

平成 31年 4月 22日

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成29年度

受付番号 188

氏名 五島 悠介

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: サンディエゴ市 (国名: アメリカ合衆国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

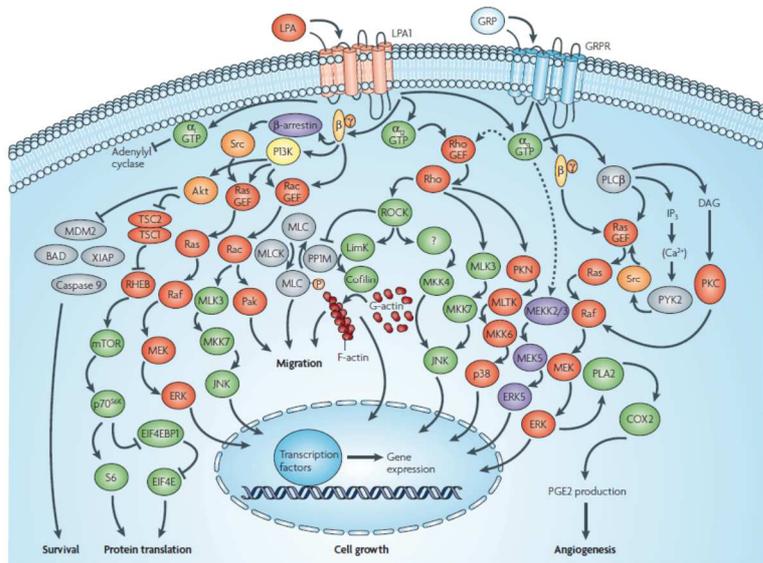
GPCR 活性化シグナル遮断による去勢抵抗性前立腺癌新規治療法の探索3. 派遣期間: 平成 29年 4月 1日 ~ 平成 31年 3月 31日

4. 受入機関名及び部局名

Moore's Cancer Center, University of California, San Diego5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式10-別紙1~4に記入の上、併せて提出すること。

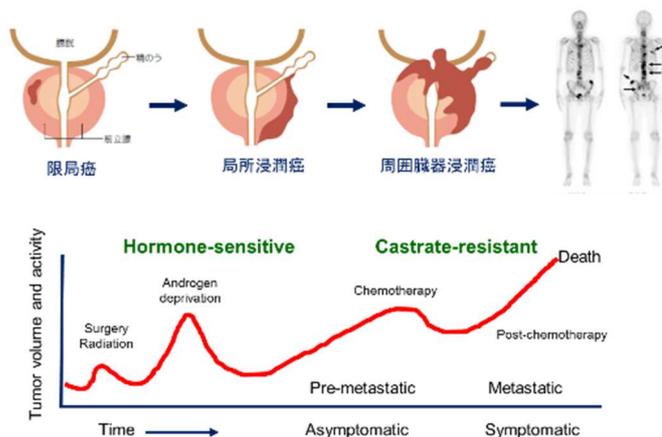


タンパク共役型受容体 (GPCR) は、7 回膜貫通型の受容体であり、細胞表面受容体でシグナル伝達に関与する最も大きな family を構成する。この family は、タンパクコード領域遺伝子の 4% を占め、800 以上の遺伝子から構成される。GPCR は多くの疾病において重要な役割を果たしており、市場に存在する治療薬のうち 25% は、直接もしくは間接的に、GPCR を標的とする薬剤であるとされる。GPCR は細胞外からの刺激を細胞内に伝達する重要な役割を持つ。GPCR はヘテロ

三量体である G タンパク (Gα、Gβ、Gγ) を介し、シグナル伝達を開始する。その下流には AKT/mTOR シグナル伝達系、MAPK シグナル伝達系、Hippo シグナル伝達系など細胞増殖、生存に大きく関与するシグナル伝達系があり、癌においても、GPCR・G タンパクの発現異常は、発癌・癌細胞浸潤・転移を来すことが分かっている。

前立腺癌は欧米で罹患率 1 位、死亡率 2 位の癌であり、近年本邦においても急激に罹患率、死亡率ともに上昇している癌である。泌尿器癌に限らず、全癌種の中でも、特に先進国において注目されている癌種である。最新の統計によると、2015 年男性の癌罹患患者数に占める割合において、前立腺癌は、胃がんを抜いて第一位となった。今後も高齢化や食生活の欧米化に伴い、罹患率・死亡率とも上昇が見込まれている。前立腺癌は、当初は 90% 以上の症例で男性ホルモン除去療法 (ADT) により治療効果が望めるが、通常、数年で治療に対する耐性機構を獲得し、血清テストステロンが低値でも進展可能である去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) となることが知られている (上図)。近年、CRPC においてもアンドロゲン感受性が残存するという事実が解明され、CRPC に対するアンドロゲン受容体を標的とした新規治療薬としてエンザルタミド、アピラテロンが本邦でも使用可能となった。しかしながら、いずれホルモン感受性を完全に失った状態となり、ドセタキセル、カバジタキセルなどの抗癌剤による治療が必要となる。ところが、CRPC に対するこれら治療薬の予後延長効果は、限定的である。

### 去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) について



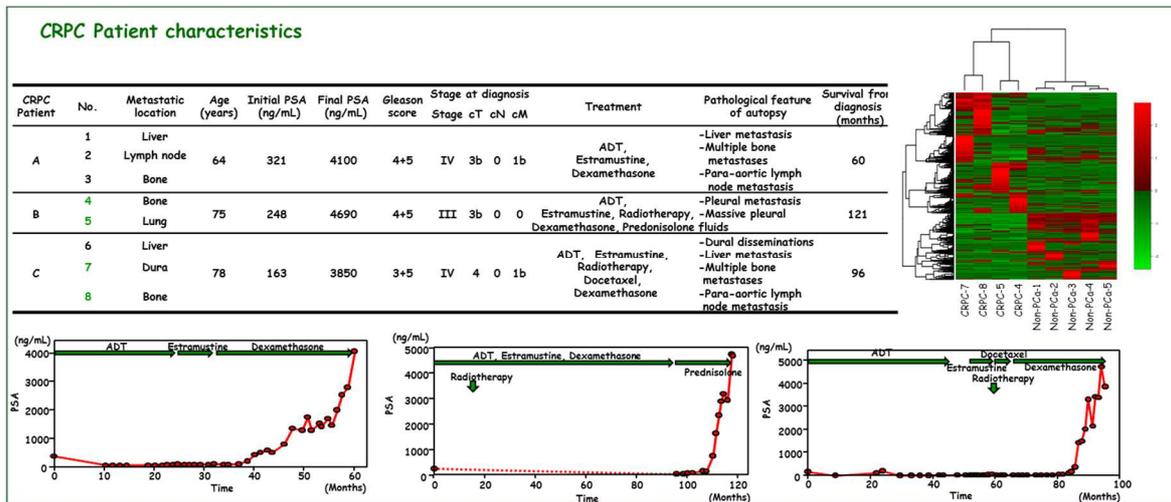
このような背景の中、本研究では、臨床的に問題となる去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) の新たな分子メカニズムの解明を目的とした。派遣先研究室は GPCR ならびに G タンパク研究において、世界トップレベルの研究実績を有する。これまでに頭頸部癌、乳癌、皮膚癌などの癌種について、GPCR 関連遺伝子の異常発現と下流シグナル伝達への影響、そして癌進展メカニズムの解明を行なっている。今回は、これら研究実績とノウハウをもとに、申請者の専門分野である去勢抵抗性前立腺癌に注目し、アンドロゲン非依存的な新たな癌進展メカニズムを解明したいと考えた。

研究の手順は、下記のような方法で行った。まず、TCGA データベースを用いて癌横断的な解析を行ない、前立腺癌で発現亢進する GPCR に着目した。さらに、公共データベースを用い、ホルモン感受性前立腺癌と比較して CRPC において発現亢進する GPCR を網羅的に抽出した。抽出した GPCR に

ついて、そのリガンドを用い、前立腺癌細胞株への効果を確認した。また、そのメカニズムを解明するため、シグナル伝達への効果を蛋白レベルで解析し、CRPC 新規治療標的を探索した。

具体的な方法・結果については未発表であり、本報告書に詳細な記入は不可能であるが、今後も継続して解析を続けていく予定としている。

また、渡米後も、日本で行っていた研究である前立腺癌を中心とした癌・マイクロ RNA 研究を継続して行い、3 報の論文を報告した。特に Goto *et al.* Impact of novel miR-145-3p regulatory networks on survival in patients with castration-resistant prostate cancer. (Br J Cancer. 2017 Jul 117(3):409-420.) では、本研究のテーマである去勢抵抗性前立腺癌における治療標的分子を報告した。



CRPC 剖検検体、ホルモン感受性前立腺癌、正常前立腺より、それぞれ RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いてマイクロ RNA 発現を解析した。

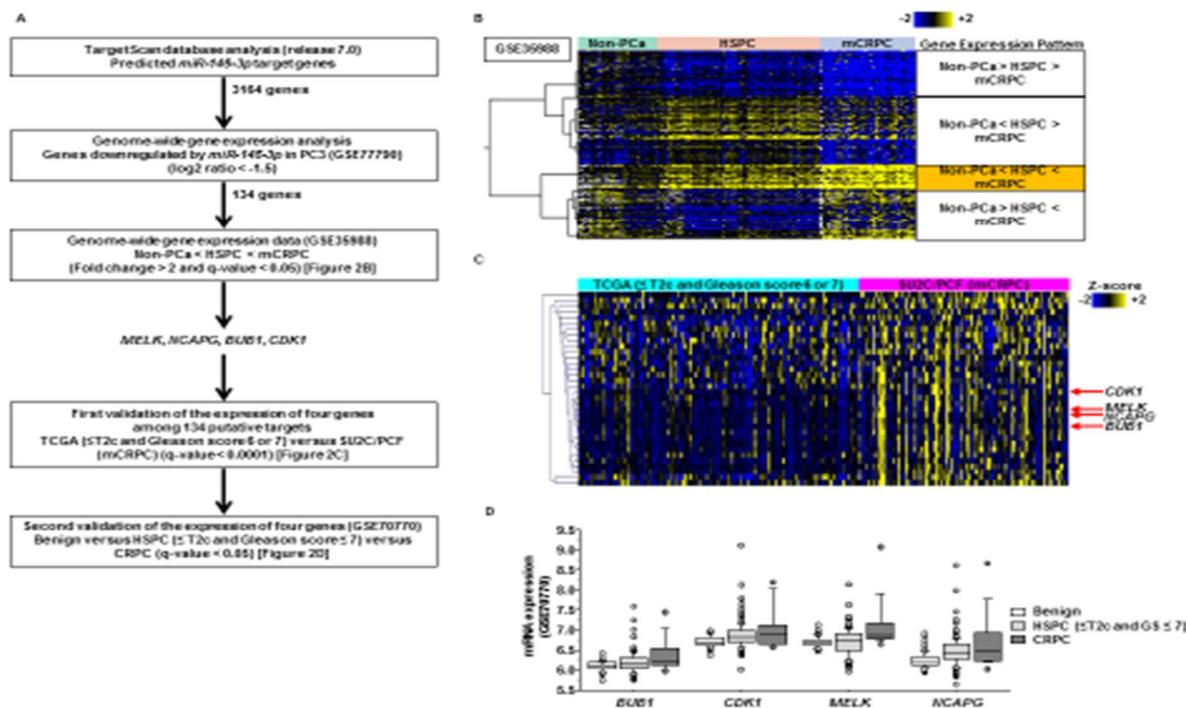
非癌組織と CRPC を比較したマイクロ RNA 発現プロファイルを作成すると miR-143/145 クラスターが含まれていた。さらに、これらマイクロ RNA については、ガイド鎖のみならず、パッセンジャー鎖も含まれることが分かった。マイクロ RNA は合成される際、二量体を形成するが、それぞれがガイド鎖とパッセンジャー鎖と呼ばれる。パッセンジャー鎖は機能せず分解され、ガイド鎖のみが RISC に取り込まれ、機能すると考えられていた。しかし、本解析により、パッセンジャー鎖も機能する可能性が示唆された。そこで、CRPC において最も発現が低下していた miR-145-3p (パッセンジャー鎖) に注目して解析を継続した。miR-145-3p を前立腺

CRPC versus non-PCA				CRPC versus HSPC			
miRNA	Locus	Log FC	FDR	miRNA	Locus	LogFC	FDR
miR-145-5p	5q32	-4.645	1.82E-31	miR-145-5p	5q32	-3.140	1.70E-05
miR-221-3p	Xp11.3	-4.220	6.96E-26	miR-125b-5p	11q24.1; 21q21.1	-2.800	7.28E-05
miR-31-5p	9p21.3	-6.354	1.89E-24	miR-1247-5p	14q32.31	-4.369	7.54E-05
miR-145-3p	5q32	-3.930	8.42E-19	miR-143-5p	5q32	-3.181	7.54E-05
miR-143-5p	5q32	-4.198	3.94E-18	miR-145-3p	5q32	-2.876	1.95E-04
miR-222-3p	Xp11.3	-4.495	8.07E-18	miR-31-5p	9p21.3	-6.095	4.08E-04
miR-221-5p	Xp11.3	-3.769	3.03E-12	miR-150-5p	19q13.33	-3.906	7.55E-04
miR-143-3p	5q32	-3.010	1.02E-10	miR-221-3p	Xp11.3	-2.534	7.55E-04
miR-125b-5p	11q24.1; 21q21.1	-3.234	1.48E-10	miR-143-3p	5q32	-2.624	1.39E-03
miR-150-5p	19q13.33	-3.454	1.75E-10	miR-490-3p	7q33	-6.969	2.41E-03
miR-6510-3p	17q12	-6.536	1.81E-10	miR-3943	7p14.1	-4.750	3.08E-03
miR-99a-5p	21q21.1	-2.790	7.83E-10	miR-9-5p	1q22; 5q14.3; 15q26.1	-5.457	3.87E-03
miR-100-5p	11q24.1	-3.157	4.32E-09	miR-100-3p	11q24.1	-3.618	4.19E-03
miR-204-5p	9q21.13	-4.540	2.11E-08	miR-100-5p	11q24.1	-2.442	4.19E-03
miR-205-5p	1q32.2	-8.408	2.89E-08	miR-196b-5p	7p15.2	-2.027	4.57E-03
miR-187-3p	18q12.1	-4.257	3.35E-08	miR-125b-1-3p	11q24.1	-2.728	4.93E-03
miR-1247-5p	14q32.31	-4.560	3.69E-08	miR-99a-5p	21q21.1	-2.097	4.93E-03
miR-490-3p	7q33	-6.626	1.08E-07	let-7c-3p	11q21.1	-3.956	5.91E-03
miR-125b-1-3p	11q24.1	-2.774	1.90E-07	miR-222-3p	Xp11.3	-2.311	6.28E-03
miR-27b-3p	9q22.33	-2.382	3.59E-07	miR-221-5p	Xp11.3	-2.562	7.24E-03
miR-455-5p	9q33.1	-2.461	5.97E-07	miR-9-3p	1q22; 5q14.3; 15q26.1	-5.538	1.22E-02
miR-100-3p	11q24.1	-3.859	1.28E-05	miR-27a-5p	19p13.12	-3.290	1.22E-02
miR-1271-5p	5q35.2	-2.082	1.37E-05	miR-125b-2-3p	21q21.1	-2.107	1.41E-02
miR-328-3p	16q22.1	-2.112	1.55E-05	miR-27b-3p	9q22.33	-1.790	1.69E-02
miR-196b-5p	7p15.2	-1.740	2.59E-05	miR-142-5p	17q22	-2.176	2.26E-02
miR-24-3p	9q22.33; 19p13.12	-1.699	5.98E-05	miR-1260b	11q21	-2.482	2.30E-02
let-7c-3p	21q21.1	-4.152	6.34E-05	miR-214-3p	1q24.3	-1.811	3.02E-02

癌細胞株 PC3, DU145 に核酸導入すると、前立腺癌細胞株の増殖、遊走、浸潤を有意に抑制し、癌抑制型マイクロ RNA として機能することが分かった。

さらに、TargetScan データベースによるマイクロ RNA 制御分子の探索を行い、GEO データベースを公共のデータベースを用いたバイオインフォマティクス解析により、miR-145-3p が制御する分子群として、MELK, NCAPG, BUB1, CDK1 を同定した。これら 4 つの遺伝子は前立腺癌の cT stage, cN stage と相関して発現亢進していた。さらに、これら 4 つの遺伝子の発現は、前立腺癌の予後因子であることが分かった。免疫染色で、CRPC 臨床検体においてこれら 4 つの遺伝子が高発現し

Figure 2



ていることを確認した。

本報告では、CRPC 臨床検体を用いて、マイクロ RNA 解析を通じて、CRPC における新規治療標的分子候補、MELK, NCAPG, BUB1, CDK1 を同定した。

このように、本派遣においては、CRPC に対する新規治療標的分子探索を目的として、多角的に疾患を捉えた解析を行なった。