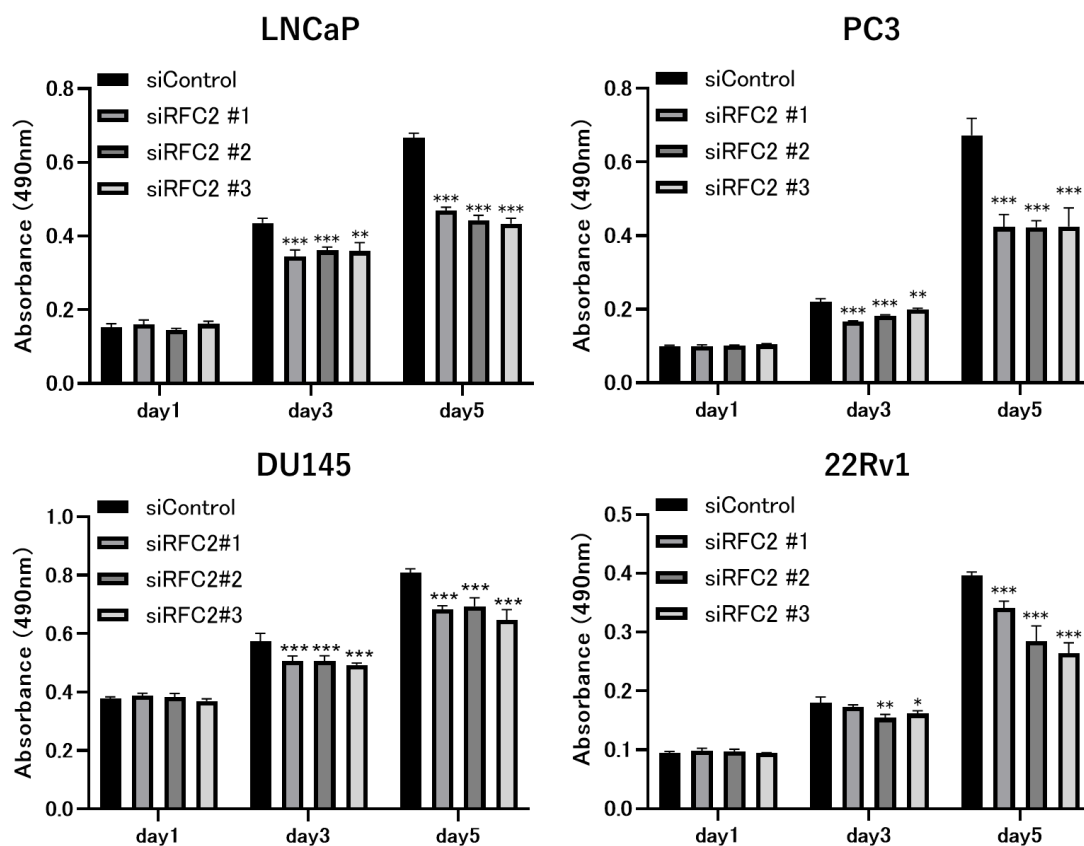


図 20 RFC2 の発現抑制が前立腺がん細胞の増殖能に与える影響の検討

LNCaP、PC3、DU145、22Rv1 細胞を 96 穴プレートの各ウェルに 2000 個ずつ播種し、播種 24 時間後に siControl もしくは siRFC2 #1, #2, #3 (5nM) をトランスフェクションした。1、3、5 日後に MTS assay を行い RFC2 の発現抑制が細胞増殖に与える影響を検討した。グラフは平均値±標準偏差(S.D)で示す。

Dunnett's multiple comparison test により siControl と siRFC2 #1-#3 を比較し、 P 値 < 0.05 を有意差ありと判断した。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ (N = 3)

さらに、siRFC2#1, #2, #3 をトランスフェクションして RFC2 を発現抑制した LNCaP 細胞と LTAD 細胞を用いて、MTS assay を実施した。その結果 siRFC2 の発現抑制により、LTAD 細胞では LNCaP 細胞以上に強く細胞増殖が抑制された（図 21）。

図 21

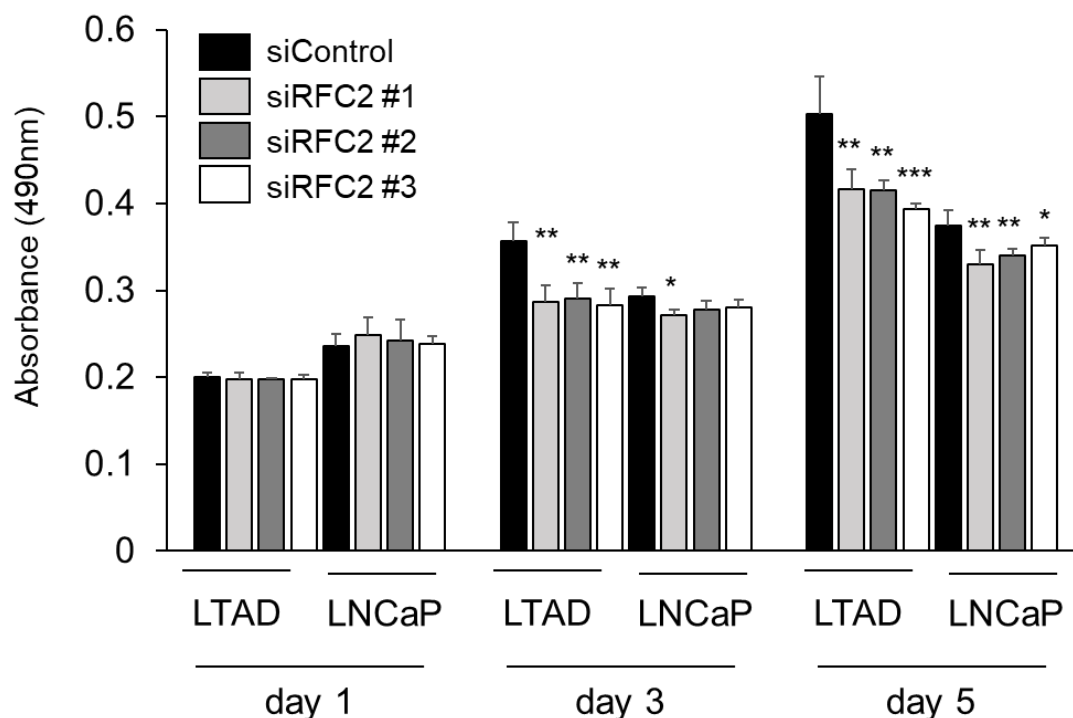


図 21 RFC2 の発現抑制が LNCaP 細胞と LTAD 細胞の増殖に与える影響の比較

LNCaP 細胞と LTAD 細胞を 96 穴プレートの各ウェルに 2000 個ずつ播種し、播種 24 時間後に siControl もしくは siRFC2 #1, #2, #3 (5nM) をトランスフェクションした。1、3、5 日後に MTS assay を行い RFC2 の発現抑制が細胞増殖に与える影響を検討した。グラフは平均値±標準偏差(S.D)で示す。Dunnett's multiple comparison test により siControl と siRFC2 #1-#3 を比較し、 P 値 < 0.05 を有意差ありと判断した。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ (N = 3)

5. 前立腺がん組織における組織免疫染色を用いた RFC2 タンパク質発現量の解析

前立腺がん組織における RFC2 発現の臨床的価値を調べるために、根治的前立腺切除術を受けた 103 人の Pca 患者の病理組織サンプルにおける免疫組織染色法 (Immunohistochemistry: IHC) を行った。抗体の特異性を確認するため、RFC2 発現の陽性コントロールとして膀胱がん切片を使用し(図 22A)、一次抗体として非特異的な IgG で染色した膀胱がん切片を陰性コントロールとした(図 22B)。その結果、膀胱がん切片において非特異的な IgG では染色は認めなかったが、RFC2 特異的な抗体を用いたサンプルでは核に RFC2 のタンパク質が検出され、抗体の特異性が確認できた。次いで前立腺がんの病理切片の免疫組織染色を行った。RFC2 の発現量を検討するため染色強度を 4 段階(0:なし、1:弱、2:中等度、3:強)で、染色範囲を 6 段階(0: なし、1: 1%未満、 2: 1%以上 10%未満、 3: 10%以上 33%未満、 4: 33%以上 66%未満: 5: 66%以上)で評価し、それぞれのスコアを合計して 8 点満点の immunoreactivity(IR)スコア(0, 2-8)をつけて評価した。IR スコアは中央値 3 点、平均値 3.1 点であったことから 4 点以上を RFC2 高発現、3 点以下を RFC2 低発現と定義した。前立腺がん標本においても RFC2 の染色は、主に核に観察された。代表的な RFC2 の染色強度別の免疫染色写真を図 22 C-F に示す。

図 22

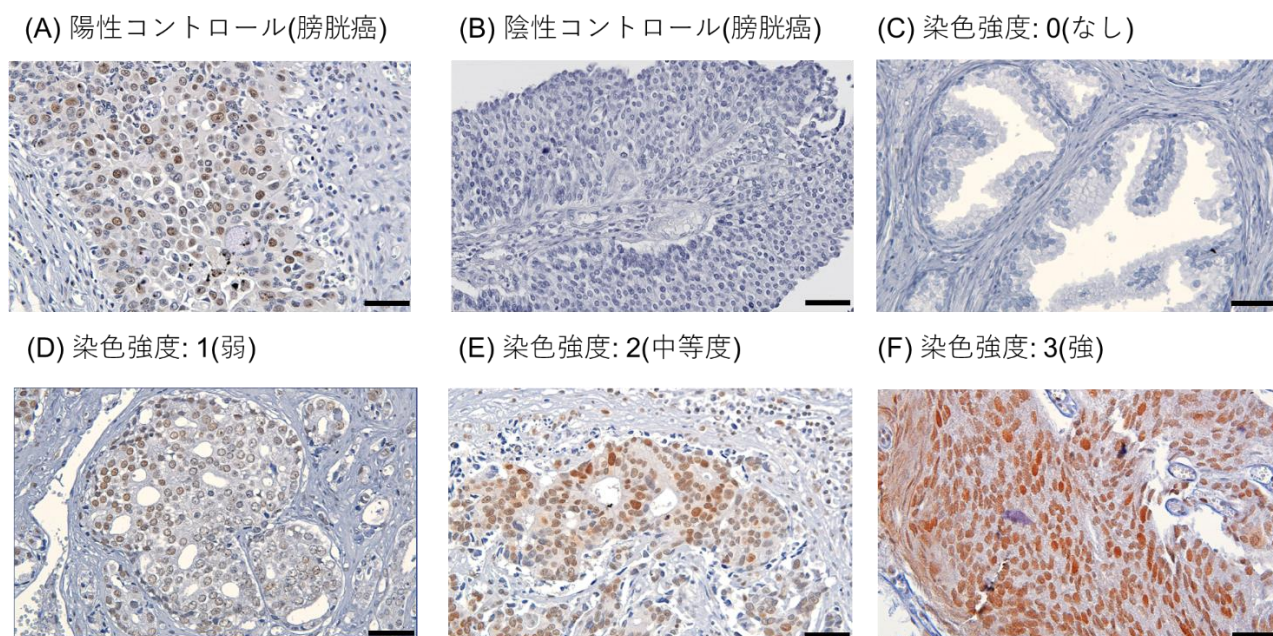


図 22 免疫組織染色による前立腺がん組織における RFC2 タンパク質発現量の解析

根治的前立腺全摘除術で得られた前立腺がん組織切片を用いて RFC2 特異抗体による組織免疫染色を行った。代表的な写真を示す。膀胱がんを陽性および陰性コントロールとして使用し、陰性コントロールでは非特異的 IgG により染色した。染色強度は 4 段階(0:なし、1:弱、2:中等度、3:強)で評価した。(A)陽性コントロール、(B)陰性コントロール、(C)RFC2 染色強度 0(なし)、(D)RFC2 染色強度 1(弱)、(E)RFC2 染色強度 2(中等度)、(F)RFC2 染色強度 3(強) Bar: 50 μ m

まず、RFC2 の免疫組織学的発現量と臨床的なパラメータとの相関を検討した。その結果、RFC2 の高発現 ($IR \geq 4$) は、病理学的 Gleason score (GS) 8 以上の高悪性度のがんおよび病理学的な病期診断で T ステージが高い患者、N ステージが高い患者で有意に高かった (それぞれ、 $P < 0.0001$ および $P < 0.0001$ および $P = 0.0164$) (表 1)。

表 1 限局性前立腺がん摘出病理組織における RFC2 の免疫組織学的発現と臨

床パラメータとの関係

	RFC2 IR スコア (N = 103)		
	低発現(IR ≤ 3) (N = 62)	高発現(IR ≥ 4) (N = 41)	P 値
手術時年齢(歳±S.D.)	67.1 ± 5.9	66.0 ± 6.3	.6904
術前血清PSA値			
PSA < 10 ng/mL	33	20	.8399
PSA ≥ 10 ng/mL	29	20	
病理学的 Gleason score (GS)			
GS < 8	48	13	<.0001
GS ≥ 8	14	28	
病理学的 T ステージ			
pT < 3b	53	15	<.0001
pT ≥ 3b	9	26	
病理学的 N ステージ			
pN = 0	58	31	.0164
pN = 1	4	10	

各症例における免疫組織学的発現を染色強度と染色範囲による IR スコアを用いて分類した。

Mann-Whitney U test 及び Fisher's exact test により RFC2 の発現レベルと各臨床パラメータとの相関を検討した。術前血清 PSA 値に関しては高発現群の 1 例において後方視的にデータを取得できなかったため除外した。P 値 < 0.05 を有意とした。PSA: prostate specific antigen、S.D.: standard deviation

次に、RFC2 発現量と臨床予後の関係について検討した。 Kaplan-Meier 法により無増悪生存率 (progression free survival)、がん特異的生存率 (cancer specific survival) の生存曲線を作成し、log-rank test により統計解析を行った結果、RFC2 の高発現は無増悪生存率 (図 23A) ($P < 0.0001$) と前立腺がん特異的生存率 (図 23B) ($P < 0.0001$) において有意に予後不良と相関していた。

図 23

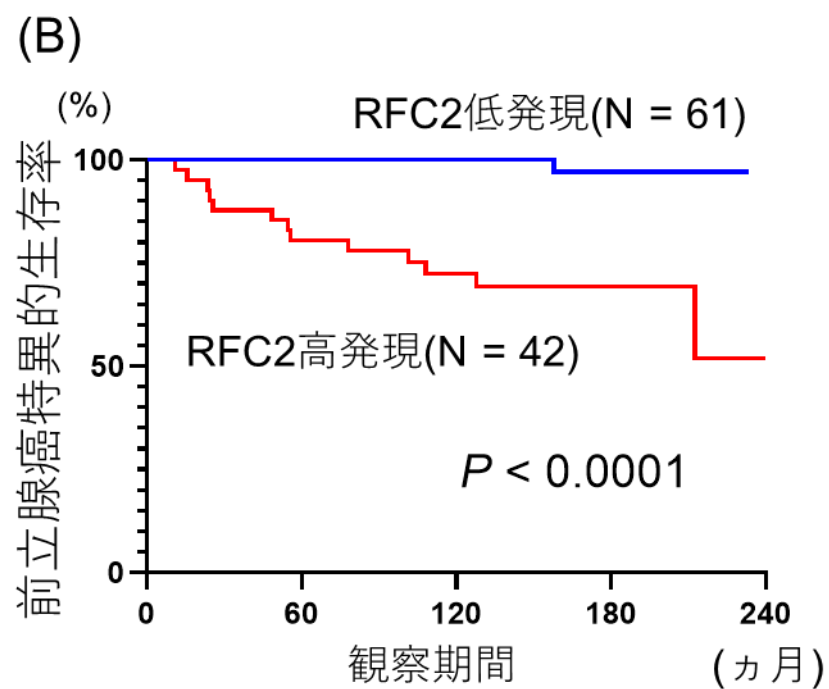
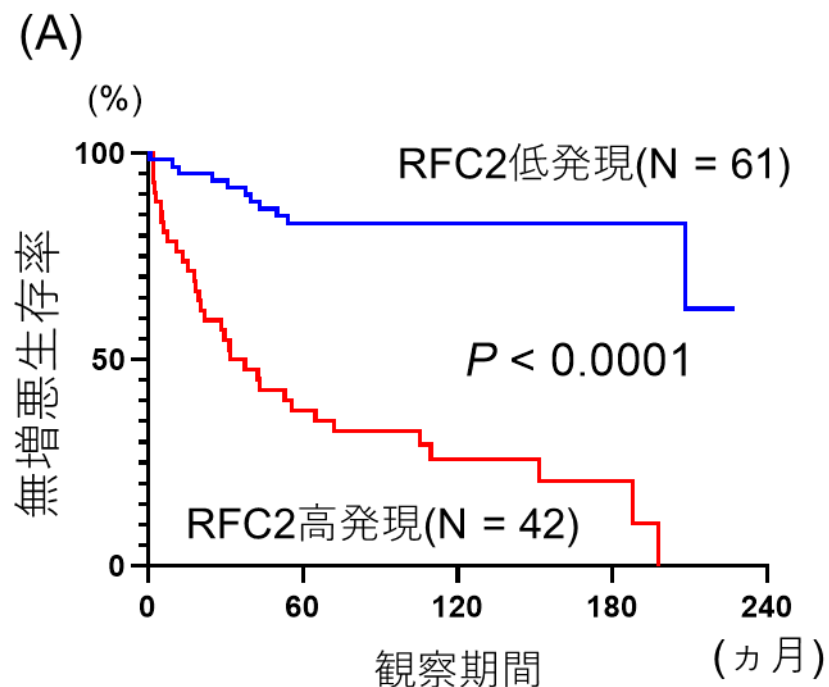


図 23 前立腺がんにおける RFC2 の免疫組織学的発現と予後との関係(N = 103)

(A)無増悪生存率、(B)前立腺がん特異的生存率

RFC2 の IR スコア 4 点以上を RFC2 高発現、IR スコア 3 点以下を RFC2 低発現と定義した。 Kaplan-Meier 法により両群の生存曲線を作成し、 log-rank test により統計解析を行った。 P 値 < 0.05 を有意とした。

さらに、前立腺がん特異的生存率における RFC2 の発現量と術前血清 PSA 値、GS8 以上、pT3b 以上、pN1 との関連を Cox 比例ハザード解析により検討した。単変量解析では、RFC2 の高発現は Gleason score ($P = 0.0033$)、病理学的 T 病期 (pt. stage) ($P = 0.0007$)、病理学的 N 病期 (pN stage) ($P = 0.0017$) と共に前立腺がん特異的生存率を有意に悪化させる因子であることが示された ($P = 0.0025$)。これらの因子を多変量解析した結果、RFC IR スコアは唯一の独立した予後因子であった ($P = 0.047$) (表 2)。

表 2 前立腺がんにおけるがん特異的生存率と各因子との関連

因子	単変量解析		多変量解析	
	ハザード比 (95%信頼区間)	<i>P</i> 値	ハザード比 (95%信頼区間)	<i>P</i> 値
PSA (PSA ≥10 ng/ml vs <ng/ml)	0.61 (0.20–1.82)	.3759		
Gleason score (GS) (GS ≥8 vs GS <8)	21.23 (2.77–162.65)	.0033	5.36 (0.52–55.19)	.1578
pT stage (pT ≥3b vs <3b)	13.49 (3.01–60.46)	.0007	2.05 (0.33–12.77)	.4415
pN stage (pN1 vs pN0)	5.49 (1.90–15.91)	.0017	1.58 (0.51–4.86)	.4267
RFC2 IR スコア (IR ≥4 vs IR <4)	23.19 (3.03–177.40)	.0025	8.70 (1.03–73.63)	.0470

Cox 比例ハザード解析を用いてがん特異的生存率の悪化に相関する因子群につ

いて単変量解析と多変量解析をおこなった。*P* 値 < 0.05 を有意とした。PSA:

prostate specific antigen、RFC2: replication factor C subunit 2

さらに、前立腺生検または経尿道的前立腺切除術（TURP）により得られた良性組織（Benign）である前立腺肥大症組織 12 症例と CRPC 組織 15 症例の組織標本を用いて、追加の IHC 解析を実施した。その結果、Benign では 12 人中 1 人（8.3%）、Pca では 103 人中 41 人（39.8%）、CRPC では 15 人中 12 人（80.0%）が RFC2 高発現であった。CRPC 患者では Pca と比較して RFC2 の発現が有意に高かった(図 24)。(P = 0.0047)

図 24

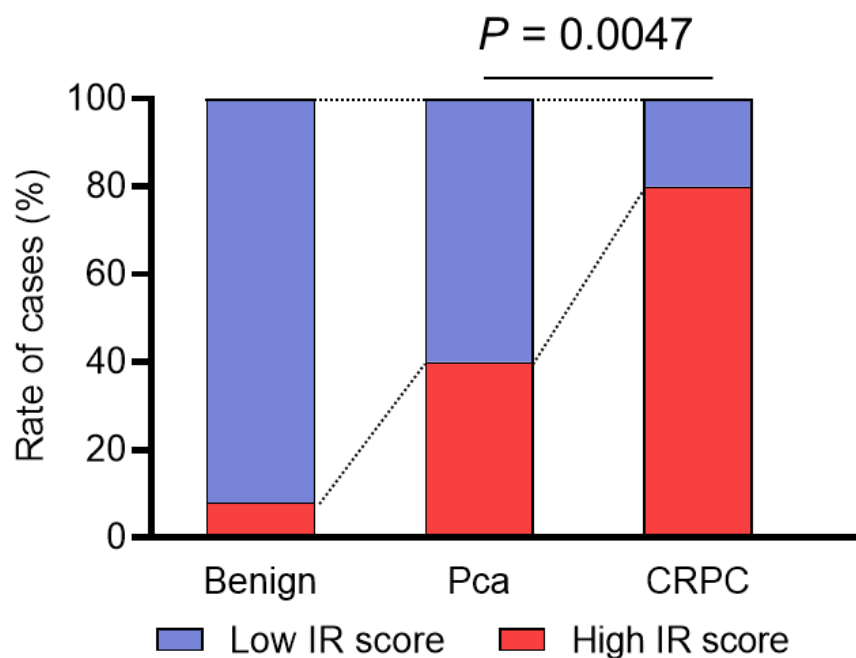


図 24 前立腺肥大症(Benign)組織(N = 12)、限局性前立腺がん(Pca)組織(N = 103)、去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)組織(N = 15)における RFC2 発現の比較
RFC2 の IR スコア 4 点以上を RFC2 高発現、IR スコア 3 点以下を RFC2 低発現と定義し高発現の割合を比較した。Fisher's exact test により統計解析を行い P 値 < 0.05 を有意とした。

さらに、CRPC 患者において、RFC2 の高発現群では、ADT 開始から CRPC 診断までの期間 (Time to CRPC) が RFC2 低発現群と比較して優位に短かった ($P = 0.007$) (図 25)。

以上の結果より、RFC2 は、高悪性度及び進行前立腺がん、特に CRPC において過剰発現しており、RFC2 の高発現は、予後不良と関連していることが分かった。

図 25

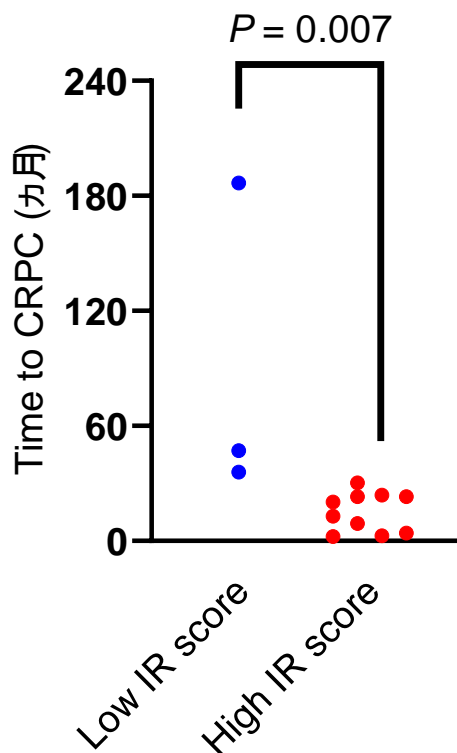


図 25

去勢抵抗性前立腺がん（CRPC）症例（N=15）におけるアンドロゲン除去療法（androgen deprivation therapy: ADT）開始から CRPC 診断までの期間（Time to CRPC）の比較

RFC2 の IR スコア 4 点以上を RFC2 高発現、IR スコア 3 点以下を RFC2 低発現と定義し、CRPC 症例 RFC2 低発現と高発現の 2 群に分け、各症例における根治的前立腺摘除術から CRPC 診断までの期間（Time to CRPC）をプロットした。Mann-Whitney U test により統計解析を行い、 P 値 < 0.05 を有意とした。

第4章 考察

1. RFC2 は CRPC の増殖やアポトーシスに関わり有望な治療標的となりうる

本研究では、DNA 修復や DNA 複製に関わる DDR 関連遺伝子が、限局性前立腺がんと比較して、CRPC 組織や CRPC 細胞株で発現上昇していることを明らかにした。その中から6つの候補遺伝子 (*RNASEH2A*、*RFC2*、*RFC4*、*LIG1*、*POLD1*、*POLE4*) を選び、公共データベースによる解析や前立腺細胞株、臨床前立腺組織サンプルを用いたいくつかのスクリーニングを組み合わせることで、これら候補遺伝子の中から *RFC2* を有望な標的遺伝子として見出した。RFC は DNA の複製や修復、細胞増殖や細胞周期チェックポイントの制御に関与している DNA 結合タンパク質で、DNA 合成部に PCNA をロードし、DNA-RFC-PCNA-DNA ポリメラーゼ複合体を形成するクランプローダーとして働く[25,26,27]。RFC は、1つの大きなサブユニット RFC1 と4つの小さなサブユニット RFC2、RFC3、RFC4、RFC5 からなる5つのサブユニット複合体であり[84]、RFC の各小サブユニットは、様々ながんにおいて生物学的に活性化され、がん細胞の成長、進行、浸潤、転移に重要な役割を担っている[81]。既存の研究では、RFC2 が膠芽腫[103]、肝細胞がん [104]、鼻咽頭がん [93] など様々な腫瘍で発現が上昇することが示されており、膠芽腫においては RFC2

の高発現は悪性度の Grade や腫瘍径、転移の有無とも相関していると報告されている [103]。in vitro においては RFC2 のノックダウンにより肝細胞がんや膠芽腫において細胞の増殖や遊走能が有意に抑制されアポトーシスが増加したことが報告されている [104]。今回の我々の研究結果は、知りうる限り初めて RFC2 が前立腺がん、特に CRPC で過剰発現していることを明らかにし、さらに、RFC2 を発現抑制すると CRPC の細胞増殖が抑制され、DNA 損傷が蓄積され、アポトーシスが促進されることを明らかにした。これらの結果は他がん種におけるこれまでの報告とも矛盾しないものであった。

RFC2 は DNA の複製にも修復にも関わるタンパク質であり、増殖速度の速い細胞では発現が上昇していることが考えられ、また正常前立腺上皮細胞でも発現抑制により細胞増殖抑制が起きるが、正常細胞より DNA 修復機構に大きな欠陥のある前立腺がん細胞の方が、より選択的に RFC2 の発現抑制による効果が表れると推測される。

RFC2 が HSPC 細胞株の LNCaP よりも LNCaP から樹立した CRPC 細胞の LTAD や AR 陽性の CRPC モデル細胞の 22Rv1 で発現上昇し、RFC2 の発現抑制により、LTAD では LNCaP と比較してより強く細胞増殖が抑制されるという今回の検証結果は、RFC2 が前立腺がんの ADT に対する抵抗性や CRPC への進行に関係していることを反映している可能性があり、組織免疫染

色において RFC2 が Pca と比較して CRPC で発現上昇していることもこのことを裏付ける結果と考えられた。

さらに RFC2 は AR 陰性の CRPC 細胞株である PC3 や DU145 においても発現上昇しており、これらの細胞においても RFC2 の発現抑制により細胞増殖抑制効果が得られた。PC3 では 22Rv1 以上に強い細胞増殖抑制効果が得られたことから、AR シグナルに依存しない CRPC や神経内分泌前立腺癌 (Neuroendocrine prostate cancer: NEPC) に対しても有望な治療標的となる可能性を示すものである。

2. RFC2 を介した効率のよい DDR に関して

RFC は DNA の新生鎖合成部に PCNA を load し DNA の複製や修復に関与しているが、DNA の複製や修復が終わると PCNA は DNA から unload される必要があり、RFC が効率よく load/unload されることが効率的な DDR に重要であることが報告されている[105]。RFC は PCNA を DNA に load することは知られている一方で、PCNA を unload する機能に関しての一定の見解は得られていない[105, 106]。知りうる限り、RFC2-5 の各小サブユニットが単独で機能するとの報告はこれまでになく、本研究の基となった RNA-seq の結果では RFC2-5 はいずれも RNA レベルの発現上昇がみられたことから、RFC2-5 は複

合体として作用していると考えられる。一方で、RNA-seq の結果では RFC1 は発現が低下していた。これに関して、真核生物は RFC に類似した分子として、3 種類の RFC 様複合体(RFC-like complex: RLC)を持つことが知られており [107]、RLC は RFC 同様に RFC2-5 の小サブユニットを持つが、大サブユニットとして RFC1 の代わりに ATPase Family AAA Domain Containing 5(ATAD5) (ATAD5-RLC)、Radiation sensitive 17(Rad17)(Rad17-RLC)、Chromosome Transmission Fidelity Factor 18 Homolog(Ctf18) (Ctf18-RLC)を持つ。これらの機能はまだ十分には解明されていないが、ATAD5-RLC は *in vitro*, *in vivo* の両方で PCNA を DNA 鎖から unload する活性を示すことが報告されている [108]。酵母において Elg1(真核生物における ATAD5 に相当するタンパク質)を欠失させると、1 本鎖損傷の修復がうまく行われなことで HRR が高頻度で見られ、DNA 損傷修復を HRR に依存するようになることが報告されている [109]。また、Ctf18-RLC も *in vitro* において PCNA を DNA 鎖から unload する活性を示し [110]、Ctf18 を欠損させると HRR が増加し [111]、微小管阻害剤の nocodazole や benomyl などに高い感受性を示すことが報告されている [112]。

このように RFC2-5 の小サブユニットは RFC と RLC に共通の分子であり、DDR において PCNA の load や unload を介してゲノムの安定化に寄与している [113]。本研究では CRPC で RFC2 の発現上昇がみられることを示した

が、RFC2 がどのコアタンパク質と複合体を形成して RF(Replication fork: RF) を制御しているのかを検証することは今後の課題である。

3. RFC2 は前立腺癌から CRPC への進行に関与し予後予測因子となりうる

限局性前立腺がん摘出病理組織における RFC2 の免疫組織学的発現と臨床パラメータとの関係から、高悪性度の前立腺癌では RFC2 の発現量が増加していることに加え、前立腺がん組織を用いた RFC2 の組織免疫染色の解析により、RFC2 のタンパク質レベルの高発現は前立腺がんの予後不良と相関していた。RFC2 の RNA レベルの高発現は肝細胞がん患者[104]においても予後不良因子であると報告されており、今回の結果とも一致していた。RFC2 は Benign から Pca、CRPC と進展するにつれて発現が上昇しており、さらに CRPC 組織において、RFC2 の高発現群では、治療開始から CRPC 診断までの期間(Time to CRPC)が RFC2 低発現群と比較して優位に短く、RFC2 高発現の前立腺がん患者は CRPC へと進展するリスクが高いことが想定される。

前立腺がんは CRPC へと進展すると致死的である反面、前立腺がんに対する手術や放射線治療などの局所治療では周術期合併症や尿失禁、頻尿、直腸出血などといった合併症も少なからず存在し、over treatment となるケースもあるため、治療開始前に前立腺生検標本で RFC2 の発現を評価することで、

CRPC 進展リスクが高く、限局性前立腺がんの時点で積極的な治療が必要な前立腺がん患者を層別化するためのバイオマーカーとなる可能性がある。

4. RFC2 の発現抑制による CRPC 治療への期待

DDR を標的とした CRPC の新規治療法として PARP 阻害剤が開発され、臨床的有用性が示されているが、近年では PARP 阻害剤に対する耐性も報告されている[114]。その機序としては、①BRCA の二次変異(復帰変異)による HRR 能力の回復、②RF の安定化、③代替修復機構への移行、④PARP のリン酸化による PARP 阻害剤との親和性の低下、⑤PARP 阻害剤に対する薬剤排出機構の活性化などが挙げられる [114-117]。

RF の安定化を介した PARP 阻害剤への耐性機序として以下のような機序が想定されている。PARP 阻害剤を投与すると PARP 自身の ADP リボシル化が阻害され、PARP が複製/修復中の DNA 上に捕捉されたまま離れなくなる (PARP トラッピング)[118]。本来 DNA の複製/修復のセンサーとして働く PARP が PARP トラッピングにより複製/修復ストレスとなり、RF は停止する。停止した RF ではリバーサルと呼ばれる現象が起き[119]、RF や DNA 新生鎖はリバーサルの部位を起点として Meiotic Recombination 11(MRE11)や Mutagen-sensitive 81 (MUS81) などのタンパク質により広範囲に分解され DSB や細胞

死が誘導される[120, 121]。BRCA にはリバーサルを起こした RF を分解から保護する作用があるため、BRCA 欠損細胞では PARP 阻害剤に対して感受性を持つと考えられる。一方で RF の保護/安定性の回復は PARP 阻害剤耐性の原因となる。RF のリバーサルが RF での DNA 分解の前提となるため、リバーサルを誘導するタンパク質である SWI/SNF-Related Matrix-Associated Actin-Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily A-Like Protein 1 (SMARCA1)、Zinc Finger Ran-Binding Domain-Containing Protein 3 (ZRANB3)、Helicase Like Transcription Factor (HTLF)などの発現が低下すると BRCA 欠損細胞でも RF が安定化し PARP 阻害剤耐性となる[122, 123]。また RF に MRE11 をリクルートする Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia Protein 3/4 (MLL3/4)や Pax transactivation domain-interacting protein (PTIP)の発現低下や MUS81 をリクルートする Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)の発現低下によっても PARP 阻害剤へ耐性となる[121, 124] (図 26)。

図 26

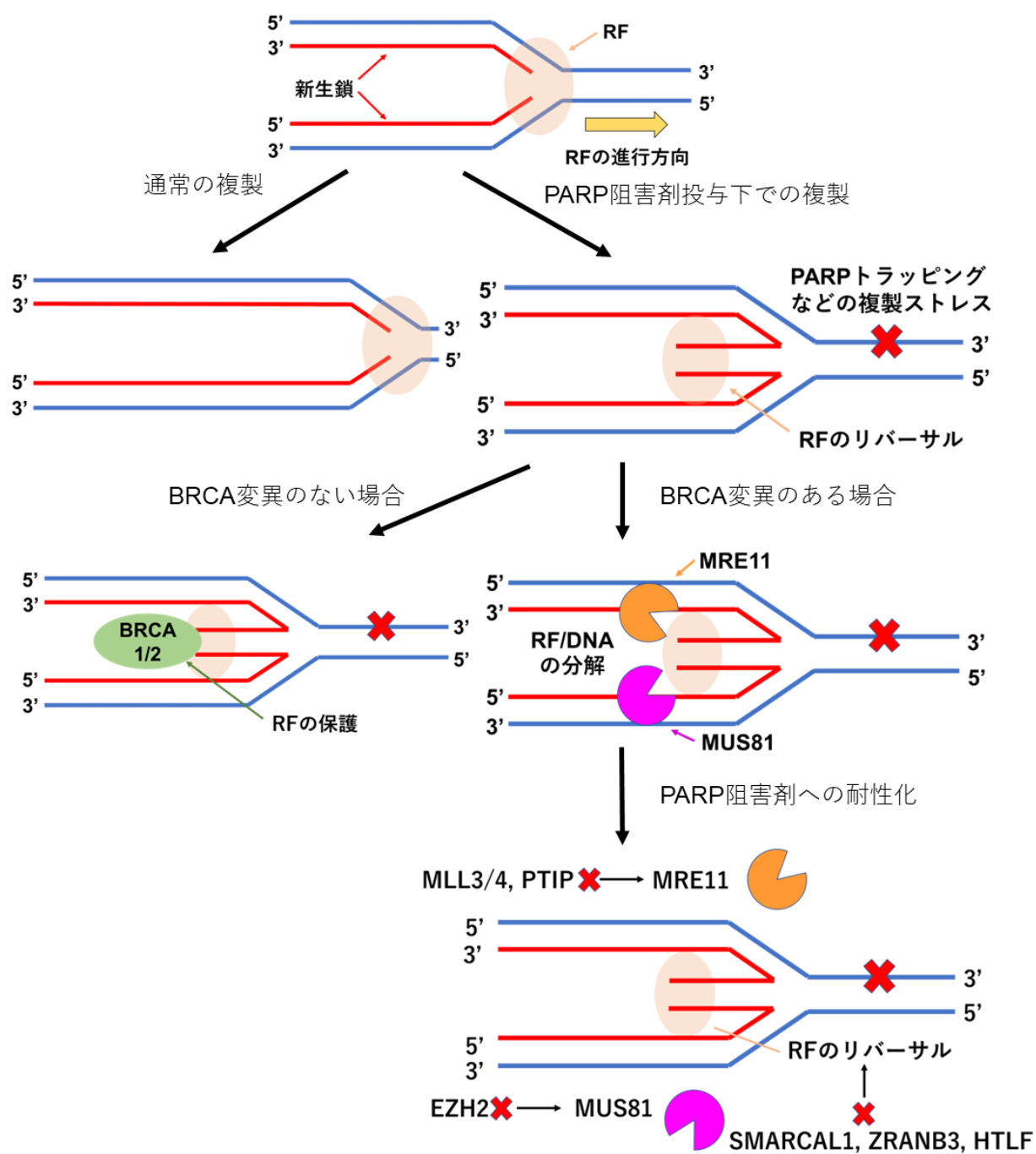


図 26 複製フォークの安定化による PARP 阻害剤への耐性化

PARP 阻害剤投与により PARP 自身への ADP リボシル化が阻害され、PARP

が DNA より離れなくなる(PARP トラッピング)と、複製フォーク(Replication fork: RF)は進行を停止し、SWI/SNF-Related Matrix-Associated Actin-Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily A-Like Protein 1 (SMARCA1)、Zinc Finger Ran-Binding Domain-Containing Protein 3 (ZRANB3)、Helicase Like Transcription Factor (HTLF)などの作用により RF のリバーサルが起きる。リバーサルを起こした RF は BRCA1/2 により保護され安定化するが、BRCA 変異のある細胞では保護されずに Meiotic Recombination 11(MRE11)や MUS81 などの作用で分解され、最終的に細胞死が誘導される。これらのリバーサルを誘導するタンパク質や MRE や MUS81 を動員する Myeloid/Lymphoid Or Mixed-Lineage Leukemia Protein 3/4(MLL3/4)、Pax transactivation domain-interacting protein(PTIP)、Enhancer of zeste homolog 2(EZH2)などのタンパク質の発現が低下すると BRCA 変異があっても RF は分解されず、安定化することで細胞生存に有利となる。

RFC2 は RF を構成する分子であることから、RFC2 を阻害することで RF が不安定化し、必要な修復が行われないことで最終的にアポトーシスが誘導されると考えられ、PARP 阻害剤に耐性を持つようになった CRPC に対しても有望な治療標的となる可能性がある。さらに、BRCA 遺伝子変異を有する前立腺がんでは、DNA の一本鎖切断修復経路が代替経路として細胞生存に必須であることから、BER 経路の阻害剤である PARP 阻害剤に MMR 経路や NER 経路を阻害する RFC2 阻害剤を代用もしくは併用することで一本鎖修復経路に依存する CRPC に対する有効な治療法となる可能性があり、PARP 阻害剤やその他の DNA 損傷剤と RFC2 阻害剤の併用による相乗効果を検証することは今後の課題である。このように、今後 CRPC 治療における新規治療薬として RFC2 の阻害剤の開発が期待される。

第5章 要旨

本研究では CRPC において DDR 関連遺伝子が発現上昇していることに注目し、種々の DDR 関連遺伝子のスクリーニングの結果から有望な候補遺伝子として *RFC2* を同定した。*RFC2* の発現抑制は CRPC 細胞における細胞増殖、DNA 損傷修復、抗アポトーシス能を抑制する作用を有することを見出し、前立腺がんの臨床検体を用いた *RFC2* の組織免疫染色では、*RFC* は前立腺がんの発生や CRPC への進行に伴い発現が上昇し、さらに前立腺がん患者において *RFC2* の高発現は独立した予後不良因子であった。*RFC2* は前立腺がんの増殖および CRPC への進行において重要な役割を果たしていることが示唆され、*RFC2* は、前立腺がんの進行や予後を予測するバイオマーカーとして機能し、CRPC の新規の治療標的となる可能性がある。

【謝辞】

本研究の実施に当たり、大学院進学の機会を頂き様々な御指導、御支援を賜りました自治医科大学腎泌尿器外科学講座教授 藤村哲也先生に深く感謝いたします。また、研究テーマを与えていただき、研究や実験の進行に当たり御指導いただきました東京都健康長寿医療センター研究所老化機構研究チーム・システム加齢医学研究 研究部長 井上聡先生、専門副部長 高山賢一先生に深く感謝いたします。実験全般についてご指導いただきました東京大学大学院医学系研究科泌尿器外科講師 山田雄太先生と木村直樹先生に深く感謝いたします。本研究を行うにあたり様々な御指導をいただきました東京都健康長寿医療センター研究所老化機構研究チーム・システム加齢医学研究の皆様、日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科分野の皆様に深く感謝いたします。

【引用文献】

1. Paolo Verze, Tommaso Cai, Stefano Lorenzetti. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol.*, 13(7): 379-386, 2016.
2. LaTayia Aaron, Omar E Franco, Simon W Hayward. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol Clin North Am.*, 43(3): 279-288, 2016.
3. 国立がん研究センターがん情報サービス 2022
(<https://ganjoho.jp/public/index.html>)
4. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol.*, 20(13): 3001–3015, 2002.
5. M H Eileen Tan, Jun Li, H Eric Xu, Karsten Melcher, Eu-leong Yong. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.*, 36(1): 3-23, 2015.
6. A K Roy, B Chatterjee. Androgen action. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, 5(2): 157-176, 1995.
7. Donkena Krishna Vanaja, Susan H Mitchell, David O Toft, Charles Y F Young. Effect of geldanamycin on androgen receptor function and stability. *Cell Stress Chaperones.*, 7(1): 55-64, 2002.

8. Ken-ichi Takayama, Satoshi Inoue. Transcriptional network of androgen receptor in prostate cancer progression. *Int J Urol.*, 20(8): 756-768, 2013.
9. Hong-Jian Jin, Jung Kim, Jindan Yu. Androgen receptor genomic regulation. *Transl Androl Urol.*, 2(3): 157-177, 2013.
10. Walsh PC. The discovery of the cavernous nerves and development of nerve sparing radical retropubic prostatectomy. *J Urol.*, 177(5): 1632-1635, 2007.
11. Schuessler WW. Laparoscopic radical prostatectomy: initial case report. *J Urol.*, 147: 246A, 1992.
12. J Binder, W Kramer. Robotically-assisted laparoscopic radical prostatectomy. *BJU Int.*, 87(4): 408-410, 2001.
13. A Brahme. Optimization of stationary and moving beam radiation therapy techniques. *Radiother Oncol.*, 12(2): 129-140, 1988.
14. Takuma Nomiya, Hiroshi Tsuji, Hidemasa Kawamura, Tatsuya Ohno, Shingo Toyama, Yoshiyuki Shioyama, Yuko Nakayama, Kenji Nemoto, Hirohiko Tsujii, Tadashi Kamada. A multi-institutional analysis of prospective studies of carbon ion radiotherapy for prostate cancer: A report from the Japan Carbon ion Radiation Oncology Study Group (J-CROS). *Radiother Oncol.*, 121(2): 288-293, 2016.

15. Nobumichi Tanaka, Isao Asakawa, Emiko Katayama, Akihide Hirayama, Masatoshi Hasegawa, Noboru Konishi, Kiyohide Fujimoto. The biochemical recurrence-free rate in patients who underwent prostate low-dose-rate brachytherapy, using two different definitions. *Radiat Oncol.*, 9: 107, 2014.
16. D Jeffrey Demanes, Michel I Ghilezan. High-dose-rate brachytherapy as monotherapy for prostate cancer. *Brachytherapy.*, 13(6): 529-541, 2014.
17. Jose D Debes, Donald J Tindall. Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *N Engl J Med.*, 351(15): 1488-1490, 2004.
18. Charles Huggins, Clarence V. Hodges. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Res.*, 1(4): 293–297, 1941.
19. A V Schally, A Arimura, A J Kastin, H Matsuo, Y Baba, T W Redding, R M Nair, L Debeljuk, W F White. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science.*, 173(4001): 1036-1038, 1971.
20. Laurence Klotz, Laurent Boccon-Gibod, Neal D Shore, Cal Andreou, Bo-Eric Persson, Per Cantor, Jens-Kristian Jensen, Tine Kold Olesen, Fritz H Schröder. The efficacy and safety of degarelix: a 12-month, comparative,

- randomized, open-label, parallel-group phase III study in patients with prostate cancer. *BJU Int.*, 102(11): 1531-1538, 2008.
21. F Labrie, A Dupont, A Belanger, L Cusan, Y Lacourciere, G Monfette, J G Laberge, J P Emond, A T Fazekas, J P Raynaud, J M Husson. New hormonal therapy in prostatic carcinoma: combined treatment with an LHRH agonist and an antiandrogen. *Clin Invest Med.*, 5(4): 267-275, 1982.
 22. [Hideyuki Akaza, Shiro Hinotsu, Michiyuki Usami, Yoichi Arai, Hiroshi Kanetake, Seiji Naito, Yoshihiko Hirao, Study Group for the Combined Androgen Blockade Therapy of Prostate Cancer. Combined androgen blockade with bicalutamide for advanced prostate cancer: long-term follow-up of a phase 3, double-blind, randomized study for survival. *Cancer.*, 115(15): 3437-3445, 2009.
 23. Alison Egan, Yan Dong, Haitao Zhang, Yanfeng Qi, Steven P Balk, Oliver Sartor. Castration-resistant prostate cancer: adaptive responses in the androgen axis. *Cancer Treat Rev.*, 40(3): 426-433, 2014.
 24. Howard I Scher, Grant Buchanan, William Gerald, Lisa M Butler, Wayne D Tilley. Targeting the androgen receptor: improving outcomes for castration-resistant prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.*, 11(3): 459-476, 2004.

25. Axel Heidenreich, Patrick J Bastian, Joaquim Bellmunt, Michel Bolla, Steven Joniau, Theodor van der Kwast, Malcolm Mason, Vsevolod Matveev, Thomas Wiegel, Filiberto Zattoni, Nicolas Mottet, European Association of Urology. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol.*, 65(2): 467-479, 2014.
26. Fei Lian, Nitya V Sharma, Josue D Moran, Carlos S Moreno. The biology of castration-resistant prostate cancer. *Curr Probl Cancer.*, 39(1): 17-28, 2015.
27. Yiqiao Huang, Xianhan Jiang, Xue Liang, Ganggang Jiang. Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer. *Oncol Lett.*, 15(5): 6063-6076, 2018.
28. Jennifer A Locke, Emma S Guns, Amy A Lubik, Hans H Adomat, Stephen C Hendy, Catherine A Wood, Susan L Ettinger, Martin E Gleave, Colleen C Nelson. Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.*, 68(15): 6407-6015, 2008.
29. Min Yuen Teo, Dana E Rathkopf, Philip Kantoff. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annu Rev Med.*, 70: 479-499, 2019.
30. I Mowszowicz. Antiandrogens. Mechanisms and paradoxical effects. Ann

Endocrinol (Paris)., 50(3): 189-199, 1989.

31. Chris Tran, Samedy Ouk, Nicola J Clegg, Yu Chen, Philip A Watson, Vivek Arora, John Wongvipat, Peter M Smith-Jones, Dongwon Yoo, Andrew Kwon, Teresa Wasielewska, Derek Welsbie, Charlie Degui Chen, Celestia S Higano, Tomasz M Beer, David T Hung, Howard I Scher, Michael E Jung, Charles L Sawyers. Epub 2009 Apr 9. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science.*, 324(5928): 787-790, 2009.
32. K J Pienta, Deborah Bradley. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res.*, 12(6): 1665-1671, 2006.
33. Charlie D Chen, Derek S Welsbie, Chris Tran, Sung Hee Baek, Randy Chen, Robert Vessella, Michael G Rosenfeld, Charles L Sawyers. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med.*, 10(1): 33-39, 2004.
34. R Paul, J Breul. Antiandrogen withdrawal syndrome associated with prostate cancer therapies: incidence and clinical significance. *Drug Saf.*, 23(5): 381-390, 2000.

35. Nicola J Clegg, John Wongvipat, James D Joseph, Chris Tran, Samedy Ouk, Anna Dilhas, Yu Chen, Kate Grillot, Eric D Bischoff, Ling Cai, Anna Aparicio, Steven Dorow, Vivek Arora, Gang Shao, Jing Qian, Hong Zhao, Guangbin Yang, Chunyan Cao, John Sensintaffar, Teresa Wasielewska, Mark R Herbert, Celine Bonnefous, Beatrice Darimont, Howard I Scher, Peter Smith-Jones, Mark Klang, Nicholas D Smith, Elisa De Stanchina, Nian Wu, Ouathék Ouerfelli, Peter J Rix, Richard A Heyman, Michael E Jung, Charles L Sawyers, Jeffrey H Hager. ARN-509: a novel antiandrogen for prostate cancer treatment. *Cancer Res.*, 72(6): 1494-1503, 2012.
36. Celestia Higano. Enzalutamide, apalutamide, or darolutamide: are apples or bananas best for patients?. *Nat Rev Urol.*, 16(6): 335-336, 2019.
37. Tomasz M Beer, Bertrand Tombal. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med.*, 371(18): 1755-1756, 2014.
38. Matthew R Smith, Margaret K Yu, Eric J Small. Apalutamide and Metastasis-free Survival in Prostate Cancer. *N Engl J Med.*, 378(26): 2542, 2018.
39. Karim Fizazi, Neal Shore, Teuvo L Tammela, Albertas Ulys, Egils Vjaters, Sergey Polyakov, Mindaugas Jievaltas, Murilo Luz, Boris Alekseev, Iris Kuss, Christian Kappeler, Amir Snapir, Toni Sarapohja, Matthew R Smith, ARAMIS

- Investigators. Darolutamide in Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 380(13): 1235-1246, 2019.
40. R Nandha. Abiraterone acetate: a novel drug for castration-resistant prostate carcinoma. *J Postgrad Med*, 58(3): 203-206, 2012.
41. Charles J Ryan, Matthew R Smith, Karim Fizazi, Fred Saad, Peter F A Mulders, Cora N Sternberg, Kurt Miller, Christopher J Logothetis, Neal D Shore, Eric J Small, Joan Carles, Thomas W Flaig, Mary-Ellen Taplin, Celestia S Higano, Paul de Souza, Johann S de Bono, Thomas W Griffin, Peter De Porre, Margaret K Yu, Youn C Park, Jinhui Li, Thian Kheoh, Vahid Naini, Arturo Molina, Dana E Rathkopf, COU-AA-302 Investigators. Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naïve men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol*, 16(2): 152-160, 2015.
42. K J Pienta. Preclinical mechanisms of action of docetaxel and docetaxel combinations in prostate cancer. *Semin Oncol*, 28(4 Suppl 15): 3-7, 2001.
43. Ian F Tannock, Ronald de Wit, William R Berry, Jozsef Horti, Anna Pluzanska, Kim N Chi, Stephane Oudard, Christine Théodore, Nicholas D James, Ingela

- Turesson, Mark A Rosenthal, Mario A Eisenberger, TAX 327 Investigators. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.*, 351(15): 1502-1512, 2004.
44. Johann Sebastian de Bono, Stephane Oudard, Mustafa Ozguroglu, Steinbjørn Hansen, Jean-Pascal Machiels, Ivo Kocak, Gwenaëlle Gravis, Istvan Bodrogi, Mary J Mackenzie, Liji Shen, Martin Roessner, Sunil Gupta, A Oliver Sartor, TROPIC Investigators. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet.*, 376(9747):1147-1154, 2010.
45. Christopher J Lord, Alan Ashworth. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature.*, 481(7381): 287-294, 2012.
46. Jan H J Hoeijmakers. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.*, 361(15): 1475-1485, 2009.
47. Alberto Ciccia, Stephen J Elledge. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.*, 40(2): 179-204, 2010.
48. Mark J O'Connor. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell.*, 60(4): 547-560, 2015.

49. Nimrat Chatterjee, Graham C Walker. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.*, 58(5): 235-263, 2017.
50. Josef Jiricny. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 7(5): 335-346, 2006.
51. Gemma Bridge, Sukaina Rashid, Sarah A Martin. DNA mismatch repair and oxidative DNA damage: implications for cancer biology and treatment. *Cancers (Basel).*, 6(3): 1597-1614, 2014.
52. Martin A M Reijns, Björn Rabe, Rachel E Rigby, Pleasantine Mill, Katy R Astell, Laura A Lettice, Shelagh Boyle, Andrea Leitch, Margaret Keighren, Fiona Kilanowski, Paul S Devenney, David Sexton, Graeme Grimes, Ian J Holt, Robert E Hill, Martin S Taylor, Kirstie A Lawson, Julia R Dorin, Andrew P Jackson. Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development. *Cell.*, 149(5): 1008-1022, 2012.
53. Jinzhen Guo, Luping Chen, Guo-Min Li. DNA mismatch repair in trinucleotide repeat instability. *Sci China Life Sci.*, 60(10): 1087-1092, 2017.
54. Sheila S David, Valerie L O'Shea, Sucharita Kundu. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature.*, 447(7147): 941-950, 2007.

55. Gabrielle J Grundy, Jason L Parsons. Base excision repair and its implications to cancer therapy. *Essays Biochem.*, 64(5): 831-843, 2020.
56. Graciela Spivak. Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair (Amst)*., 36: 13-18, 2015.
57. Julien Vignard, Gladys Mirey, Bernard Salles. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up. *Radiother Oncol.*, 108(3): 362-369, 2013.
58. Shigeaki Sunada, Akira Nakanishi, Yoshio Miki. Crosstalk of DNA double-strand break repair pathways in poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor treatment of breast cancer susceptibility gene 1/2-mutated cancer. *Cancer Sci.*, 109(4): 893-899, 2018.
59. A Shibata, P A Jeggo. DNA double-strand break repair in a cellular context. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*., 26(5): 243-249, 2014.
60. Niels Mailand, Simon Bekker-Jensen, Helene Faustrup, Fredrik Melander, Jiri Bartek, Claudia Lukas, Jiri Lukas. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell.*, 131(5): 887-900, 2007.
61. William Douglass Wright, Shanaya Shital Shah, Wolf-Dietrich Heyer.

Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.*, 293(27): 10524-10535, 2018.

62. Howard H Y Chang, Nicholas R Pannunzio, Noritaka Adachi, Michael R Lieber. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 18(8): 495-506, 2017.
63. Gabriel Balmus, Domenic Pilger, Julia Coates, Mukerrem Demir, Matylda Sczaniecka-Clift, Ana C Barros, Michael Woods, Beiyuan Fu, Fengtang Yang, Elisabeth Chen, Matthias Ostermaier, Tatjana Stankovic, Hannes Ponstingl, Mareike Herzon, Kosuke Yusa, Francisco Munoz Martinez, Stephen T Durant, Yaron Galanty, Petra Beli, David J Adams, Allan Bradley, Emmanouil Metzakopian, Josep V Forment, Stephen P Jackson. ATM orchestrates the DNA-damage response to counter toxic non-homologous end-joining at broken replication forks. *Nat Commun.*, 10(1): 87, 2019.
64. Michael J Metzge, Barry L Stoddard, Raymond J Monnat Jr. PARP-mediated repair, homologous recombination, and back-up non-homologous end joining-like repair of single-strand nicks. *DNA Repair (Amst.)*, 12(7): 529-534, 2013.
65. Tomas Aparicio, Richard Baer, Jean Gautier. DNA double-strand break repair

- pathway choice and cancer. *DNA Repair (Amst)*., 19: 169-175, 2014.
66. Kristen E Mengwasser, Richard O Adeyemi, Yumei Leng, Mei Yuk Choi, Connor Clairmont, Alan D D'Andrea, Stephen J Elledge. Genetic Screens Reveal FEN1 and APEX2 as BRCA2 Synthetic Lethal Targets. *Mol Cell*., 73(5): 885-899, 2019.
 67. Douglas Hanahan, Robert A Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*., 144(5): 646-674, 2011.
 68. Andrea Brown, Sanjay Kumar, Paul B Tchounwou. Cisplatin-Based Chemotherapy of Human Cancers. *J Cancer Sci Ther.*, 11(4): 97, 2019.
 69. Jihong Zhang, Malcolm F G Stevens, Tracey D Bradshaw Affiliations expand. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol.*, 5(1): 102-114, 2012.
 70. Z Herceg, Z Q Wang. Functions of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat Res.*, 477(1-2): 97-110, 2001.
 71. Finn Cilius Nielsen, Thomas van Overeem Hansen 1, Claus Storgaard Sørensen. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nat Rev Cancer.*, 16(9): 599-612, 2016.

72. Kathleen E Malone, Janet R Daling, David R Doody, Li Hsu, Leslie Bernstein, Ralph J Coates, Polly A Marchbanks, Michael S Simon, Jill A McDonald, Sandra A Norman, Brian L Strom, Ronald T Burkman, Giske Ursin, Dennis Deapen, Linda K Weiss, Suzanne Folger, Jennifer J Madeoy, Danielle M Friedrichsen, Nicola M Suter, Mariela C Humphrey, Robert Spirtas, Elaine A Ostrander. Prevalence and predictors of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of breast cancer in white and black American women ages 35 to 64 years. *Cancer Res.*, 66(16): 8297-8308, 2006.
73. Barbara M Norquist, Maria I Harrell, Mark F Brady, Tom Walsh, Ming K Lee, Suleyman Gulsuner, Sarah S Bernards, Silvia Casadei, Qian Yi, Robert A Burger, John K Chan, Susan A Davidson, Robert S Mannel, Paul A DiSilvestro, Heather A Lankes, Nilsa C Ramirez, Mary Claire King, Elizabeth M Swisher, Michael J Birrer. Inherited Mutations in Women with Ovarian Carcinoma. *JAMA Oncol.*, 2(4): 482-490, 2016.
74. Alice Chen. PARP inhibitors: its role in treatment of cancer. *Chin J Cancer.*, 30(7): 463-471, 2011.
75. Eric Pujade-Lauraine, Jonathan A Ledermann, Frédéric Selle, Val Gebski, Richard T Penson, Amit M Oza, Jacob Korach, Tomasz Huzarski, Andrés

Poveda, Sandro Pignata, Michael Friedlander, Nicoletta Colombo, Philipp Harter, Keiichi Fujiwara, Isabelle Ray-Coquard, Susana Banerjee, Joyce Liu, Elizabeth S Lowe, Ralph Bloomfield, Patricia Pautier, SOLO2/ENGOT-Ov21 investigators. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.*, 18(9): 1274-1284, 2017.

76. Mark Robson, Seock-Ah Im, Elzbieta Senkus, Binghe Xu, Susan M Domchek, Norikazu Masuda, Suzette Delaloge, Wei Li 1, Nadine Tung, Anne Armstrong, Wenting Wu, Carsten Goessl, Sarah Runswick, Pierfranco Conte. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med.*, 377(6): 523-533, 2017.

77. Z Kote-Jarai, D Leongamornlert, E Saunders, M Tymrakiewicz, E Castro, N Mahmud, M Guy, S Edwards, L O'Brien, E Sawyer, A Hall, R Wilkinson, T Dadaev, C Goh, D Easton, UKGPCS Collaborators; D Goldgar, R Eeles. BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: implications for genetic testing in prostate cancer patients. *Br J Cancer.*, 105(8): 1230-1234, 2011.

78. Dan Robinson, Eliezer M Van Allen, Yi-Mi Wu, Nikolaus Schultz, Robert J Lonigro, Juan-Miguel Mosquera, Bruce Montgomery, Mary-Ellen Taplin, Colin C Pritchard, Gerhardt Attard, Himisha Beltran, Wassim Abida, Robert K Bradley, Jake Vinson, Xuhong Cao, Pankaj Vats, Lakshmi P Kunju, Maha Hussain, Felix Y Feng, Scott A Tomlins, Kathleen A Cooney, David C Smith, Christine Brennan, Javed Siddiqui, Rohit Mehra, Yu Chen, Dana E Rathkopf, Michael J Morris, Stephen B Solomon, Jeremy C Durack, Victor E Reuter, Anuradha Gopalan, Jianjiong Gao, Massimo Loda, Rosina T Lis, Michaela Bowden, Stephen P Balk, Glenn Gaviola, Carrie Sougnez, Manaswi Gupta, Evan Y Yu, Elahe A Mostaghel, Heather H Cheng, Hyojeong Mulcahy, Lawrence D True, Stephen R Plymate, Heidi Dvinge, Roberta Ferraldeschi, Penny Flohr, Susana Miranda, Zafeiris Zafeiriou, Nina Tunariu, Joaquin Mateo, Raquel Perez-Lopez, Francesca Demichelis, Brian D Robinson, Marc Schiffman, David M Nanus, Scott T Tagawa, Alexandros Sigaras, Kenneth W Eng, Olivier Elemento, Andrea Sboner, Elisabeth I Heath, Howard I Scher, Kenneth J Pienta, Philip Kantoff, Johann S de Bono, Mark A Rubin, Peter S Nelson, Levi A Garraway, Charles L Sawyers, Arul M Chinnaiyan. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*, 161(5): 1215-1228, 2015.

79. Joaquin Mateo, Suzanne Carreira, Shahneen Sandhu, Susana Miranda, Helen Mossop, Raquel Perez-Lopez, Daniel Nava Rodrigues, Dan Robinson, Aurelius Omlin, Nina Tunariu, Gunther Boysen, Nuria Porta, Penny Flohr, Alexa Gillman, Ines Figueiredo, Claire Paulding, George Seed, Suneil Jain, Christy Ralph, Andrew Protheroe, Syed Hussain, Robert Jones, Tony Elliott, Ursula McGovern, Diletta Bianchini, Jane Goodall, Zafeiris Zafeiriou, Chris T Williamson, Roberta Ferraldeschi, Ruth Riisnaes, Bernardette Ebbs, Gemma Fowler, Desamparados Roda, Wei Yuan, Yi-Mi Wu, Xuhong Cao, Rachel Brough, Helen Pemberton, Roger A'Hern, Amanda Swain, Lakshmi P Kunju, Rosalind Eeles, Gerhardt Attard, Christopher J Lord, Alan Ashworth, Mark A Rubin, Karen E Knudsen, Felix Y Feng, Arul M Chinnaiyan, Emma Hall, Johann S de Bono. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med.*, 373(18): 1697-1708, 2015.
80. Johann de Bono, Joaquin Mateo, Karim Fizazi, Fred Saad, Neal Shore, Shahneen Sandhu, Kim N Chi, Oliver Sartor, Neeraj Agarwal, David Olmos, Antoine Thiery-Vuillemin, Przemyslaw Twardowski, Niven Mehra, Carsten Goessl, Jinyu Kang, Joseph Burgents, Wenting Wu, Alexander Kohlmann, Carrie A Adelman, Maha Hussain. Olaparib for Metastatic Castration-

Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med.*, 382(22): 2091-2102, 2020.

81. Yanling Li, Sijie Gan, Lin Ren, Long Yuan, Junlan Liu, Wei Wang, Xiaoyu Wang, Yi Zhang, Jun Jiang, Fan Zhang, Xiaowei Qi. Multifaceted regulation and functions of replication factor C family in human cancers. *Am J Cancer Res.*, 8(8): 1343-1355, 2018.
82. G Cullmann, K Fien, R Kobayashi, B Stillman. Characterization of the five replication factor C genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, 15(9): 4661-4671, 1995.
83. K Okumura, M Nogami, H Taguchi, F B Dean, M Chen, Z Q Pan, J Hurwitz, A Shiratori, Y Murakami, K Ozawa. Assignment of the 36.5-kDa (RFC5), 37-kDa (RFC4), 38-kDa (RFC3), and 40-kDa (RFC2) subunit genes of human replication factor C to chromosome bands 12q24.2-q24.3, 3q27, 13q12.3-q13, and 7q11.23. *Genomics.*, 25(1): 274-278, 1995.
84. Gregory D Bowman, Mike O'Donnell, John Kuriyan. Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. *Nature.*, 429(6993): 724-730, 2004.
85. M O'Donnell, R Onrust, F B Dean, M Chen, J Hurwitz. Homology in accessory proteins of replicative polymerases--E. coli to humans. *Nucleic*

Acids Res., 21(1): 1-3, 1993.

86. Jan P Erzberger, James M Berger. Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 35: 93-114, 2006.
87. B Guenther, R Onrust, A Sali, M O'Donnell, J Kuriyan. Crystal structure of the delta' subunit of the clamp-loader complex of E. coli DNA polymerase III. *Cell*, 91(3): 335-345, 1997.
88. George-Lucian Moldovan, Boris Pfander, Stefan Jentsch. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, 129(4): 665-679, 2007.
89. E Warbrick. The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays.*, 22(11): 997-1006, 2000.
90. Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. Structure of the C-terminal region of p21WAF1/CIP1 complexed with human PCNA. *Cell.*, 87(2): 297-306, 1996.
91. L F Fung, A K Lo, P W Yuen, Y Liu, X H Wang, S W Tsao. Differential gene expression in nasopharyngeal carcinoma cells. *Life Sci.*, 67(8): 923-936, 2000.
92. Tao Hu, Hengyang Shen, Jie Li, Peng Yang, Qiou Gu, Zan Fu. RFC2, a direct target of miR-744, modulates the cell cycle and promotes the proliferation of

CRC cells. *J Cell Physiol.*, 235(11): 8319-8333, 2020.

93. Shilong Xiong, Qian Wang, Lei Zheng, Feng Gao, Junling Li. Identification of candidate molecular markers of nasopharyngeal carcinoma by tissue microarray and in situ hybridization. *Med Oncol.*, 28 Suppl 1: S341-348, 2011.
94. Kimberley Joanne Hatfield, Håkon Reikvam, Øystein Bruserud. Identification of a subset of patients with acute myeloid leukemia characterized by long-term in vitro proliferation and altered cell cycle regulation of the leukemic cells. *Expert Opin Ther Targets.*, 18(11): 1237-1251, 2014.
95. Huimin Shen, Muyan Cai, Shanshan Zhao, Huan Wang, Mengxiong Li, Shuzhong Yao, Nan Jiang. Overexpression of RFC3 is correlated with ovarian tumor development and poor prognosis. *Tumour Biol.*, 35(10): 10259-10266, 2014.
96. Zhen-Yu He, San-Gang Wu, Fang Peng, Qun Zhang, Ying Luo, Ming Chen, Yong Bao. Up-Regulation of RFC3 Promotes Triple Negative Breast Cancer Metastasis and is Associated With Poor Prognosis Via EMT. *Transl Oncol.*, 10(1): 1-9, 2017.
97. Jian Zhang, Linlin Wang, Xiao Xie. RFC4 promotes the progression and growth of Oral Tongue squamous cell carcinoma in vivo and vitro. *J Clin Lab*

Anal., 35(5): e23761, 2021.

98. Hyun Min Jung, Seong-Jun Choi, Jin Kyeoung Kim. Expression profiles of SV40-immortalization-associated genes upregulated in various human cancers. *J Cell Biochem.*, 106(4): 703-713, 2009.
99. Simei Tu, Hao Zhang, Xiaocheng Yang, Wen Wen, Kangjing Song, Xinyi Yu, Xinjian Qu. Screening of cervical cancer-related hub genes based on comprehensive bioinformatics analysis. *Cancer Biomark.*, 32(3): 303-315, 2021.
100. Stefan J Barfeld, Philip East, Verena Zuber, Ian G Mills. Meta-analysis of prostate cancer gene expression data identifies a novel discriminatory signature enriched for glycosylating enzymes. *BMC Med Genomics.*, 7: 513, 2014.
101. Ken-Ichi Takayama, Tetsuya Fujimura, Yutaka Suzuki, Satoshi Inoue. Identification of long non-coding RNAs in advanced prostate cancer associated with androgen receptor splicing factors. *Commun Biol.*, 3(1): 393, 2020.
102. Takayama KI, Suzuki Y, Yamamoto S, Obinata D, Takahashi S, Inoue S. Integrative Genomic Analysis of OCT1 Reveals Coordinated Regulation of

- Androgen Receptor in Advanced Prostate Cancer. *Endocrinology*, 160(2): 463-472, 2019.
103. Fei Fan, Dongxiao Yao, Pengfei Yan, Xiaobing Jiang, Jie Hu. MicroRNA-744-5p inhibits glioblastoma malignancy by suppressing replication factor C subunit 2. *Oncol Lett.*, 22(2): 608-629, 2021.
 104. Zaixiong Ji, Jiaqi Li, Jianbo Wang. Up-regulated RFC2 predicts unfavorable progression in hepatocellular carcinoma. *Hereditas.*, 158(1): 17, 2021.
 105. Mi-Sun Kang, Eunjin Ryu, Seung-Won Lee, Jieun Park, Na Young Ha, Jae Sun Ra, Yeong Jae Kim, Jinwoo Kim, Mohamed Abdel-Rahman, Su Hyung Park, Kyoo-Young Lee, Hajin Kim, Sukhyun Kang, Kyungjae Myung. Regulation of PCNA cycling on replicating DNA by RFC and RFC-like complexes. *Nat Commun.*, 10(1): 2420, 2019.
 106. Mark Hedglin, Mahesh Aitha, Stephen J Benkovic. Monitoring the Retention of Human Proliferating Cell Nuclear Antigen at Primer/Template Junctions by Proteins That Bind Single-Stranded DNA. *Biochemistry.*, 56(27): 3415-3421, 2017.
 107. Jiyoung Kim, Stuart A MacNeill. Genome stability: a new member of the

- RFC family. *Curr Biol.*, 13(22): R873-875, 2003.
108. Takashi Kubota, Kohei Nishimura, Masato T Kanemaki, Anne D Donaldson. The Elg1 replication factor C-like complex functions in PCNA unloading during DNA replication. *Mol Cell*, 50(2): 273-280, 2013.
109. Shay Ben-Aroya, Amnon Koren, Batia Liefshitz, Rivka Steinlauf, Martin Kupiec. ELG1, a yeast gene required for genome stability, forms a complex related to replication factor C. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100(17): 9906-9911, 2003.
110. Göran O Bylund, Peter M J Burgers. Replication protein A-directed unloading of PCNA by the Ctf18 cohesion establishment complex. *Mol Cell Biol.*, 25(13): 5445-5455, 2005.
111. N Kouprina, E Kroll, A Kirillov, V Bannikov, V Zakharyev, V Larionov. CHL12, a gene essential for the fidelity of chromosome transmission in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.*, 138(4): 1067-1079, 1994.
112. Matan Arbel, Karan Choudhary, Ofri Tfilin, Martin Kupiec. PCNA Loaders and Unloaders-One Ring That Rules Them All. *Genes (Basel)*, 12(11): 1812, 2021.
113. Kyoo-Young Lee, Su Hyung Park. Eukaryotic clamp loaders and

unloaders in the maintenance of genome stability. *Exp Mol Med.*, 52(12): 1948-1958, 2020.

114. Negesse Mekonnen, Hobin Yang, Young Kee Shin. Homologous Recombination Deficiency in Ovarian, Breast, Colorectal, Pancreatic, Non-Small Cell Lung and Prostate Cancers, and the Mechanisms of Resistance to PARP Inhibitors. *Front Oncol.*, 12:880643, 2022.
115. Prados-Carvajal R, Irving E, Lukashchuk N, Forment JV. Preventing and Overcoming Resistance to PARP Inhibitors: A Focus on the Clinical Landscape. *Cancers.*, 14(1): 44, 2021.
116. He Li, Zhao-Yi Liu, Nayiyuan Wu, Yong-Chang Chen, Quan Cheng, Jing Wang. PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications. *Mol Cancer.*, 19(1): 107, 2020.
117. Elizabeth K. Lee, Ursula A. Matulonis. PARP Inhibitor Resistance Mechanisms and Implications for Post-Progression Combination Therapies. *Cancers (Basel).*, 12(8): 2054, 2020.
118. Junko Murai, Shar-yin N Huang, Benu Brata Das, Amelie Renaud, Yiping Zhang, James H Doroshov, Jiuping Ji, Shunichi Takeda, Yves Pommier. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res.*,

72(21): 5588-5599, 2012.

119. Annabel Quinet, Delphine Lemaçon, Alessandro Vindigni. Replication Fork Reversal: Players and Guardians. *Mol Cell.*, 68(5): 830-833, 2017.
120. Katharina Schlacher, Nicole Christ, Nicolas Siaud, Akinori Egashira, Hong Wu, Maria Jasin. Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell.*, 145(4): 529-542, 2011.
121. Beatrice Rondinelli, Ewa Gogola, Hatice Yücel, Alexandra A Duarte, Marieke van de Ven, Roxanne van der Sluijs, Panagiotis A Konstantinopoulos, Jos Jonkers, Raphaël Ceccaldi, Sven Rottenberg, Alan D D'Andrea. EZH2 promotes degradation of stalled replication forks by recruiting MUS81 through histone H3 trimethylation. *Nat Cell Biol.*, 19(11): 1371-1378, 2017.
122. Arun Mouli Kolinjivadi, Vincenzo Sannino, Anna De Antoni, Karina Zadorozhny, Mairi Kilkenny, Hervé Técher, Giorgio Baldi, Rong Shen, Alberto Ciccia, Luca Pellegrini, Lumir Krejci, Vincenzo Costanzo. Smarcal1-Mediated Fork Reversal Triggers Mre11-Dependent Degradation of Nascent DNA in the Absence of Brca2 and Stable Rad51 Nucleofilaments. *Mol Cell.*, 67(5):867-881.e7, 2017.

123. Angelo Taglialatela, Silvia Alvarez, Giuseppe Leuzzi, Vincenzo Sannino, Lepakshi Ranjha, Jen-Wei Huang, Chioma Madubata, Roopesh Anand, Brynn Levy, Raul Rabadan, Petr Cejka, Vincenzo Costanzo, Alberto Ciccia. Restoration of Replication Fork Stability in BRCA1 and BRCA2-Deficient Cells by Inactivation of SNF2-Family Fork Remodelers. *Mol Cell*, 68(2): 414-430.e8, 2017.
124. Arnab Ray Chaudhuri, Elsa Callen, Xia Ding, Ewa Gogola, Alexandra A Duarte, Ji-Eun Lee, Nancy Wong, Vanessa Lafarga, Jennifer A Calvo, Nicholas J Panzarino, Sam John, Amanda Day, Anna Vidal Crespo, Binghui Shen, Linda M Starnes, Julian R de Ruiter, Jeremy A Daniel, Panagiotis A Konstantinopoulos, David Cortez, Sharon B Cantor, Oscar Fernandez-Capetillo, Kai Ge, Jos Jonkers, Sven Rottenberg, Shyam K Sharan, André Nussenzweig. Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature*, 535(7612): 382-387, 2016.