

氏 名	おおしま まさし 大 島 将
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 693 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	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
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 藤 原 寛 行 (委 員) 教 授 田 中 亨 教 授 富 永 薫

論文内容の要旨

1 研究目的

前立腺がん(prostate cancer: Pca)はアンドロゲン依存性に増殖するがん腫であり、局所治療の再発時あるいは診断時に転移を有する場合にアンドロゲン受容体(androgen receptor: AR)シグナルを阻害するアンドロゲン遮断療法(Androgen deprivation therapy: ADT)が行われる。ADT の耐久性は症例により異なるが、やがては致死的な去勢抵抗性前立腺がん(castration-resistant prostate cancer: CRPC)に至る。CRPC に対しては新規 AR シグナル阻害薬やタキサン系抗がん剤などが使用されるが治療効果は限定的である。近年 CRPC に対する新規治療として DNA 損傷応答 (DNA damage response: DDR)を標的とした poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)阻害剤が開発され、有効な治療成績が得られている。東京都健康長寿医療センター研究所の高山らは Pca から CRPC への進展に関わる分子機序の解明のため RNA sequencing(RNA-seq)法により CRPC 特異的に発現上昇する転写産物の包括的解析を行い、その結果から Pca から CRPC への進展における DDR 関連遺伝子群の重要性を示唆していた。そこで私は DDR 関連遺伝子の CRPC における役割に注目して各種スクリーニングを行い、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を同定することを目的として研究を行った。

2 研究方法

① RNA-seq 法により Pca 組織と比較し CRPC 組織で発現上昇がみられた遺伝子群に対してパスウェイ解析[Gene Ontology (GO) 解析 / Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 解析]を行なった。またホルモン感受性 Pca (hormone sensitive prostate cancer: HSPC) モデル細胞株(LNCaP)と CRPC モデル細胞株(22Rv1)から抽出した RNA を用いたマイクロアレイ法により CRPC で発現が上昇する DDR 関連遺伝子群を抽出した。

② 抽出された遺伝子群に対して(a)公共データベースを用いた良性(Benign)、Pca、CRPC 組織における遺伝子発現量解析[Gene Expression database of Normal and Tumor tissues 2 (GENT2) / Oncomine]や予後解析[Gene Expression Profiling and Interactive Analyses (GEPIA2)] (b) HSPC と CRPC 細胞株から抽出した RNA を用いた定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) による発現量の比較 (c)RNA-seq 法に用いた検体とは異なるコホートの Benign、Pca、CRPC 組

織サンプルを用いた qRT-PCR による発現量の比較 (d)特異的な small interfering RNA(siRNA)を用いた各 DDR 関連遺伝子の発現抑制が細胞増殖へ与える影響の評価を検証し、CRPC への進展に関連する有望な候補遺伝子の絞り込みを行った。

③ 良性前立腺初代培養細胞(PrEC)や良性前立腺細胞株(RWPE)、HSPC 細胞株 (LNCaP)、CRPC 細胞株(22Rv1、PC3、DU145)のタンパク質抽出液を用いて DDR 関連遺伝子 RFC2 のタンパク質発現量を Western blot(WB)法により比較した。そして RFC2 の発現抑制が細胞増殖や DNA 損傷、アポトーシスに与える影響を細胞増殖アッセイや WB 法で評価した。

④ RFC2 の発現量と Pca の予後の関連を調査するため、Pca に対して前立腺全摘除術を施行した 103 例のコホートの組織標本を使用して免疫組織染色法(immunohistochemistry: IHC)を行った。さらに Benign と CRPC の組織標本を追加し Pca の発症と CRPC への進展に伴う RFC2 発現の変化を比較した。

3 研究成果

RNA-seq 法により Pca と比較して CRPC で発現上昇がみられた 919 遺伝子を得た。これらに対して上記①②の各種解析を行い、新たに検討したコホートにおいても Pca 組織と比較して CRPC 組織で RNA 発現量が上昇しており、公共データベースにおいても同様の結果を認め、高発現が Pca 患者の無増悪生存期間および全生存期間の予後不良因子であることから RFC2 を CRPC 進展に関わる有望な DDR 関連遺伝子として同定した。

次に RFC2 に特異的な siRNA を設計して発現抑制を行うと、CRPC 細胞株の増殖が有意に抑制され、DNA の 2 本鎖損傷やアポトーシスが増加することが示された。

さらに前立腺全摘除術を施行したコホートにおける RFC2 の IHC の結果、RFC2 の高発現は高い Gleason score(GS) ($GS \geq 8$)や病理学的 T stage(pT stage) ($pT \text{ stage} \geq pT3b$)、pN stage (pN stage = pN1)などの臨床因子との有意な相関が示された。予後解析においても、RFC2 の高発現は無増悪生存率やがん特異的生存率において高い GS や pT stage、pN stage と共に単変量解析における予後不良因子であり、これらの多変量解析においても独立した予後不良因子であることが示された。さらに Benign12 症例と CRPC15 症例の組織標本を用いて追加の IHC を実施した結果、Benign では 8.3% (1/12)、Pca では 39.8% (41/103)、CRPC では 80.0% (12/15)が RFC2 高発現であり、CRPC 患者では Pca 患者と比較して RFC2 高発現の割合が有意に高かった。

4 考察

RFC は RFC1-RFC5 の 5 つのサブユニットからなる DNA 結合タンパク質で、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などに関連する。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活性化され、がん細胞の増殖や進展、浸潤、転移などに関係することが報告されている。我々の研究結果は、知りうる限り初めて RFC2 が Pca、特に CRPC で過剰発現していることを明らかにし、RFC2 を発現抑制すると CRPC の細胞増殖が抑制され、DNA 損傷が蓄積し、アポトーシスが促進されることを明らかにした。AR 陽性 HSPC 細胞株の LNCaP と比較して AR 陽性 CRPC 細胞株の 22Rv1 で RFC2 の発現レベルが高いという今回の検証結果は、RFC2 が 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、IHC において RFC2 が Pca と比較して CRPC で発現が上昇していることは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 CRPC 細胞株の PC3 や DU145 においても発現が上昇し、RFC2 の発現抑制により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 に対しても有望な治療標的となる可能性が想定される。さらに IHC による RFC2 の Pca における発現の解析により、RFC2 高発現と Pca の組織悪性度や T stage、N stage の進展ならびに患者の予後不良との相関も示され、悪性化に関与する因子であると考えられた。治療開始前の前立腺生検標本で RFC2 の発現を評価することで、CRPC 進展リスクが高く、限局性 Pca の時点で積極的治療が必要な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。

5 結論

本研究により Pca の増殖および CRPC への進展に関わる DDR 関連遺伝子として RFC2 を同定した。RFC2 は Pca 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 の新規治療標的となる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

学位論文は、前立腺がん (Pca) において致死的な去勢抵抗性前立腺がん (castration-resistant prostate cancer: CRPC) への進展に関連する関連遺伝子を同定し、その役割について解析したものである。

論文の骨子は以下の通りである。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、さらに KEGG pathway 解析と GO term 解析を行い、DDR(DNA damage response)に関わる 7 遺伝子を抽出した。この中でホルモン感受性 Pca モデル細胞株 (LNCaP) と比較して CRPC モデル細胞株 (22Rv1) において発現上昇が認められた 6 遺伝子を前立腺がんの進行に関連するバイオマーカー候補遺伝子として同定した。これらを公共データベースを用いて絞り込み、最終的に RFC2 を CRPC に関わる有望な DDR 関連遺伝子として同定した。

次に siRFC2 を用いて RFC2 の抑制実験を行い、CRPC 細胞株の増殖が抑制されること、また DNA2 本鎖損傷のマーカーである γ H2AX の発現上昇、アポトーシスマーカーである cleaved PARP の発現も上昇を確認した。これにより、RFC2 発現を抑制すると 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。

さらに実際の臨床検体を用いて免疫染色を行い、RFC2 の高発現は、Gleason score や病期とともに予後不良因子であることを示した。また良性・Pca・CRPC における RFC2 の高発現率は、8.3%-39.8%-80.0%と段階的に上昇することを示し、RFC2 が疾患の進展に関与している可能性を示した。

本研究結果により、RFC2 が予後予測マーカーになる可能性があること、更に疾患の進展に関与している遺伝子として、治療ターゲットになる可能性があることなどを示したことから、臨床的意義もあると考えられる。内容は論理的で、各々の実験は的確に行われおり、結論も妥当である。指摘事項にも適切に修正されており、全委員一致で学位論文として相応しい内容であると判断した。

最終試験の結果の要旨

申請者が行った研究及び提出された学位論文に関するプレゼンテーション（最終試験）が行われた。研究の背景となった疾患の特徴（疫学や基本的な治療法など）、研究の動機、研究方法とその結果、更にはその意義・解釈と今後の展望に関して発表がなされた。前立腺がん（Pca）において致死的な去勢抵抗性前立腺がん（castration-resistant prostate cancer: CRPC）への進展に関連する遺伝子として、最終的に RFC2 を同定した。RFC2 は、予後予測マーカーになる可能性があること、また疾患の進展に関与している遺伝子として、治療ターゲットにもなる可能性があることなどを多角的に示した。研究は綿密に計画されたものを着実に遂行しており、論理的にも破綻のないものであった。limitation に関しても十分に理解、把握しており、今後の研究課題も明確であった。

審査委員からは、以下に示すような指摘・質問が出た。

- ・ RFC2 の発現上昇を、単に細胞増殖能の増加によるものではないとする根拠は？
- ・ 非癌の正常細胞株で si 抑制をかけた場合の増殖能はどのようにになると予想しているのか？
- ・ 22Rv1 より PC-3 の方が si による抑制効果が強く出た理由は？
- ・ RFC2 が他のサブユニットと協調して働くのか、単独で働く可能性があるのか？
- ・ 「CRPC に進展」と「悪性度の亢進」の両方の側面をできるだけ切り分けて考察すべきではないか
- ・ PARP 阻害薬と RFC2 抑制の併用実験のデータがあるのであれば、簡単なコメントの追加をすべきではないか
- ・ 内容にあわせたタイトルの変更考慮

いずれの指摘・質問にも真摯に、的確に応答し、研究者として十分な能力があることが窺われた。応答結果は、修正論文に加えられたため、最終原稿を委員全員で確認した。すべての的確に修正がなされており、全員一致で学位論文に相応しい内容であると判断し、最終試験を合格とした。