

氏 名 永澤 誠之

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 博士甲第 878 号

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

学位授与年月日 令和 2 年 9 月 9 日

学位論文題目 Long non-coding RNA MANCR is a target of BET bromodomain protein BRD4 and plays a critical role in cellular migration and invasion abilities of prostate cancer

(long non-coding RNA MANCR は、BET プロモドメイン蛋白の BRD4 の標的であり、前立腺癌において細胞の遊走能、浸潤能に重要な役割を持つ)

審査委員 主査 教授 西 英一郎

副査 教授 渡邊 嘉之

副査 教授 伊藤 靖

論文内容要旨

※整理番号	888	(ふりがな) 氏名	ながさわ まさゆき 永澤 誠之
学位論文題目	Long non-coding RNA <i>MANCR</i> is a target of BET bromodomain protein BRD4 and plays a critical role in cellular migration and invasion abilities of prostate cancer		
研究の目的:	<p>前立腺癌の多くは Androgen receptor(AR) を発現し、アンドロゲン遮断療法が有効である。しかし AR 非依存性去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) は進展が早く、多くの治療に抵抗性を示す。BET ブロモドメインタンパク質 BRD4 は、Super-enhancer (SE) に結合し、多くの癌の癌遺伝子を高発現させる。CRPC に対して、BET ブロモドメインタンパク質 BRD4 の阻害薬の有効性が検討されているが、AR 非依存性の CRPC に対する効果は限定的と考えられている。また BET 阻害薬は SE で制御される遺伝子の発現を阻害するが、前立腺癌において SE で制御される遺伝子は十分に解明されていない。今回の研究では、AR 非依存性の CRPC において SE で制御される遺伝子を解析することで、BRD4 によって制御される新規治療標的遺伝子を同定することを目的とした。</p>		
方法:	<p>SE のマーカーである H3K27ac の高い遺伝子を抽出するために、AR 非依存性の前立腺細胞株 PC3 と AR 依存性の前立腺癌細胞株 LNCaP の H3K27ac ChIP-seq データを比較し、PC3 特異的な SE 関連遺伝子を解析した。BET 阻害薬 JQ1 を投与し、PC3 特異的な SE 関連遺伝子の発現量低下に伴う表現型を検討した。次に、JQ1 投与における Transcriptome 解析から新たな治療標的となりえる遺伝子を同定した。標的遺伝子の Knockdown、Overexpression による表現型の検討と Transcriptome 解析により機序を検討した。</p>		
結果:	<p>PC3 と LNCaP、それぞれの H3K27ac ChIP-seq データを比較し、PC3 特異的に SE を形成する 792 個の遺伝子を同定した。それらの遺伝子の pathway 解析を行うと、TGFβ の下流である SMAD2/3 経路、p38 シグナル経路や HIF1α 経路といった上皮間葉転換 (EMT) に関連する遺伝子群の頻度が高いことが示された。</p>		

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

そこで PC3 を JQ1 存在下で培養したところ、Migration assay と Wound healing assay における遊走能の低下と、Invasion assay において浸潤能の低下を認めた。

新たな標的遺伝子の同定を目的として、PC3 における JQ1 処理群と Control 群における RNA-seq データを比較し、JQ1 処理群で発現が半分以下に低下する 58 個の SE 関連遺伝子を同定した。それらの中から、*Mitotically-Associated lincRNA (MANCR)* という long non-coding RNA が、JQ1 により顕著に低下することを見出した。*MANCR* は転移能が高い乳癌で発現量が高く、乳癌の細胞増殖や細胞周期に関連していることが報告されている。また前立腺癌細胞株においても、PC3 と DU145 といった AR 非依存性の前立腺細胞株でのみ発現が見られた。BRD4 の ChIP-seq において、BRD4 が *MANCR* locus に結合し、JQ1 によって結合しなくなることから、*MANCR* は BRD4 を介した SE の制御下にあると考えられた。

次に siRNA を用いて *MANCR* を低下させたところ、PC3 の遊走能、浸潤能の低下を認めた。一方、*MANCR* が低下しても、PC3 の細胞増殖の低下は認めなかった。*MANCR* が低下した細胞の RNA-seq において、発現量が低下した遺伝子を Gene ontology 解析すると、EMT 関連遺伝子群が上位をしめることが分かった。

さらに *MANCR* を発現していない LNCaP に *MANCR* overexpression をすると、遊走能、浸潤能が増加した。これらの結果から、*MANCR* が前立腺癌細胞において遊走や浸潤といった EMT を正に制御することが考えられた。

考察:

BET 阻害薬は、SE により制御される癌遺伝子の発現を阻害することで、種々の癌において抗癌作用を認める。今回の研究においては、AR 非依存性前立腺癌細胞株 PC3 で BET 阻害薬投与による遊走能、浸潤能の低下を認めた。JQ1 によって低下する SE 関連遺伝子群から long non-coding RNA *MANCR* を同定した。*MANCR* は、悪性度の高い乳癌において高発現する遺伝子として同定され、甲状腺癌、胃癌、マントル細胞リンパ腫、肝癌において細胞増殖や EMT に関連することが示されている。今回の研究では、*MANCR* が前立腺癌においては、細胞増殖ではなく遊走能や浸潤能に関連することが示された。*MANCR* の作用機序については、microRNA への結合を介するものが考えられているが、種々の癌において別の microRNA が関連している可能性が報告され、前立腺癌での作用機序についてはさらなる研究が必要と考えられる。

結論:

AR 非依存性前立腺癌細胞株 PC3 の SE 関連遺伝子は、EMT pathway に関連した遺伝子の頻度が高い。lncRNA *MANCR* は BRD4 の標的であり、前立腺癌細胞の遊走、浸潤において重要な役割を持っている。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	888	氏名	永澤 誠之
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと</p> <p>本論文では、Super-enhancer(SE)に着目し、Androgen receptor (AR) 非依存性前立腺癌細胞株における新規 SE 制御遺伝子の同定を行っている。BET プロモドメインタンパク質 BRD4 は H3K27ac を介して SE に結合し、様々な癌遺伝子の発現を上昇させることから、BET 阻害薬 JQ1 は新規抗がん薬として期待されている。そこで、多くの治療に抵抗を示す AR 非依存性前立腺癌における BET 阻害薬の効果と、新規 SE 制御遺伝子を明らかにするため検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <p>1) AR 非依存性前立腺癌細胞株 PC3 に特異的な SE 関連遺伝子は、上皮間葉転換関連遺伝子群が上位を占めた。</p> <p>2) JQ1 により、PC3 の遊走能、浸潤能は低下した。</p> <p>3) JQ1 により低下する SE 関連遺伝子から、long noncoding RNA、Mitotically-Associated lincRNA (MANCR) を選択し、その発現が PC3 の遊走能、浸潤能、EMT 関連遺伝子発現を制御することを示した。</p> <p>以上から、新規 SE 制御遺伝子 MANCR が前立腺癌細胞の転移能に関与することが示唆された。</p> <p>本論文は、AR 非依存性前立腺癌における新たな治療標的を提言したものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 592 字)</p> <p style="text-align: right;">(令和 2年 8月 25日)</p>			