

TMPRSS2-ERG 融合遺伝子を標的とした
ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドの
前立腺癌に対する抗腫瘍効果の検討

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系泌尿器科学専攻

伊藤 亜希子

修了年 2015 年

指導教員 高橋 悟

TMPRSS2-ERG 融合遺伝子を標的とした
ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドの
前立腺癌に対する抗腫瘍効果の検討

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系泌尿器科学専攻

伊藤 亜希子

修了年 2015 年

指導教員 高橋 悟

【目次】

【概要・緒言】	1
I 前立腺癌と疫学.....	1
II 既存の治療法.....	1
III 前立腺癌発生・進展におけるアンドロゲンの重要性.....	2
IV 前立腺癌特異的融合遺伝子を標的とした新規治療薬の開発にむけて.....	5
V PI ポリアミド.....	7
【目的】	9
【対象と方法】	10
I 材料.....	10
II PI ポリアミドの合成.....	10
III DNA binding assay.....	11
IV PI ポリアミドの移行性の確認.....	12
V Fluorescence in situ hybridization (FISH)	13
VI 細胞のポリアミド処理と遺伝子の発現量の定量.....	13
VII Cell proliferation assay.....	15
VIII Cell migration assay.....	15
IX ポリアミドの <i>in vivo</i> における効果の分析.....	16
【結果】	18
I PI ポリアミドの標的配列ならびに化学構造式.....	18
II 融合ポリアミドの特異的 DNA 結合能の確認 (Gel shift assay).....	18
III PI ポリアミドの核内移行性の確認.....	18
IV 融合ポリアミドによる TMPRSS2-ERG 生成への影響.....	19
V 融合ポリアミドの TMPRSS2-ERG 発現量に対する効果.....	19
VI 融合ポリアミドによる細胞増殖抑制効果の検討 (MTS assay).....	20
VII 融合ポリアミドによる細胞遊走能抑制効果の検討 (Cell migration assay).....	21
VIII 融合ポリアミドの <i>in vivo</i> における腫瘍細胞増殖抑制効果の検討.....	21
【考察】	23
【まとめ】	29
【謝辞】	30
【図・図説】	31

【引用文献】	47
【研究業績】	54

【概要・緒言】

I 前立腺癌と疫学

前立腺は男性のみにある臓器であり、精液の一部を作り、それによる精子の防御や栄養を行う役割を持つ。前立腺癌は、前立腺の外腺に発生する癌であり、様々な組織型の悪性腫瘍が生じうるが、その殆どは腺癌である。

前立腺癌による死亡数は 1975 年には年間 2000 人であった。そしてその後は増え続け、2000 年度の悪性新生物による死亡統計によると、前立腺癌による日本の総死亡者数は 7514 人であり、人口 10 万人に対する年齢調整死亡率は 8.6 で、肺癌・胃癌・肝臓癌・結腸癌・膵臓癌・食道癌・直腸癌に次いで第 8 位となっている。すなわち日本で前立腺癌は癌死亡者の約 3.5 % から 4 % を占め、近年急増傾向にあり、2020 年には男性では肺癌に次ぐ 2 位に躍り出ると予測されており、罹患者数は 7 万 8000 人から 8 万人以上、癌死亡者の割合は 10 % になると予想されている^(1,2)。

II 既存の治療法

前立腺癌は診断時の病期を基に治療方法を選択する。治療の選択肢は非常に多く、

手術療法（根治的前立腺全摘術）や放射線療法に加え、化学療法、前立腺癌の増殖に影響するホルモンの産生量をコントロールする内分泌療法、前立腺癌マーカー（prostate specific antigen ; PSA）量を経時的に計測し治療のタイミングを計る PSA 監視療法などが挙げられる。その選択には生存期間や性機能温存の問題など患者本人の考えも重要視され、例えば前立腺全摘除術の適用にあたっては、10 年以上の期待余命がある、完全切除が可能な病態である、全身状態や合併症などに問題がない等の条件を満たす必要がある。放射線療法はリンパ節転移を含む遠隔転移を有しない限局性前立腺癌の初期治療や前立腺全摘除術後のアジュバントまたは救済療法を目的に適用される。前立腺の機能温存や転移性前立腺癌を標的とした治療法として、ホルモン、特にアンドロゲンに着目した治療法が精力的に研究されてきている。

III 前立腺癌発生・進展におけるアンドロゲンの重要性

前立腺癌の増殖にはステロイドホルモンの 1 つであり男性ホルモンと呼称されるアンドロゲンとその受容体（Androgen receptor ; AR）が重要な役割を持つ。アンドロゲンには、デヒドロエピアンドロステロン、テストステロン、デヒドロテストステロン(DHT)の 3 種類がある。アンドロゲンは精巣および副腎において、コレステロー

ルから代謝・合成される。産生された副腎性アンドロゲンは去勢の影響を受けず、前立腺癌細胞において、 5α 還元酵素によりテストステロンから DHT に変換される。

DHT はテストステロンに比べ AR 内のリガンド結合領域に対する結合力が高く、前立腺細胞において主要なリガンドである。DHT と結合した AR はリン酸化され、核内に移行する。そこで、プロモーターないしエンハンサー領域内に存在する AR 結合配列 (Androgen responsive elements ; AREs) に AR 内の DNA 結合領域が結合し、標的となる遺伝子の転写を活性化させる^③(図 1)。つまり、前立腺癌の発癌・進行において、AR は重要な役割を担っており、転移性前立腺癌においてアンドロゲン除去療法が標準的な治療法となっている。

アンドロゲン除去療法は、(1) GnRH アナログ製剤もしくは両側精巣摘除術によるアンドロゲン産生抑制と(2)AR のリガンド結合を抑制する抗アンドロゲン剤を組み合わせで行われる。前立腺癌はアンドロゲン感受性に増殖することから、手術療法や放射線療法などの根治療法が適応にならない転移症例であっても、アンドロゲン除去療法により病状は改善する。局所進行癌および転移癌におけるアンドロゲン除去療法は、去勢単独療法に比べて、非再燃期間および生存期間において優れている。根治的手術や放射線療法を受けた症例における PSA 再発では非ステロイド性抗アンドロゲン薬

単独使用による補助療法も有用性が認められる。

内分泌療法の問題点は、作用が永続せず、多くが数年以内に治療抵抗性となり、いわゆる去勢抵抗性前立腺癌（Castration resistance prostate cancer；CRPC）となる点である。CRPCに変化するメカニズムの代表的なものとしては、(1)ARの過剰発現や転写協調因子の発現量の変化により、アンドロゲンに対するARの反応性が增强されるケース、(2)突然変異等を原因としてARに構造変化が起き、アンドロゲン以外の分子をリガンドとして活性化するケースが挙げられる^(4,5,6)。これまでに本邦ではCRPCに対する治療薬は細胞微小管の脱重合阻害剤であるドセタキセルのみが認められていたが、最近ARの下流シグナルを抑制する薬剤が開発されている。CRPCにおいては、細胞内に残留するアンドロゲンないし、ARの活性が癌の増殖に重要であり、これらを最大限阻害する薬剤として、コレステロールからアンドロゲンへの変換酵素CYP17を阻害する薬剤やARの核移行およびDNA、転写協調因子との結合を阻害する薬剤が開発されている。これらの薬剤は臨床試験により有効性が確認され、最近本邦でも発売となっているが、効果を示さない場合や、副作用により継続困難な症例があることも事実であり、さらなる薬剤の開発が求められているのが現状である。

IV 前立腺癌特異的融合遺伝子を標的とした新規治療薬の開発にむけて

AR シグナル経路のゴールは標的遺伝子（アンドロゲン応答遺伝子）の転写活性化である。すなわちアンドロゲン応答性遺伝子の過剰発現が前立腺癌進行の主体である。それまで、融合遺伝子は非固形癌のみに認められていたが、TMPRSS2-ERG 融合遺伝子の発見により固形がんでも融合遺伝子が発現することが初めて認められた。

近年正常な前立腺細胞において発現しているアンドロゲン応答遺伝子 Transmembrane protease serine2 (TMPRSS2) 遺伝子が、癌原遺伝子 E26 transformation specific (ETS) family の遺伝子と融合することによって、前立腺細胞におけるアンドロゲン感受性を変化させ、細胞の癌化や悪性度および癌の進行等に影響を与えていることが報告されている⁽⁷⁾。本来 ETS family 遺伝子群はアンドロゲン応答性を認めず、細胞の癌化に重要な役割を果たしている。しかし、TMPRSS2 と融合することにより ETS family の遺伝子群がアンドロゲン応答性を獲得し、発現が亢進する。ETS family の遺伝子としては、Ets-Related Gene (ERG) 遺伝子、ETS translocation variant 1 (ETV1) 遺伝子、ETS translocation variant 4 (ETV4) 遺伝子、ETS translocation variant 5 (ETV5) 遺伝子等が知られており、これらの遺伝子によってコードされるタンパク質は細胞の増殖、細胞周期、アポトーシス等の調節に作用する⁽⁸⁾。この融合遺

伝子は約半数のアメリカ人の前立腺癌組織中に認められ、特異性が高いことが知られている^(9,10)。そのため、現在アメリカにおいて尿中に含まれる同遺伝子を新規前立腺癌マーカーとして開発されている（図 2）。

染色体転座ならびに融合遺伝子の発生には AR が重要である。TMPRSS2 遺伝子と ERG 遺伝子には共通配列 TG (T or A) GGG (A or T) が存在する。この上流に AR が結合することにより、共通配列部分 (Break Fusion Site) が切断される。そして再結合される際に TMPRSS2-ERG 融合遺伝子が生成されるといわれている⁽¹¹⁾(図 3)。

TMPRSS2-ERG 融合遺伝子は、融合していない ERG を発現亢進させ、ERG は前立腺癌におけるアンドロゲン非依存性増殖の中心を担っていると言われていた遺伝子 EZH2 を活性化させる^(12,13)。従って、この TMPRSS2-ERG 融合遺伝子の生成もしくは発現を阻害することで、前立腺癌の増殖や悪性を抑制できると考えられる。

融合遺伝子の生成、発現を阻害するためには、干渉性 RNA やアンチセンス核酸を投与して、発現を不安定化することによって前立腺癌を治療する方法、癌化した細胞に細胞毒性遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを投与することによって前立腺癌を治療する方法が開発されている⁽¹⁴⁻¹⁷⁾。しかし、干渉性 RNA やアンチセンス核酸は生体内で分解されやすく、安定性が低い。また、生体内において

細胞毒性遺伝子産物を発現させる方法は、必ずしも安全とはいえず、これらの治療方法は前立腺癌の治療において十分な方法とはいえないと思われる。そこで、前立腺癌の治療に有効であり、かつ、安定で安全な物質を得るために、我が研究室で研究が行われているピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドを用いた阻害剤の開発が可能であるか検討を行った。

V PI ポリアミド

PI ポリアミドは 1996 年カルフォルニア工科大学の Dervan らにより発見された低分子有機化合物であり、DNA のマイナーグループ (狭い溝) を認識していることが分かっている^(18,19)。京都大学の杉山らは 1996 年に抗生物質であるデュオカルマイシン A とディスタマイシン A が協同的な DNA のアルキル化能を有していることを発見し、それに基づいて PI ポリアミドを基盤とした様々な機能分子を設計している⁽²⁰⁾。合成された PI ポリアミドは、ピロール(Pyrrole: Py)/イミダゾール(Imidazole: Im) ペアは G(グアニン)C(シトシン)、Py/Py ペアは A(アデニン)T(チミン)または TA、Im/Py ペアは GC を認識し、これにより任意の二本鎖 DNA に塩基特異的に結合する (図 4)。つまり、ピロールとイミダゾールの組み合わせ次第で、あらゆる遺伝子配列に対して合成すること

が可能である。標的遺伝子のプロモーターならびにエンハンサー領域内に存在する基礎転写因子や転写制御因子結合配列に特異的な PI ポリアミドを合成することにより、結合を阻害し遺伝子発現を抑制することができる(図 5)。また、既存のアンチセンス DNA、siRNA などの核酸医薬とは異なり、核酸構造を持たない低分子化合物であり生体内投与において Drug Delivery System (DDS)を必要とせず、単独投与にて細胞の核、生体内にも臓器の核に効率よく長時間取り込まれる。また PI ポリアミドは siRNA とは違い、遺伝子をノックダウンするのではなく、疾患の状態では亢進した遺伝子発現を正常レベルまで戻す遺伝子制御であり、通常の転写活性では影響しない。そのため、創薬における副作用の面で大変な利点があり、次世代の遺伝子制御薬として期待されている。

日本大学は京都大学と共同で、合成機を用いたポリアミド合成の自動化を試み、5-Chloro-1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-benzotriazolium3-oxidehexafluorophosphate (HCTU) を縮合活性化剤として用いた Fluorenyl-Methoxy-Carbonyl (Fmoc)固相合成法によりポリアミドの自動合成を成功させ、また合成費用の低減化にも成功した。これらの手法については特許化しており、酸塩化物を用いた手合成法を組み合わせることで、どのような配列の PI ポリアミドも簡便に合成することができるようになった。

【目的】

TMPRSS2-ERG 融合遺伝子発生に関わる染色体転座は前述の Break Fusion Site で発生する。様々な DNA 損傷修復因子が Break Fusion Site に結合し切断・融合させることが判明している⁽¹¹⁾。そこで、TMPRSS2-ERG 発生に関与する Break Fusion Site に結合する特異的な PI ポリアミドを設計し合成を行った。Break Fusion Site に PI ポリアミドが結合することにより、DNA 損傷修復因子の結合が阻害され、染色体転座ならびに融合遺伝子の生成抑制効果、さらにはヒト前立腺癌に対する抗腫瘍効果が期待される(図 6)。この研究により、PI ポリアミドがヒト前立腺癌に対する新規治療薬として開発可能であるか検討する。

【対象と方法】

I 材料

ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP 細胞、VCaP 細胞および PC3 細胞は、American Type Culture Collection (Rockville,MD,USA) から購入した。

LNCaP 細胞は AR 陽性・TMPRSS2-ERG 陰性、VCaP 細胞は AR 陽性・TMPRSS2-ERG 陽性、PC3 細胞は AR 陰性・TMPRSS2-ERG 陰性である。

LNCaP 細胞は 10 % ウシ胎児血清 (FBS) を補充した RPMI 1640 培地で、VCaP 細胞および PC3 細胞は 10 % ウシ胎児血清 (FBS) を補充した DMEM で培養した (21,22)。

II PI ポリアミドの合成

TMPRSS2-ERG の Break Fusion Site に配列する PI ポリアミド(図 7A) は、ペプチド合成装置 PSSM-8 (島津、京都、日本)を用いて、Fluorenyl-Methoxy-Carbonyl (Fmoc) 合成法により固相合成し、High Performance Kiquid Chromatography (HPLC) によって精製して使用した。実験の際は蒸留水に

溶解して 1 mM のストックソリューションを調整し、実験毎に希釈し使用した(図 7B)。

Break Fusion Site 配列に結合するように Fusion polyamide (融合ポリアミド) を設計・合成し、また配列部分に結合しないポリアミドを Negative control polyamide (陰性対照ポリアミド) として各実験で使用した。

III DNA binding assay

後述するように、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識したオリゴヌクレオチドを、Gel shift assay のために合成した。

TMPRSS2

5'-FITC-TGTTAAGCTGAGGGTTGTGGGAGAGTGTTTTTCACTCTCCCACAACC
CTCAGCTTAACA-3'

ERG

5'-FITC-TTCATGTTTGTGGGTGGGTGTATGTTTTTCATACACCCACCCACAAA
CATGAA-3'

TMPRSS2 と ERG の両方のヌクレオチドは、TMPRSS2 と ERG の Break Fusion

Site である配列 TG(T or A)GGG(A or T) が含まれている。

次に、1 μ M の FITC 標識したオリゴヌクレオチドをアニーリング緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 200 mM NaCl) に溶解し、3 分間 100°C でインキュベートした。その後、70 分かけてオリゴヌクレオチドを 30°C まで徐々に冷却した。これによりオリゴヌクレオチドをアニーリングして、ヘアピン構造を形成させた。このオリゴヌクレオチド溶液 15 μ l と 2 ~ 20 μ M の PI ポリアミド 5 μ l を混合し、37°C で 1 時間インキュベートした。混合物を 4 ~ 20 % アクリルアミドゲルにアプライし、1 \times Tris Borate EDTA 緩衝液中での電気泳動により分離し、蛍光イメージアナライザー LAS-4000 (富士フイルム、東京、日本) を用いて可視化した。

IV PI ポリアミドの移行性の確認

LNCaP 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、24 時間培養後、FITC-標識した融合ポリアミドまたは陰性対照ポリアミドを 5 μ M 培地に添加した。2 時間のインキュベーション後、培地をヘキスト 33342 を含んだ PBS に置換し、さらに細胞を 20 分間インキュベーション後、蛍光顕微鏡で観察した。

V Fluorescence in situ hybridization (FISH)

LNCaP 細胞を陰性対照または融合ポリアミドを投与し 72 時間後、細胞を 24 時間エタノールに溶解した 100 nM の DHT もしくはエタノールのみで刺激した。その後 TMPRSS2 (緑)及び ERG (赤色)の蛍光プローブを用いて FISH を行い、転座による TMPRSS2 と ERG 融合陽性細胞比率を 5 視野計測した。核タンパク質および DNA-FISH の単離は、Ourgenic 株式会社(徳島、日本)に委託し施行した⁽²³⁾。

プローブは下記に示す配列のものを Integrated DNA Technologies 社 (Coralville, IA, USA) に委託し合成した。

ERG

5'-Biotin-GACTCCAGGAGCGCTCCCCAGAATCCCCTTCCTTAACCCAAACTCG

AGCC-3'

TMPRSS2

5'-FITC(FAM)-GATCTTTGGAGACCCGAGGAAAGCCGTGTTGACCAAAGCAA

GACAAATG-3'

VI 細胞のポリアミド処理と遺伝子の発現量の定量

LNCaP 細胞、VCaP 細胞、PC3 細胞に対し 5 μ M の陰性対照 PI ポリアミド、1
又は 5 μ M の融合ポリアミドを投与し、24 時間後に DHT (100 nM) を投与した。
2 日間培養後、TRIZOL (Life Technologic, Carlsbad, CA) を用いて細胞よりトータ
ル RNA を抽出し、iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて
cDNA 合成を行った。それらの cDNA を用いて Power SYBR® Green Master Mix
(ライフテクノロジージャパン、東京、日本) により定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反
応 (qRT-PCR) を行い、TMPRSS2-ERG および ERG の発現レベルを分析した。陰
性対照として、逆転写酵素なしで調製された cDNA サンプルを用いた⁽²¹⁾。

プライマー配列は下記に示す通りであり、SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO,
USA) に委託し設計した^(11,24)。各条件につき 2 回実験を行い、それぞれにつき 3 回
qRT-PCR での測定を行った。

ERG

Forward: 5'- ACCGTTGGGATGAACTACGGCA-3'

Reverse: 5'- TGGAGATGTGAGAGAAGGATGTCG-3'

TMPRSS2-ERG

Forward: 5'- AGCGCGGCAGGTTATTCCA-3'

Reverse: 5'- ATCATGTCCTTCAGTAAGCCA-3'

VII Cell proliferation assay

細胞増殖速度は、CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega社, Madison, WI, USA) を用いてMTS assayを用いて測定した⁽²⁵⁾。LNCaP細胞、VCaP細胞、PC3細胞の5,000細胞/ウェルを96ウェルプレートに投与し、1 μ Mあるいは5 μ Mの融合ポリアミドもしくは陰性対照ポリアミドを投与し24時間、48時間、および96時間培養しMTS assayにより細胞の生存率を調べた。その際、LNCaP細胞を2.5 % charcoal-stripped FBSを補充した phenol red-free RPMI 1640培地で、PC3細胞とVCaP細胞をDMEMで培養した。各条件は四連のウェルで試験し、各実験を少なくとも2回繰り返した。

VIII Cell migration assay

LNCaP細胞50,000個を10 % FBSを含有するRPMI 1640培地300 μ lに懸濁させ、1 μ Mあるいは5 μ Mの融合ポリアミドもしくは陰性対照ポリアミドを投与し、

fibronectin を塗布した上部チャンバーに添加した。5 % CO₂ 下、37 °C で 24 時間インキュベートした後、フィルタ下面上の細胞を 30 分間メタノールで固定した。次いで、30 秒間ギムザ溶液（武藤化学、東京、日本）で染色し、下面の細胞を顕微鏡下で 200 倍の倍率で少なくとも 5 視野計数した⁽²⁵⁾。VCaP 細胞、PC3 細胞においても DMEM 培地で同様に行った。

IX ポリアミドの *in vivo* における効果の分析

3x10⁶ 個の LNCaP 細胞を、7 週齢の雄ヌードマウス (n = 12) の各側に皮下注射した。腫瘍サイズが 100 mm³ に達したときに、蒸留水に溶解した融合ポリアミドまたは陰性対照ポリアミドを 6 mg/kg 体重、週 1 回、4 週間にわたって、経尾静脈投与した。腫瘍の大きさは、最終投与の 1 週間後まで毎週測定した。その後、動物を解剖して腫瘍組織を回収し、一部は 10 %ホルマリン中で保存し、残りは凍結保存した。ホルマリン固定した組織をパラフィン包埋した後、切片を作成し、HE 染色および免疫組織染色を行った⁽²⁴⁾。1 次抗体はウサギ抗ヒト切断型カスパーゼ-3 ポリクローナル抗体 (1 : 100 希釈) を用い、2 次抗体として Histofine Simple Stain MAX-PO (ニチレイ、東京、日本) を用いた。

統計分析

データは平均±標準偏差もしくは平均値±平均値の標準誤差として示した。各群の結果とそれに対応するコントロールとの間の統計的差異は、Student's t 検定を用いて評価した。P < 0.05 を統計学的有意差ありとした。

【結果】

I PI ポリアミドの標的配列ならびに化学構造式

融合ポリアミドを TMPRSS2 と ERG の Break Fusion Site に結合するように設計した。これらの部位に結合しない陰性対照ポリアミドは、対照として用いた (図 7A、B)。

II 融合ポリアミドの特異的 DNA 結合能の確認 (Gel shift assay)

DNA を標的とするポリアミドの結合親和性および特異性を決定するために、Gel Shift Assay を行った。融合ポリアミドとインキュベートした場合 TMPRSS2 または ERG の Break Fusion Site を含むオリゴヌクレオチドは、泳動遅延を示し、一方、陰性対照ポリアミドとインキュベートしたヌクレオチドは、明確な泳動遅延を示さなかった。また、融合ポリアミド投与によるシフト移動の程度は、用量依存的であることが示された (図 7C)。

III PI ポリアミドの核内移行性の確認

ポリアミドの細胞内分布を調べるために、5 μ M の FITC-標識された融合ポリアミドおよび陰性対照ポリアミド存在下で LNCaP を 2 時間培養し、蛍光顕微鏡で観察したところ、核染色試薬であるヘキスト 33342 と同様の染色パターンを示したことから、PI ポリミドの核内移行性が確認された (図 8)。

IV 融合ポリアミドによる TMPRSS2-ERG 生成への影響

100 nM の DHT 刺激により LNCaP における融合遺伝子 TMPRSS2-ERG の発現が誘導されることが報告されている^(11,26-28)。本研究においても、同様のプロトコルで細胞を刺激し、融合ポリアミドが TMPRSS2-ERG 融合遺伝子の生成や発現に影響を与えるかどうか検討した。染色体転座への影響を調べるために TMPRSS2, ERG を検出するプローブを用いて FISH 解析を行ったところ、陰性対照ポリアミドを投与した LNCaP 細胞においては、DHT 刺激後、TMPRSS2 と ERG の共局在を示す細胞数が有意に増加した。一方、この DHT 刺激による染色体転座は、融合ポリアミド投与群にて大幅に減少した(図 9)。

V 融合ポリアミドの TMPRSS2-ERG 発現量に対する効果

VCaP 細胞は通常状態では有意に TMPRSS2-ERG 融合遺伝子を発現しているが、LNCaP 細胞は DHT 刺激を行った場合のみ検出可能なレベルでその発現が観察された。また、PC3 細胞では融合遺伝子の発現は観察されなかった。さらに、融合遺伝子の発現レベルを real time PCR にて調べたところ、5 μ M 融合ポリアミド投与下では 5 μ M 陰性対照ポリアミドと比較して有意に発現が抑制されていた。恒常的に TMPRSS2-ERG 融合遺伝子を発現している VCaP 細胞においては融合ポリアミドによる融合遺伝子の発現抑制効果は観察されなかった(図 10A)。

また、融合ポリアミドが内因性 ERG 遺伝子発現を抑制するかを調べたところ、融合ポリアミド投与下では LNCaP 細胞における ERG の mRNA 発現レベルを減少させることを確認した (図 10B)。また、融合ポリアミドによる TMPRSS2 の発現への影響のないことは確認している。

VI 融合ポリアミドによる細胞増殖抑制効果の検討 (MTS assay)

前立腺癌細胞の増殖能に対する融合ポリアミドの効果を評価するために、MTS assay による細胞生存率の定量を行った⁽²⁵⁾。1 および 5 μ M 融合ポリアミドで処理した LNCaP 細胞は、陰性対照ポリアミドで処理した細胞と比較して、DHT 処置の 96

時間後、細胞増殖の有意な減少を示した ($p < 0.05$ 、図 11)。また、MTS assay は融合ポリアミドが AR 陰性および TMPRSS2-ERG 陰性前立腺癌細胞株 PC3 細胞と VCaP 細胞における細胞増殖に影響しなかったことを明らかにした (図 11)。

VII 融合ポリアミドによる細胞遊走能抑制効果の検討 (Cell migration assay)

Cell migration assay を行い、LNCaP 細胞の遊走能に対する融合ポリアミドの効果の評価した。融合ポリアミド処理細胞は陰性対照処理細胞ポリアミドと比較して、細胞遊走を有意に減少させた ($p < 0.0001$ 、図 12)。一方、VCaP 細胞および PC3 細胞においては、融合ポリアミドによる遊走能の抑制は観察されなかった(図 12)。

VIII 融合ポリアミドの *in vivo* における腫瘍細胞増殖抑制効果の検討

融合ポリアミドの *in vivo* における効果を検討するために、胸腺欠損雄マウス皮下に LNCaP 細胞を移植し、融合ポリアミドまたは陰性対照ポリアミドを 1 ヶ月間、週 1 回の頻度で経尾静脈投与した。腫瘍の大きさを経時的に計測したところ、腫瘍増殖は陰性対照ポリアミドで処置したマウスと比較して、融合ポリアミドで処置したマウスにおいて有意に減少した (図 13A、B)。

また、腫瘍組織における Cleaved caspase 3 の発現を調べたところ、融合ポリアミドで処置したマウス由来の LNCaP 異種移植片において増加する傾向にあった (図 13C)。この結果から、融合ポリアミド投与により腫瘍組織においてアポトーシスが誘導され、腫瘍増殖が抑制されている可能性が示唆された。

【考察】

アンドロゲンにより媒介される AR シグナル伝達の活性化は、癌の進行を促進する。

いくつかの研究では、AR 発現は Gleason 分類、臨床病期、リンパ節転移、被膜外浸潤、および精嚢浸潤を含む標準的な臨床および病理学的パラメーターと相関していることを示している^(29,30)。前立腺癌における ETS ファミリーと TMPRSS2 の融合の報告は前立腺癌の研究で新しいフィールドを開いたといえる^(7,9,31-35)。

前立腺癌の約 80 %に、ゲノム TMPRSS2 と ETS ファミリー転写因子メンバーとの融合遺伝子が観察されており、さらに、これらのうち約 50 %が TMPRSS2-ERG 融合遺伝子である^(36,37)。また、AR による TMPRSS2-ERG の発現は不良な臨床転帰と関連することが報告されている^(38,39)。

以前、DNA の相同組換えに関与する一部の遺伝子を標的とした低分子干渉 RNA (siRNA) によって、融合遺伝子の発現が阻害されることが報告されている⁽¹¹⁾。さらに、TMPRSS2-ERG 融合転写物のうち最も一般的なアイソフォームを標的とする siRNA は効率的に生体内の前立腺癌の増殖を抑制するとの報告もある⁽⁴⁰⁾。これらのデータは、TMPRSS2-ERG 融合遺伝子の形成や発現の阻害が、前立腺癌に対する良

好な治療法となり得ることを強く示唆しているといえる。したがって、**TMPRSS2-ERG** 発現のメカニズムを抑制することは、治療開発のために重要な意義を持つと考える。そこで、本研究では、融合遺伝子の形成または発現を抑制する新規化合物の開発と前立腺癌の増殖に対する同化合物の効果を評価することを試みた。

siRNA は効果的に特異的な遺伝子の発現を抑制することができる反面、ヌクレアーゼによって簡単に分解されるという難点があり、その生体への適用が困難である。その反面、**PI** ポリアミドの最も重要な利点の 1 つは、ヌクレアーゼおよびプロテアーゼによる生物学的分解に耐性であることである。さらに、特定の薬物輸送システムを必要とせずに細胞に取り込まれ、核に輸送できる点も利点である。加えて、**PI** ポリアミドは、高い親和性および配列特異性で二重らせん DNA の副溝に結合することにより DNA-タンパク質の相互作用を阻害することができる^(41,42)。また、もう一つの重要な利点は、マウスおよびラットに投与した際に、**PI** ポリアミドの静脈内、皮下、腹膜注射は重大な健康障害を起こさないことである^(22,43-45)。**Raskatov** らは、環状形態の **PI** ポリアミドの 120 nmol/マウス (4.5 ~ 7 mg/kg 体重) の腹腔内または皮下投与が、マウスに対する急性毒性作用を持っていたことを報告した。しかしながら、今回の研究で用いたのと同じヘアピン型の **PI** ポリアミドは、同じ用量において任意

の毒性効果を有しないことが確認された⁽⁴⁶⁾。また、Yang らは RNA ポリメラーゼ II を標的とした PI ポリアミドの皮下注射は、DNA を損傷することなく、LNCaP 異種移植片の成長の減少をもたらしたことを報告した⁽⁴⁴⁾。

そこで、本研究においては、DNA 二本鎖切断を阻害し TMPRSS2-ERG 融合遺伝子の生成を抑制させることを目的として、Break Fusion Site に結合する PI ポリアミドを設計し、その機能解析を行った。今回得られたデータは、この融合ポリアミドが TMPRSS2-ERG 融合遺伝子の形成と発現を抑制することを示した。

また、内因性 ERG 発現および細胞増殖を抑制することを *in vitro* で、また、細胞のアポトーシスを誘導することを *in vivo* で確認した。

興味深いことに、融合ポリアミドによる *in vivo* での細胞増殖能の抑制効果は、*in vitro* においてよりも効果があるように思えた。その理由として TMPRSS2-ERG が癌細胞そのものだけでなく、細胞外微小環境の状態に影響を与えている点にあると考える。最近の研究では、前立腺癌における TMPRSS2-ERG 融合遺伝子の発現は、癌の進行に関連する腫瘍微小環境を変化させ、細胞の遊走活性に影響を与えることが示されている⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾。例えば、TMPRSS2-ERG 融合遺伝子発現レベルが高い前立腺癌組織は、血管密度、ヒアルロン酸、フォン・ヴィレブランド因子および PDGFR β の増加、

およびカベオリン-1の減少が観察された。また、*in vivo*での前立腺癌細胞の増殖は微小環境に依存するとの報告もある^(50,51)。これらの事実は、*in vitro*と*in vivo*における融合ポリアミドの効果の違いは細胞外基質の有無に帰することができる可能性を示唆している。

また、今回の研究において、融合ポリアミドが融合遺伝子のみならず ERG の発現も抑制することを確認した^(52,53)。ERG 遺伝子のプロモーターには融合ポリアミドの結合サイトがないことから、二次的な作用により ERG の発現低下が起こったと考えられる。近年、TMPRSS2-ERG 融合遺伝子産物が ERG 座に結合し、ヒト前立腺癌野生型 ERG 発現を促進することが報告されているため、融合ポリアミドによる TMPRSS2-ERG 融合遺伝子の発現低下が ERG の発現低下を導いたと考える⁽⁵⁴⁾。内因性 ERG 発現の減少は、前立腺癌細胞の進行を防止し、また、ERG の過剰発現は臨床的限局性前立腺癌の 38 %、さらに TMPRSS2-ERG 融合遺伝子陽性の転移性前立腺癌 27 %で観察された⁽⁵⁴⁾。前立腺組織における内因性 ERG 発現は、生化学的再発および予後不良と相関すること、前立腺癌検体における ERG の過剰発現は、積極的監視中における進行の強力な予測因子であることなどを考え合わせると、融合ポリアミドは TMPRSS2-ERG の発現抑制とそれに伴う ERG の発現抑制の両方のメカニズムを介して抗腫瘍効果を示した可能性が考えられた。しかし、DHT 刺激によって TMPRSS2-ERG の発現が増加したにもかかわらず、TMPRSS2-ERG の標的遺伝子 ERG の DHT 依存性の発現増加は認められなかった(図 10B)。融合ポリアミドによる ERG の発現抑制に関しては、off targeting 効果の可能性もあり、今後の検討が必要

である。

本研究では **TMPRSS2-ERG** 融合遺伝子の形成を防止し、LNCaP 細胞の *in vitro* における増殖、遊走ならびに *in vivo* での腫瘍増殖を阻害することができる PI ポリアミドを開発することができた。そして、このポリアミドは **TMPRSS2-ERG Break Fusion Site** を標的としており、今回得られた結果は、AR-依存性融合遺伝子の形成において重要な役割を有する **Break Fusion Site** が、前立腺癌のための新規治療ターゲットとなりうることを示した。

本研究により、PI ポリアミドの遺伝子治療としての有用性が示唆された。マウスで有意な抗腫瘍効果が認められたため、今後はマーマセットなどのよりヒトにゲノム構造が近い実験動物を用いて前臨床試験を行い、同等な効果が認められるかさらなる研究が必要であると考ええる。また、副作用の問題として同じ配列を持つ他のゲノム領域に結合し、想定していない遺伝子の抑制が生じる、いわゆる **off targeting effect** についても追加研究が必要である。

今後、責任因子は分かっているが、未だ治療薬のない難治性疾患に対し PI ポリアミドを自由に分子設計し、遺伝子治療として抗生物質と同じように投与することによって治療する事ができると期待される。更に、PI ポリアミドにより、ある特定の転写因子の二本鎖 DNA への結合を阻むことができるため、様々な生体现象を制御する核内レセプターなど、現在非常に注目を集めている分野の研究において応用することが可能であると考ええる。PI ポリアミドを既知の転写因子、核内レセプターなどの認識

配列に特異的に結合させ、ターゲット因子の結合の阻害を行うことで、それぞれの因子の機能をロックダウンした状態を作成することができる。このようなターゲットの機能を解析することを目標とした PI ポリアミドを順次作成することで、これらのターゲット因子の機能を解析して各疾病における役割を明らかとし、さらに創薬へとつなげる研究として開発できるのではないかと考える。PI ポリアミドを様々な転写因子、核内レセプターなどの遺伝子転写調節研究のための道具として実用化することができれば、ゲノム化学分野の研究は飛躍的に発展すると考えられる。

このことは様々な疾患で苦しむ患者の未来に明るい光を照らし出してくれるのではないかと考える。

【まとめ】

本研究では、TMPRSS2-ERG の Break Fusion Site に注目し、その配列に結合する特異的な PI ポリアミドを設計し、ヒト前立腺癌細胞に対するその効果を検討した。我々の研究は、この PI ポリアミドは、アンドロゲン感受性の LNCaP 前立腺癌細胞の腫瘍の成長を抑制していることを確認した。

配列特異的 PI ポリアミドは前立腺癌に対して有意な遺伝子制御薬になりうると考えられた。

【謝辞】

本研究の機会を遂行するにあたりまして、親切丁寧な御指導、ご鞭撻を賜りました日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野主任教授 高橋悟博士に謹んで感謝の意を表します。また、本研究を行うにあたり、環境を与えて頂き、親身な御指導、貴重な御助言を賜りました日本大学医学部内科学系総合内科総合診療医学分野主任教授 相馬正義博士、日本大学大学院総合科学研究科生命科学教授 福田昇博士、日本大学医学部内科学系総合内科総合診療医学分野 藤原恭子博士、東京大学大学院医学系研究科抗加齢医学講座特任教授 井上聡博士、東京大学大学院医学系研究科抗加齢医学講座特任講師 浦野友彦博士、東京大学医学部附属病院老年病科 高山賢一博士、東京大学医学部附属病院泌尿器科講師 藤村哲也博士、日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野助教 山口健哉博士、日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野助教 大日方大亮博士、日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野 芦荻大作博士、村田保貴博士、千葉県がんセンター研究所 永瀬浩喜博士、渡部隆義博士に心から感謝申し上げます。また、本研究にあたり細胞培養をはじめ、各種解析の御指導、ご鞭撻を賜りました日本大学医学部内科学系総合内科総合診療医学分野の皆様へ深く感謝申し上げます。そして日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野の皆様へ深く感謝申し上げます。最後に、物心両面にわたり援助を頂いた両親に深く感謝致します。

【図・図説】

前立腺癌におけるアンドロゲン受容体(AR)の役割

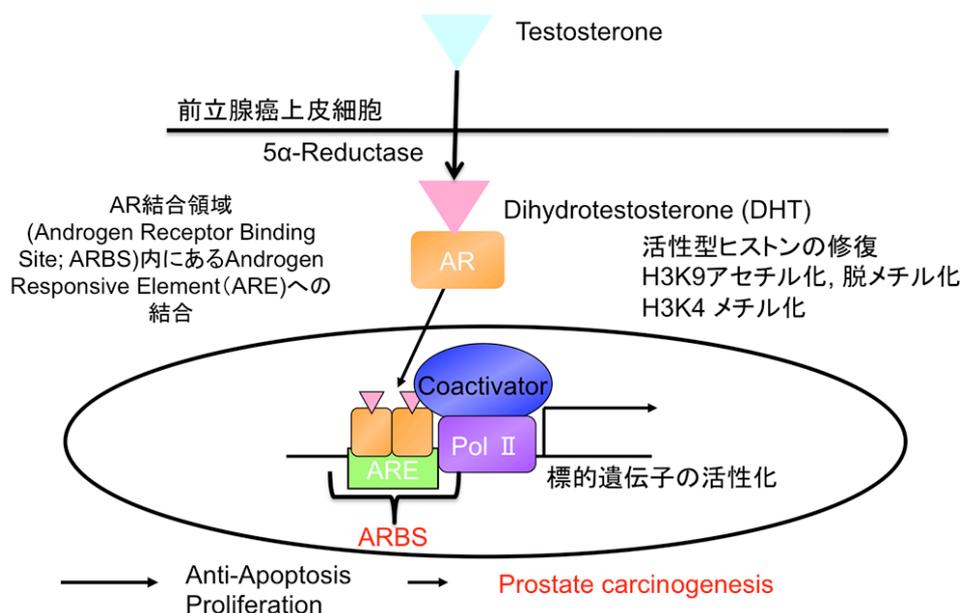


図1 前立腺癌細胞内でのアンドロゲン受容体の役割

テストステロンは前立腺癌細胞において、5α還元酵素によりテストステロンからDHTに変換される。DHTと結合したARはリン酸化され、核内に移行する。そこで、プロモーターないしエンハンサー領域内に存在するAR結合配列(Androgen responsive elements; AREs)に結合し、標的となる遺伝子の転写を活性化させる。

前立腺癌特異的融合遺伝子 TMPRSS2-ERG

前立腺癌特有の染色体異常として、TMPRSS2 を5'上流に ETSファミリー遺伝子群のうち一つが3'下流に融合することが2005年に報告された。
(Tomlins et al. Science 2005)

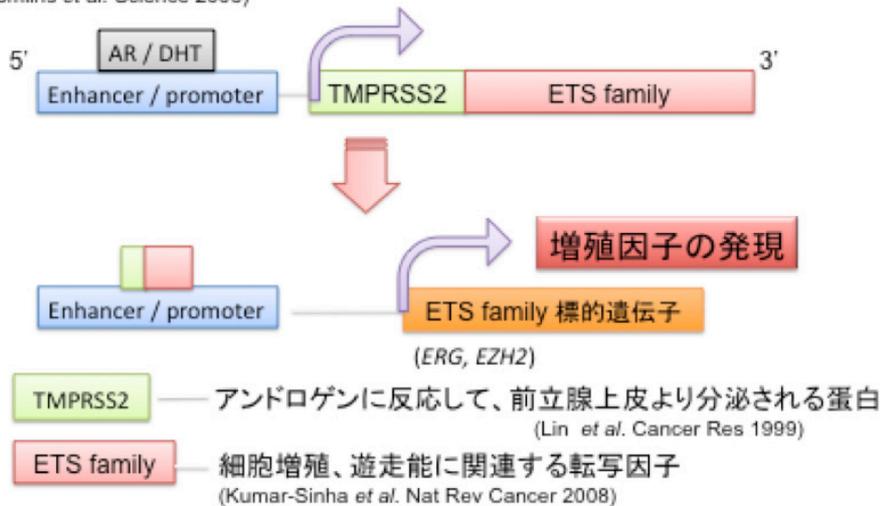


図 2 前立腺癌特異的融合遺伝子(TMPRSS2-ERG)

正常な前立腺細胞において発現しているアンドロゲン応答遺伝子 TMPRSS2 遺伝子が、細胞の癌化に重要な役割を果たしている ETS family の遺伝子と融合することによって、前立腺細胞におけるアンドロゲン感受性を変化させ、細胞の癌化や癌の悪性度の進行等に影響を与えている。つまり、この融合により本来アンドロゲン応答性を有さない ETS family 遺伝子群がアンドロゲン応答性を獲得し、アンドロゲン依存性に増殖因子の発現が生じる。

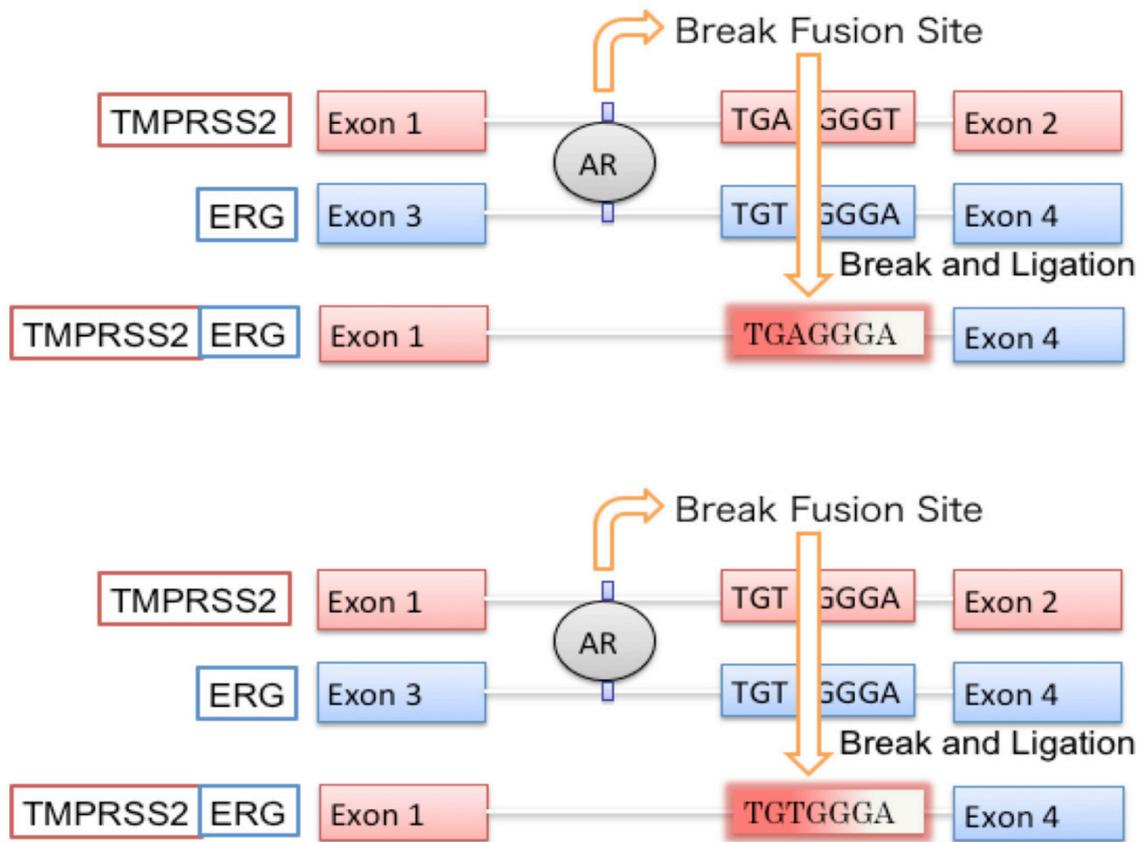


図3 融合遺伝子 TMPRSS2-ERG の生成機構

TMPRSS2 遺伝子と ERG 遺伝子には共通配列である TG(T or A)GGG(A or T)の上流に AR が結合することにより共通配列部分 (Break Fusion Site) が切断される。そして再結合される際に TMPRSS2-ERG 遺伝子が生成されるといわれている。

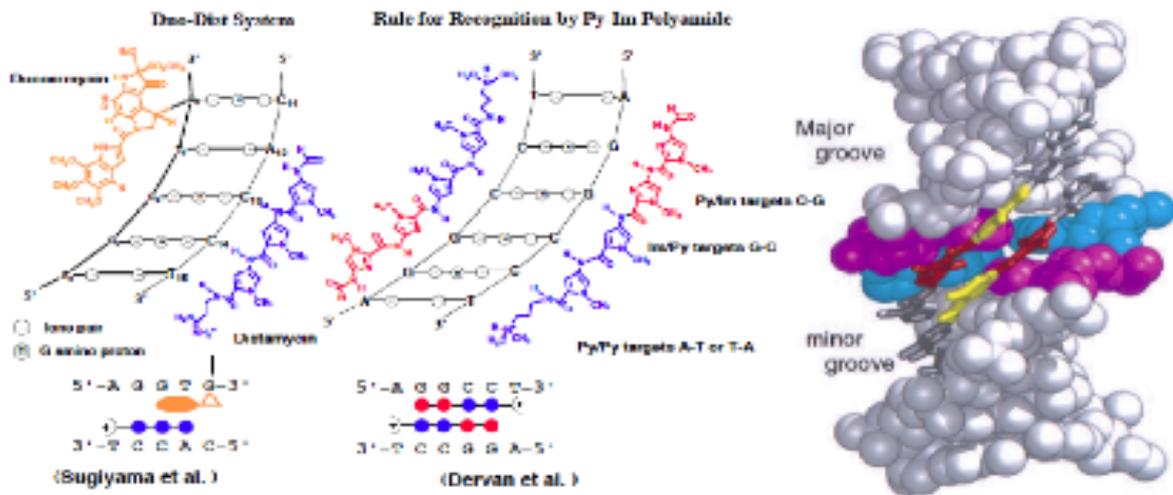


図4 PI ポリアミドによる2本鎖 DNA の塩基配列認識とマイナーグループへの結合

PI ポリアミドは、DNA 二重らせんのマイナーグループに配列特異的に結合する性質を持つ。ピロール(Pyrrole: Py)/イミダゾール(Imidazole: Im) ペアは G(グアニン)C(シトシン)、Im/Py ペアは GC、Py/Py ペアは A(アデニン)T(チミン)または TA を認識し、結合する。

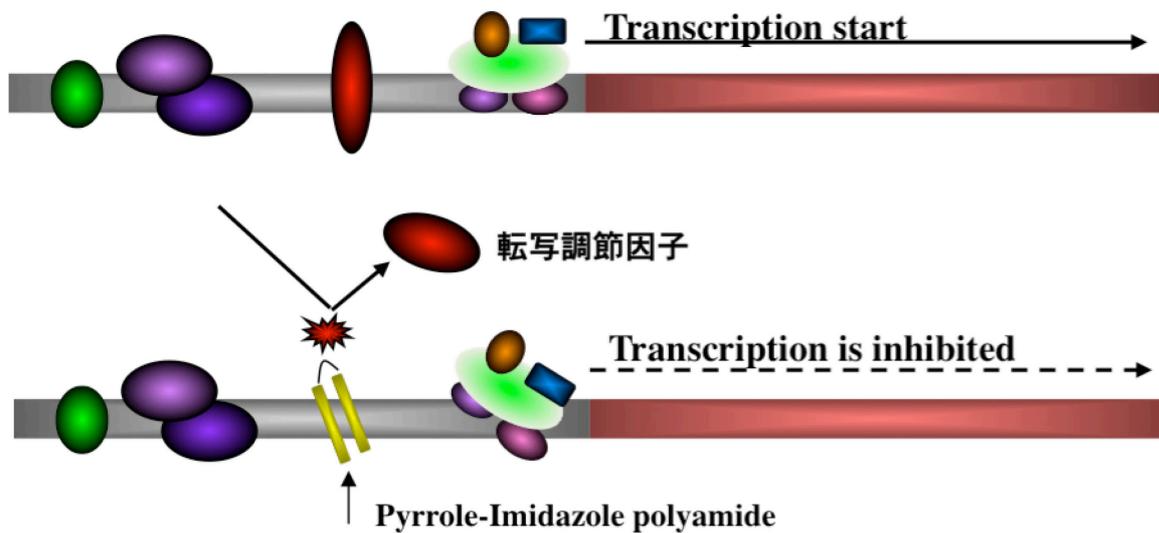
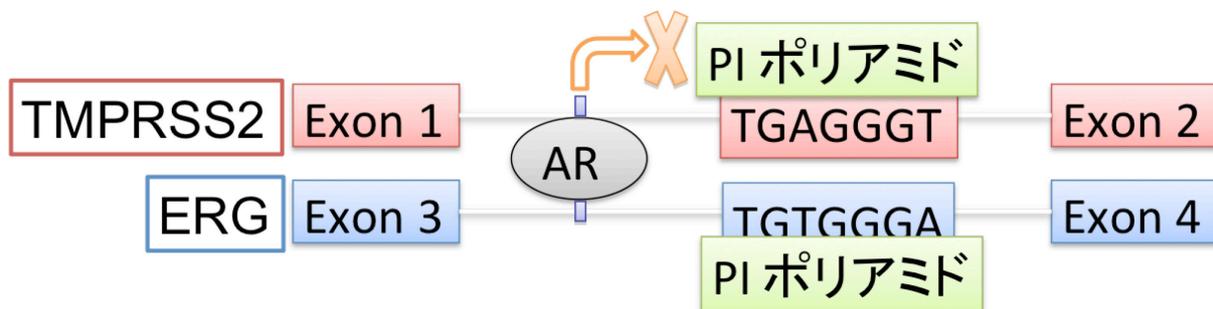


図5 PIポリアミドによる転写因子結合阻害での遺伝子転写活性抑制の原理

PIポリアミドは、組み合わせ次第で、あらゆる標的遺伝子に対して合成することが可能であり、発現に関連する基礎転写因子や転写制御因子の結合を阻害し、遺伝子発現を抑制することができる。



切断/再結合の抑制

図6 TMPRSS2-ERG の Break Fusion Site に結合する特異的な PI ポリアミド

TMPRSS2-ERG の Break Fusion Site に結合する特異的な PI ポリアミドにより、同配列を介した染色体切断・再合成が抑制される。

(A) Fusion polyamide target sequence

TMPRSS2

5' -TAAGCTGAGGGTTGTGGGAGAGT-3'

3' -ATTGCTGACTCCCAACACCTCTCA-5'

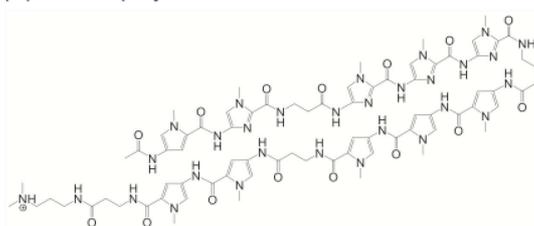
ERG

5' -TACGTAAGTGTGGGATCTGGTTTT-3'

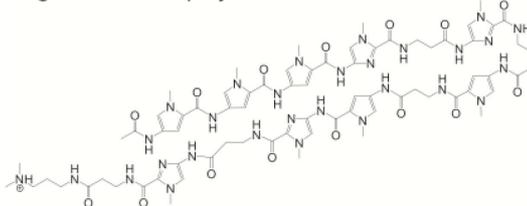
3' -ATGCATTGACACCCAAGACCAAAA-5'

○: *N*-methylpyrrole (Py), ●: *N*-methylimidazole (Im), β: Beta-alanine

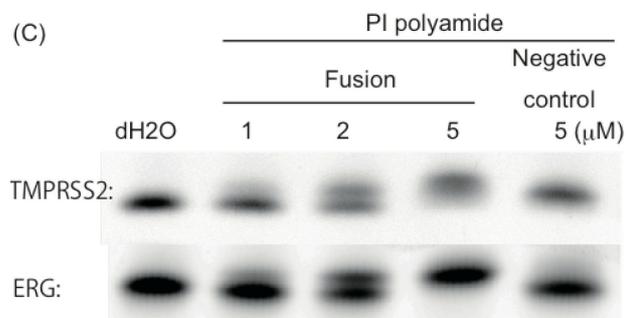
(B) Fusion polyamide



Negative control polyamide



(C)



Obinata et al. Cancer Sci 2014

図7 ポリアミドの構造と DNA Binding Assay

(A) TMPRSS2 と ERG 内の Break Fusion 配列およびそれを標的とする (PI) ポリアミドの結合様式

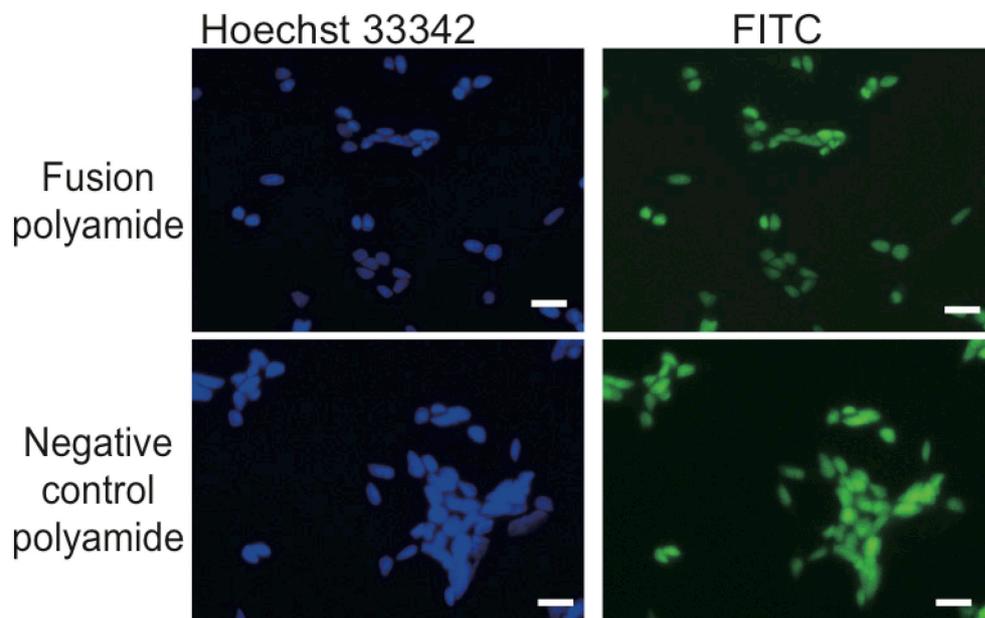
ピロールイミダゾール (PI) ポリアミド(融合ポリアミド)は TMPRSS2 と ERG の Break Fusion Site に結合するように設計した。

(B)融合ポリアミドおよび陰性対照ポリアミドの構造

PI ポリアミドは固相法を用いて合成し、高速液体クロマトグラフィー (0.1 % AcOH/CH₃CN、0 ~ 66 % の直線勾配、0 ~ 20 分、254 nm、CHEMCOBOND5-ODS-H カラムを介して) によって精製した。

(C)融合ポリアミドの標的配列特異的結合能のゲルシフトアッセイによる確認

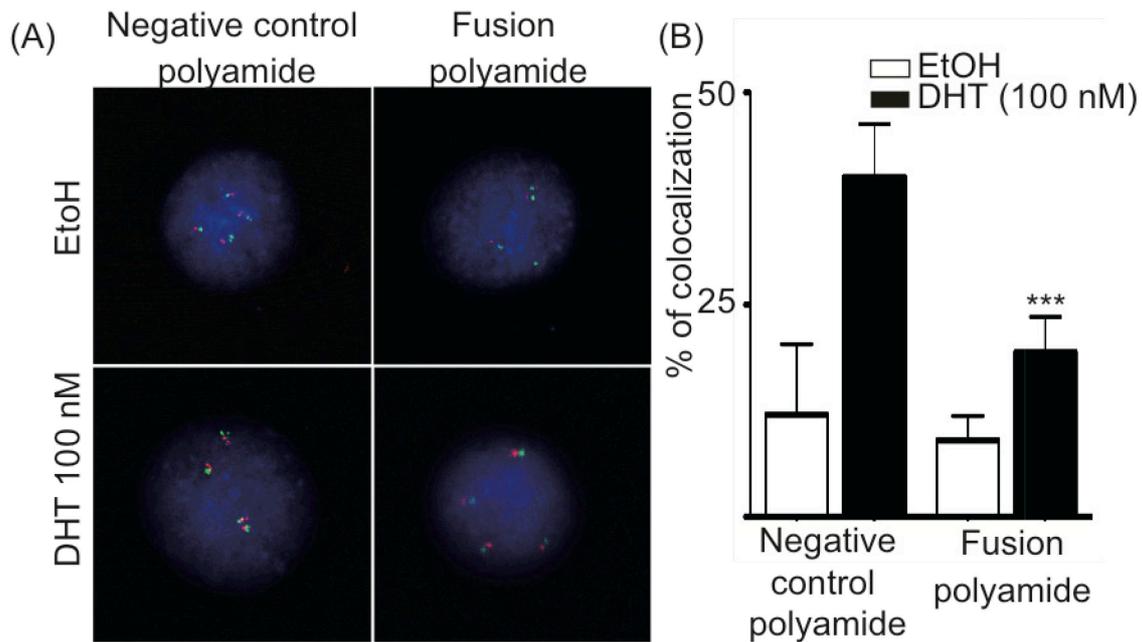
TMPRSS2 の Break Fusion 配列を含むオリゴ2本鎖 DNA を FITC 標識し、溶媒(水)、1, 2, 5 μM の融合ポリアミド、5 μM の陰性対照ポリアミドとともに 37 度 1 時間で培養し、その後 20 % ポリアクリルアミドゲルにて泳動した。



Obinata et al. Cancer Sci 2014

図 8 LNCaP 細胞における FITC-標識融合ポリアミドおよび陰性対照ポリアミドの分布

LNCaP 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、24 時間培養後、FITC-標識した融合ポリアミドまたは陰性対照ポリアミドを 5 μM 培地に添加した。2 時間のインキュベーション後、培地をヘキスト 33342 を含んだ PBS に置換し、さらに細胞を 20 分間インキュベーション後、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは 50 μm で示している。



Obinata et al. Cancer Sci 2014

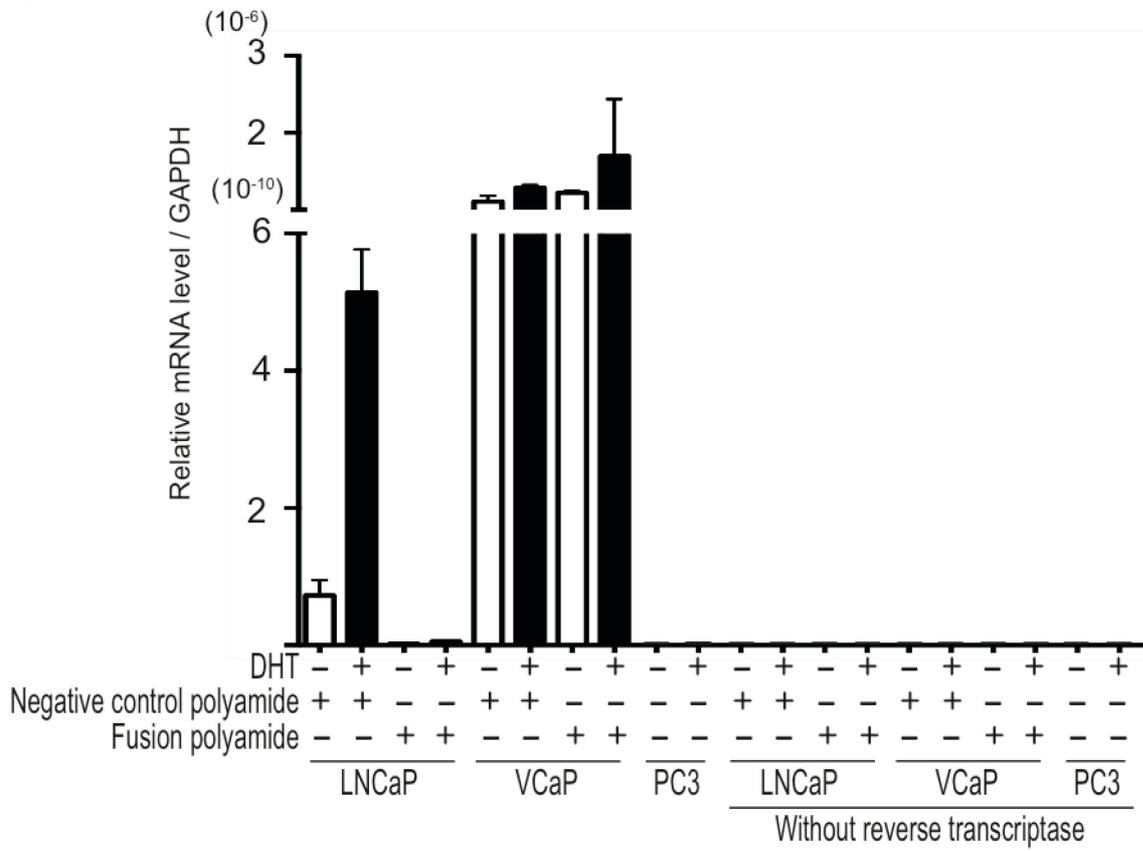
図9 融合遺伝子生成と陽性細胞率の Fluorescence in situ hybridization (FISH)による解析

LNCaP 細胞を融合ポリアミドを投与し 72 時間後、細胞を 24 時間 DHT で刺激し、TMPRSS2(緑)及び ERG(赤色)の蛍光プローブを用いて FISH を行い、転座による TMPRSS2 と ERG の融合の頻度を計測した。

(A) 代表的な写真。

(B) TMPRSS2-ERG 融合部位の比率を計測し、平均値±標準偏差 (SD) で表示した (***) $P < 0.0001$ 対 陰性対照ポリアミド)。

(A) TMPRSS2-ERG



(B) ERG

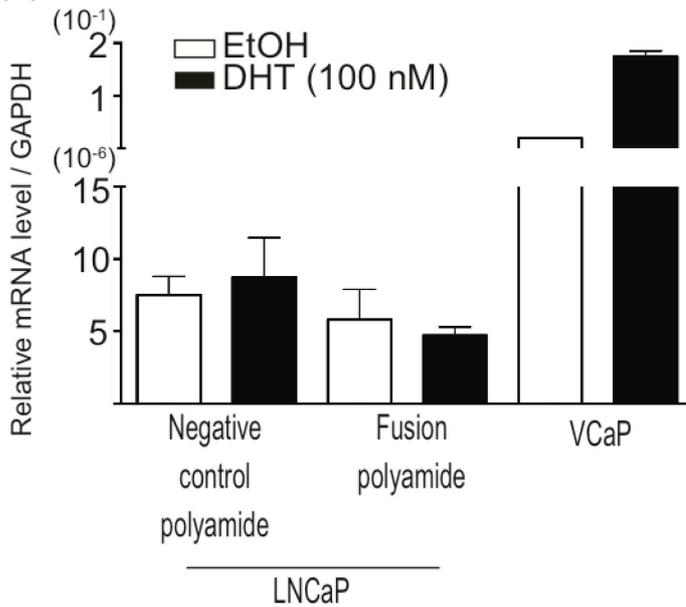


図 10 融合転写物と内因性 ERG 発現に対する融合ポリアミドの有効性

LNCaP 細胞を陰性対照ポリアミドまたは融合ポリアミド 5 μ M で刺激し、48 時間後に DHT (100 nM) 刺激を行い、更にその 48 時間後に、TMPRSS2-ERG (A) および ERG (B) の mRNA 発現レベルを、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) により分析した。

陰性対照として TMPRSS2-ERG が発現していない PC3 細胞を、陽性対照として TMPRSS2-ERG が恒常的に発現している VCaP 細胞を使用した。

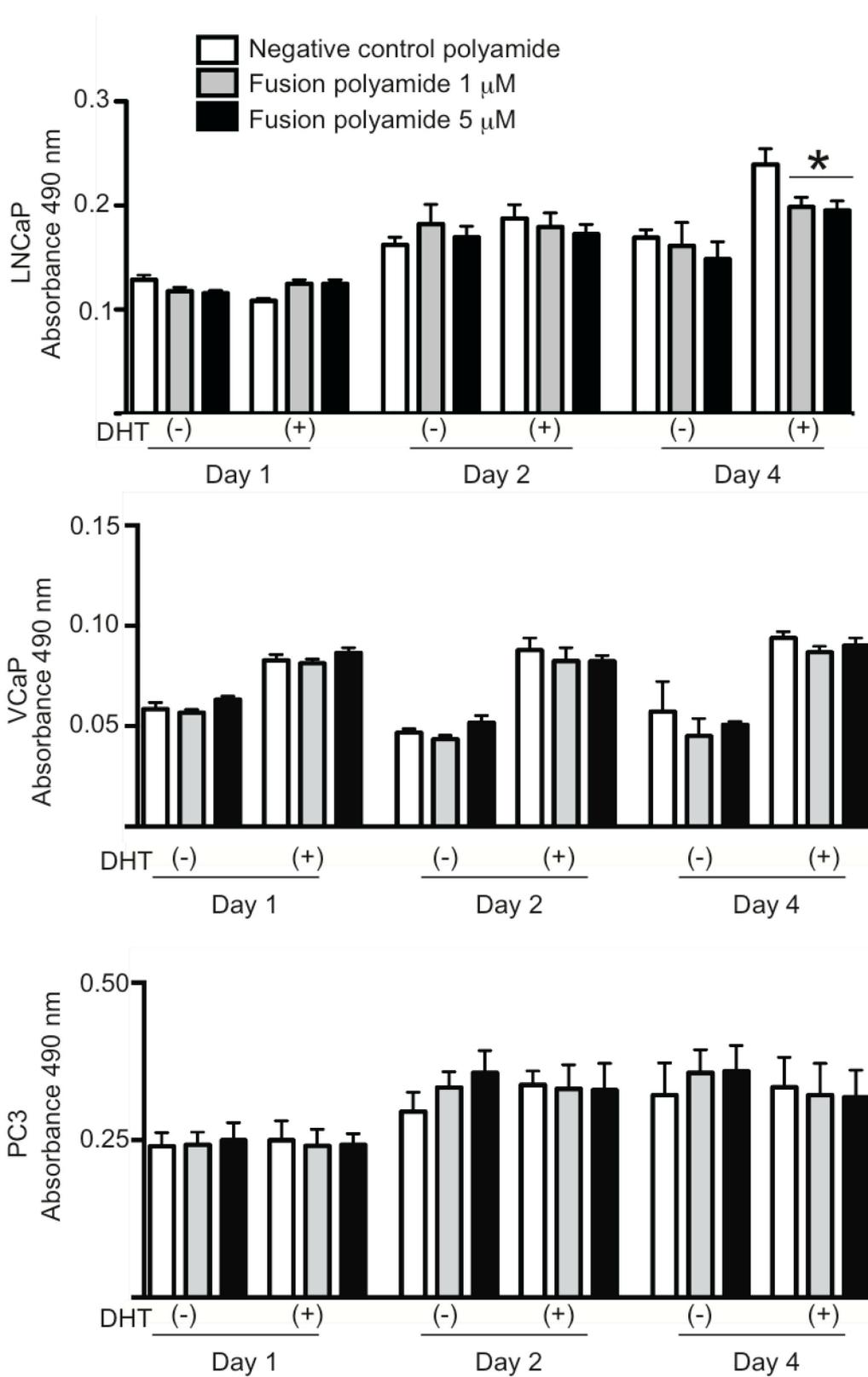
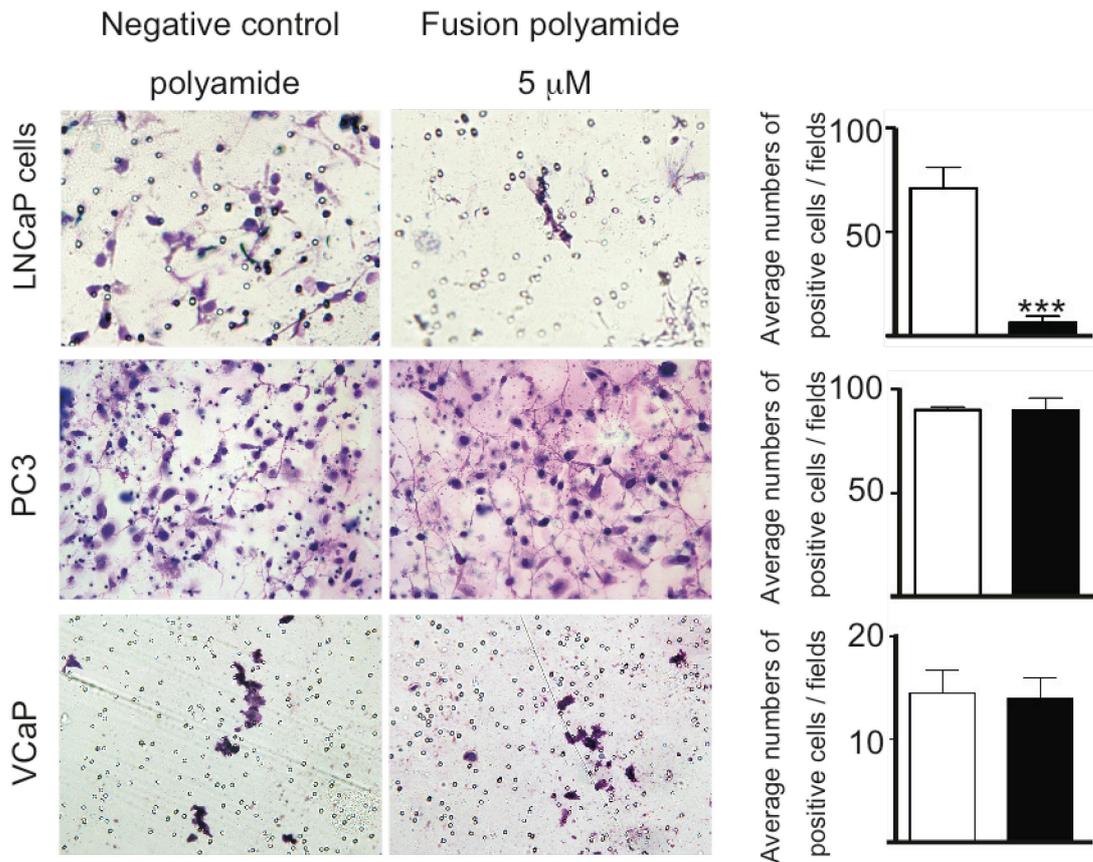


図 11 細胞増殖に対する融合ポリアミドの効果

フェノールレッドを含まない RPMI で培養した LNCaP 細胞及びフェノールレッドを含まない DMEM で培養した VCaP 細胞と PC3 細胞、陰性対照ポリアミド 5 μM もしくは融合ポリアミド 1 または 5 μM を添加し 48 時間培養した。その後 100 nM のデヒドロテストステロン (DHT) で刺激を行い、その 1、2、4 日後に MTS assay にて細胞生存率を定量した。これにより細胞増殖速度を解析した。結果は平均±標準偏差 (SD) ($n = 3$, * $p < 0.05$) として提示する。



Obinata et al. Cancer Sci 2014

図 12 細胞遊走能に対する融合ポリアミドの効果

融合ポリアミドが LNCaP 細胞、PC3 細胞、VCaP 細胞の遊走能に与える影響を調べるために Cell migration assay を行った。Fibronectin を塗布した PET フィルター上に細胞を播種し、融合ポリアミドもしくは陰性対照ポリアミド存在下で培養を行い、24 時間後にフィルターを通過して遊走した細胞のみを遊走細胞をギムザ溶液で染色した。

(A) 代表的な写真。

(B) PET フィルターを通して移動した細胞数の平均値

各ウェルの代表的な 5 つの視野を光学顕微鏡下で確認し、遊走した細胞の数を定量した。結果は平均±標準偏差 (SD) (***)は $p < 0.0001$) として提示された。

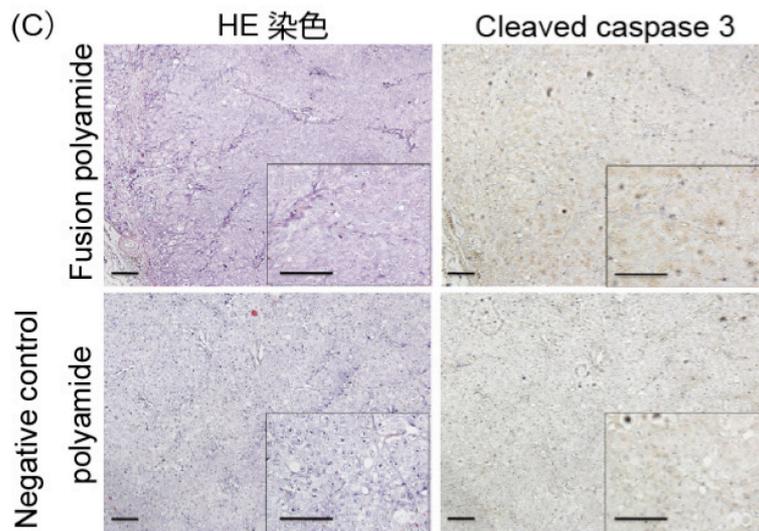
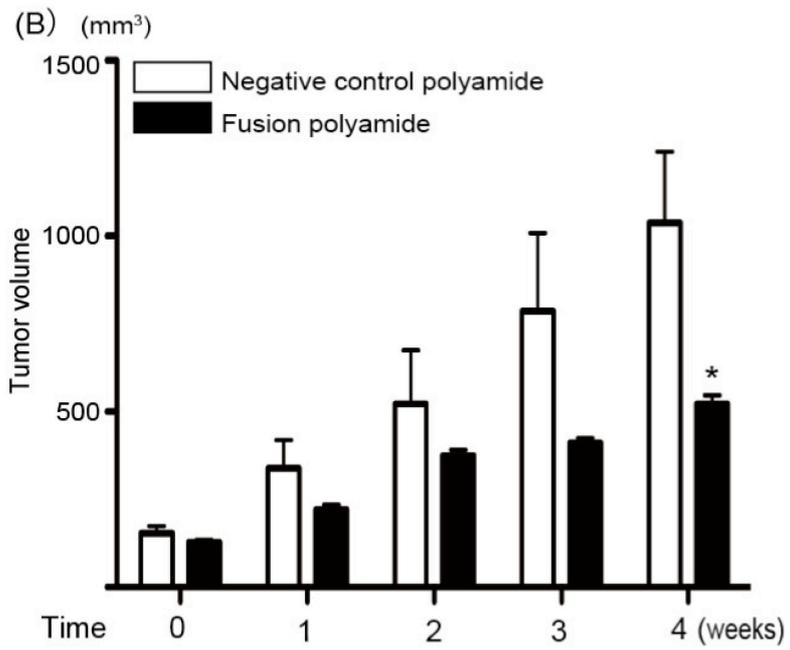
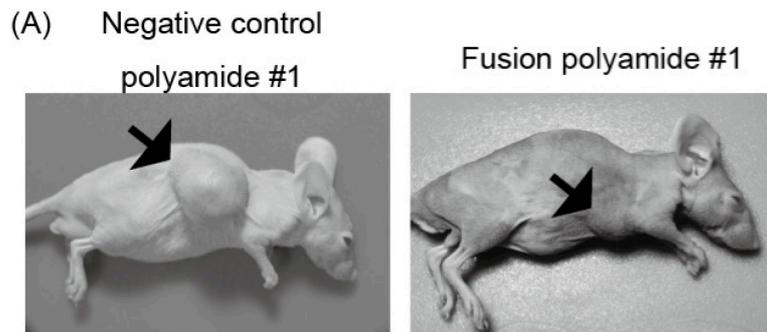


図 13 *in vivo* における LNCaP 細胞増殖能に対する融合ポリアミドの検討

3×10^6 腫瘍細胞を皮下に移植した 7 週齢の雄マウスに融合ポリアミドまたは陰性対照ポリアミドを週 1 回、尾静脈に注射した。

(A) PI ポリアミドを 4 週間投与後の代表的なマウスの写真

(B) 腫瘍体積の増殖速度の比較

腫瘍体積 (V_{mm3}) は $V = 0.5 \times \text{最大径} \times \text{中央径} \times \text{最小径}$ 、平均の標準誤差 (n は各 6) であらわした。*は $P < 0.05$ 陰性対照ポリアミド対融合ポリアミド。

(C) 腫瘍組織より病理切片を作成し、HE 染色と Cleaved caspase 3 の抗体を用いて免疫組織染色した代表的な像。(Bar = 100 μm)

【引用文献】

1. 家庭画報 編集 『がん - 命を託せる名医』 世界文化社, 157頁,2012
2. 服部 智任 著 『あなたの医学書、前立腺がん』 誠文堂新光社, 12 頁, 2008
3. Smith DF, Toft DO. Minireview: the intersection of steroid receptors with molecular chaperones: observations and questions. *Mol Endocrinol* 22: 2229-2240, 2008
4. Chen CD, Welsbie DS, Tran C, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 10:33-9, 2004
5. Hara T, Miyazaki J, Araki H, et al. Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. *Cancer Res* 63:149-53, 2003
6. Elo JP, Kvist L, Leinonen K, et al. Mutated human androgen receptor gene detected in a prostatic cancer patient is also activated by estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3494-500, 1995
7. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 10: 177-188, 2008
8. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, et al. TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res* 66: 3396-3400, 2006
9. Mehra R, Tomlins SA, Shen R, et al. Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer. *Mod Pathol* 20:538-544, 2007

10. Rajput AB, Miller MA, De Luca A, et al. Frequency of the TMPRSS2:ERG gene fusion is increased in moderate to poorly differentiated prostate cancers. *J Clin Pathol* 60: 1238-1243, 2007
11. Lin C, Yang L, Tanasa B, et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell* 139: 1069-1083, 2009
12. Mani RS, Iyer MK, Cao Q, et al. TMPRSS2-ERG-mediated feed-forward regulation of wild-type ERG in human prostate cancers. *Cancer Res* 71: 5387-5392, 2011
13. Yu J, Mani RS, Cao Q, et al. An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell* 17: 443-454, 2010
14. ザヘンリーエム, ジャクソンファウンデーションフォーザアドバンスメントオブミリタリーメディスン, インコーポレーテッド. ERG 遺伝子発現における前立腺癌特異的变化ならびにそれらの変化に基づく検出および治療方法. 特表 2010-505446 2010-2-25.
15. ザヘンリーエム, ジャクソンファウンデーションフォーザアドバンスメントオブミリタリーメディスン, インコーポレーテッド. ERG 遺伝子発現における前立腺癌特異的变化ならびにそれらの変化に基づく検出および治療方法. 特表 2010-518552 2011-6-30.
16. ザリージェンツオブザユニバーシティオブミシガン. 前立腺癌における再発性遺伝子融合. 特表 2009-507492 2009-2-26.
17. ザリージェンツオブザユニバーシティオブミシガン. 前立腺癌における再発性遺伝子融合. 特表 2010-532663 2010-10-14.

18. Trauger JW, Baird EE, Dervan PB. Recognition of DNA by designed ligands at subnanomolar concentrations. *Nature* 382: 559-561, 1996.
19. Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem* 9: 2215-2235, 2001.
20. Sugiyama H, Lian C, Isomura M, et al. Distamycin A Modulates the Sequence Specificity of DNA Alkylation by Duocarmycin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14405-14410, 1996
21. Takayama K, Kaneshiro K, Tsutsumi S, et al. Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis. *Oncogene* 26: 4453-63, 2007
22. Wang X, Nagase H, Watanabe T, et al. Inhibition of MMP-9 transcription and suppression of tumor metastasis by pyrrole-imidazole polyamide. *Cancer science* 101: 759-66, 2010
23. Hu Q, Kwon YS, Nunez E, et al. Enhancing nuclear receptor-induced transcription requires nuclear motor and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 19199-204, 2008
24. Obinata D, Takayama K, Urano T, et al. Oct1 regulates cell growth of LNCaP cells and is a prognostic factor for prostate cancer. *Int J Cancer* 130: 1021-8, 2012
25. Obinata D, Takayama K, Urano T, et al. ARFGAP3, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Int J Cancer* 130: 2240-8, 2012

26. Bastus NC, Boyd LK, Mao X, et al. Androgen-induced TMPRSS2:ERG fusion in nonmalignant prostate epithelial cells. *Cancer Res* 70: 9544-8, 2010
27. Haffner MC, Aryee MJ, Toubaji A, et al. Androgen-induced TOP2B-mediated double-strand breaks and prostate cancer gene rearrangements. *Nat Genet* 42: 668-75, 2010
28. Mani RS, Tomlins SA, Callahan K, et al. Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer. *Science* 326: 1230, 2009
29. Lu S, Tsai SY, Tsai MJ. Regulation of androgen-dependent prostatic cancer cell growth: androgen regulation of CDK2, CDK4, and CKI p16 genes. *Cancer Res* 57: 4511-6, 1997
30. Li R, Wheeler T, Dai H, Frolov A, Thompson T, Ayala G. High level of androgen receptor is associated with aggressive clinicopathologic features and decreased biochemical recurrence-free survival in prostate: cancer patients treated with radical prostatectomy. *Am J Surg Pathol* 28: 928-34, 2004
31. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310: 644-8, 2005
32. Mehra R, Tomlins SA, Yu J, et al. Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer. *Cancer Res* 68: 3584-90, 2008
33. Clark JP, Cooper CS. ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature reviews Urology* 6: 429-39, 2009
34. Han B, Mehra R, Dhanasekaran SM, et al. A fluorescence in situ hybridization screen for E26 transformation-specific aberrations: identification of DDX5-ETV4 fusion protein in prostate cancer. *Cancer research* 68: 7629-37,

2008

35. Mehra R, Han B, Tomlins SA, et al. Heterogeneity of TMPRSS2 gene rearrangements in multifocal prostate adenocarcinoma: molecular evidence for an independent group of diseases. *Cancer Res* 67: 7991-5, 2007

36. King JC, Xu J, Wongvipat J, et al. Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nature genetics* 41: 524-6, 2009

37. Carver BS, Tran J, Gopalan A, et al. Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nature genetics* 41: 619-24, 2009

38. Cerveira N, Ribeiro FR, Peixoto A, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions. *Neoplasia* 8: 826-32, 2006

39. Demichelis F, Fall K, Perner S, et al. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* 26: 4596-9, 2007

40. Shao L, Tekedereli I, Wang J, et al. Highly specific targeting of the TMPRSS2/ERG fusion gene using liposomal nanovectors. *Clin Cancer Res* 18: 6648-57, 2012

41. Dervan PB, Edelson BS. Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides. *Curr Opin Struct Biol* 13: 284-99, 2003

42. Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem* 9: 2215-35, 2001

43. Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Transcriptional inhibition of progressive renal disease by gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting of the transforming growth factor-beta1 promoter. *Kidney Int*: 79: 46-56, 2011
44. Yang F, Nickols NG, Li BC, Marinov GK, Said JW, Dervan PB. Antitumor activity of a pyrrole-imidazole polyamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 1863-8, 2013
45. Raskatov JA, Nickols NG, Hargrove AE, Marinov GK, Wold B, Dervan PB. Gene expression changes in a tumor xenograft by a pyrrole-imidazole polyamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 16041-5, 2012
46. Raskatov JA, Hargrove AE, So AY, Dervan PB. Pharmacokinetics of Py-Im polyamides depend on architecture: cyclic versus linear. *J Am Chem Soc* 134: 7995-9, 2012
47. Hagglof C, Hammarsten P, Stromvall K, et al. TMPRSS2-ERG expression predicts prostate cancer survival and associates with stromal biomarkers. *PLoS One* 9: e86824, 2014
48. Selvaraj N, Budka JA, Ferris MW, Jerde TJ, Hollenhorst PC. Prostate cancer ETS rearrangements switch a cell migration gene expression program from RAS/ERK to PI3K/AKT regulation. *Molecular cancer* 13: 61, 2014
49. Tian TV, Tomavo N, Huot L, et al. Identification of novel TMPRSS2:ERG mechanisms in prostate cancer metastasis: involvement of MMP9 and PLXNA2. *Oncogene* 33: 2204-14, 2014
50. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-74, 2011

51. Hagglof C, Bergh A. The stroma-a key regulator in prostate function and malignancy. *Cancers* 4: 531-48, 2012
52. Warrick JI, Tomlins SA, Carskadon SL, et al. Evaluation of tissue PCA3 expression in prostate cancer by RNA in situ hybridization--a correlative study with urine PCA3 and TMPRSS2-ERG. *Mod Pathol* 27: 609-20, 2014
53. Huang KC, Dolph M, Donnelly B, Bismar TA. ERG expression is associated with increased risk of biochemical relapse following radical prostatectomy in early onset prostate cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2014.
54. Mani RS, Iyer MK, Cao Q, et al. TMPRSS2-ERG-mediated feed-forward regulation of wild-type ERG in human prostate cancers. *Cancer research* 71: 5387-92, 2011

【研究業績】

伊藤 亜希子

I 発表	①一般発表	2
	②特別発表	なし
II 論文	①原著論文	2 (単 1/共 1)
	②症例報告	なし
	③総説	なし
III 著書		なし

以上

I 発表

① 一般発表

1. 伊藤 亜希子, 大日方 大亮, 藤原 恭子, 村田 保貴, 高山 賢一, 浦野 友彦, 福田 昇, 永瀬 浩喜, 相馬 正義, 井上 聡, 高橋 悟: 前立腺癌における TMPRSS2-ERG 融合遺伝子の発現を特異的に抑制されるピロロール・イミダゾール(PD)ポリアミドの開発, 第 101 回 日本泌尿器科学会総会, 札幌, 2013 年 4 月
2. 伊藤 亜希子, 大日方 大亮, 藤原 恭子, 村田 保貴, 高山 賢一, 浦野 友彦, 福田 昇, 永瀬 浩喜, 相馬 正義, 井上 聡, 高橋 悟: ピロロール・イミダゾール(PD)ポリアミドを用いた前立腺癌に関連する融合遺伝子発現抑制の検討, 第 8 回日本大学先端バイオフィォーラム, 東京, 2013 年 11 月

II 論文

① 原著論文

1. Obinata, D. Yamaguchi, K. Ito, A. Murata, Y. Ashikari, D. Igarashi, T. Sato, K. Mochida, J. Yamanaka, Y. Takahashi, S: Lower urinary tract symptoms in female patients with pelvic organ prolapse: Efficacies of pelvic floor reconstructive procedure, International Journal of Urology, 21(3): 301-307, 2014
2. Obinata, D. Ito, A. Fujiwara, K. Takayama, K. Ashikari, D. Murata, Y. Yamaguchi, K. Urano, T. Fujimura, T. Fukuda, N. Soma, M. Watanabe, T. Nagase, H. Takahashi, S: Pyrrole-imidazole polyamide targeted to break fusion sites in TMPRSS2 and ERG gene fusion represses prostate tumor growth, Cancer Science: 105 :1272-1278, 2014