

氏 名	辻 賢太郎
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 695 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	RBM14 を軸とした前立腺癌治療抵抗性機構の解析
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 藤 村 哲 也 (委 員) 准教授 宮 川 友 明 講 師 杉 原 亨

論文内容の要旨

1 研究目的

アンドロゲン遮断療法に抵抗性を示す去勢抵抗性前立腺癌は悪性度が高く予後不良である。去勢抵抗性にはアンドロゲン非依存的なアンドロゲン受容体（AR）経路の活性化が関与することが知られているが、その機序はまだ十分に明らかにされていない。

RNA Binding Motif protein 14（RBM14）は RNA 結合蛋白の一つで、転写共役因子として複数の核内受容体を介した転写経路を活性化させる機能を持つ。近年、天然変性領域を持つ様々な蛋白が細胞内で「液-液相分離」と呼ばれる物理現象によって液滴状の緩やかな凝集体（biomolecular condensate）を形成し、転写をはじめとする種々の生命現象を制御することが明らかになり、関連分野の研究が急速に進んでいる。RBM14 も天然変性領域を介して相分離を生じ、paraspeckle などの構造体を形成することが分かっている。しかし、その意義や機能の多くは未解明であり、前立腺癌における働きも知られていない。

当研究室で以前に行った SC-3 細胞（アンドロゲン依存性マウス乳癌細胞）のマイクロアレイ解析で、アンドロゲン刺激によって Rbm14 の発現が亢進することが見出されていた。このデータと上述の知見から、RBM14 が AR 経路の活性化に寄与するという仮説を立てた。本研究では、液-液相分離や前立腺癌の去勢抵抗性とも関連づけながら、AR 経路における RBM14 の機能を解析することを目的とする。

2 研究方法

第一に、RBM14 の細胞内局在を可視化するため、GFP 標識 Rbm14 発現ベクターを作製し HEK293T 細胞に導入して蛍光顕微鏡下で観察した。液-液相分離阻害剤である 1,6-ヘキサンジオールによる処理を施した場合と、RBM14 の機能を阻害するドミナントネガティブ変異体（以下、DN Rbm14）を共発現させた場合での細胞内局在の変化を観察した。さらに、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞 PC-3 と DU145 の内因性 RBM14 の局在を蛍光免疫染色で観察した。

第二に、RBM14 の転写活性化作用を評価するため、アンドロゲン応答配列（ARE）および PSA プロモーター配列の下流にルシフェラーゼを発現するレポーターベクターを HEK293T 細胞に導入してルシフェラーゼアッセイを行った。テストステロン刺激および AR 共発現の有無による活性の変化を検討した。さらに、前立腺癌細胞 LNCaP, PC-3, DU145 に DN Rbm14 を導入して

アンドロゲン遮断状態で培養し、AR 経路の下流で発現制御される PSA の蛋白発現をウェスタンブロットで評価した。

第三に、RBM14 と AR との相互作用を検証するため、HEK293T 細胞に FLAG 標識 RBM14 と AR を共発現させて免疫沈降法を行った。さらに、RBM14 と long non-coding RNA との相互作用を検証するため、HEK293T 細胞に FLAG 標識 RBM14 を発現させて RNA 免疫沈降法を行い、回収した RNA を用いて RT-PCR を行った。

第四に、アンドロゲン遮断と RBM14 発現との関連を検討するため、アンドロゲン遮断療法後に摘除された前立腺癌組織検体を用いて RBM14 の免疫染色を行った。また、RBM14 とともに paraspeckle を構成する蛋白である NONO の免疫染色も行った。術前治療を施されていない症例を対照群とした。染色細胞割合と染色強度から発現スコアを算出し、治療群と対照群の発現スコアを比較した。

3 研究成果

HEK293T に導入した外因性 RBM14 と前立腺癌細胞の内因性 RBM14 はともにドット状の細胞内局在を示した。1,6-ヘキサンジオール処理を施すとドット状シグナルが不明瞭化し、液-液相分離を介した凝集体形成が示唆された。また、DN Rbm14 の共発現によってもドット状シグナルが不明瞭化した。

ルシフェラーゼアッセイでは Rbm14 用量依存的に ARE と PSA プロモーターを介した転写活性が亢進した。この作用はテストステロン刺激または AR 共発現がない条件下でも認められた。また、DN Rbm14 の導入によりアンドロゲン遮断状態での前立腺癌細胞の PSA 蛋白発現が低下した。

免疫沈降法では RBM14 と AR との結合が示された。また、RNA 免疫沈降法で paraspeckle の骨格である NEAT1 と RBM14 との結合が確認された。さらに、AR との結合が文献的に報告されている SRA1 や HOTAIR などの long non-coding RNA と RBM14 との結合も示された。

アンドロゲン遮断療法後の前立腺癌組織では対照群と比較して有意に RBM14 の高発現が見られた。NONO の発現には有意差を認めなかった。

4 考察

免疫沈降法とルシフェラーゼアッセイの結果から、RBM14 は AR と結合して AR 経路の転写活性を亢進させることが示された。また、この転写亢進作用はアンドロゲン刺激がない状態でも認められたため、RBM14 が去勢状態での AR 経路活性化に寄与することが示された。DN Rbm14 導入による RBM14 阻害が前立腺癌細胞の PSA 発現を低下させたこともこの仮説を支持する。アンドロゲン遮断療法後の前立腺癌組織で RBM14 の発現亢進が見られたことは、去勢状態の前立腺癌が AR 経路を維持するための代償機構を反映したものと考えられる。NONO の発現には差がなかったため、RBM14 による AR 経路活性化は paraspeckle とは独立した機能である可能性が高い。

加えて、蛍光顕微鏡所見から、RBM14 が biomolecular condensate を形成することが示唆された。近年、スーパーエンハンサーと呼ばれる DNA 領域に転写因子や転写共役因子が高密度に集積して相分離を生じ、transcriptional condensate と呼ばれる構造体を形成して転写を制御するこ

とが明らかになった。さらに、AR もこのような condensate を形成することが報告された。これらの知見を踏まえると、RBM14 は AR とともに transcriptional condensate を形成しており、その形成を促進することで AR 経路を活性化させている可能性が考えられる。また、RNA 免疫沈降法で RBM14 との結合が示された SRA1 は、核内受容体の転写コアクチベーターとして作用することが知られており、同様に transcriptional condensate の構成要素なのかもしれない。これらの仮説の検証は今後の課題である。

5 結論

RBM14 は AR および複数の long non-coding RNA と相互作用し、アンドロゲン非依存的に AR 経路を活性化させる。この作用は transcriptional condensate 形成を介したものである可能性がある。さらに、アンドロゲン遮断療法後の前立腺癌組織は RBM14 を高発現しており、AR 経路維持のための代償機構によるものと推測される。本研究の成果は、前立腺癌の去勢抵抗性獲得への RBM14 の関与を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

学位審査にて指摘された事項を図表の追加、考察の追加など適切に修正された。

本研究は液-液相分離に重要な paraspeckle の構成をなす RBM14 に着目し前立腺癌での解析を多角的に行い、去勢抵抗性前立腺癌における機能解析、新規治療標的のために重要な研究を行った。フロンティア領域の機能解析で高い独創性を有する。

最終試験の結果の要旨

学位審査委員会では全員一致して医学博士として十分な知識、プレゼンテーション能力を有すると考え、合格と判定した。