

学位論文 (博士)

ARHGAP29 expression may be a novel prognostic factor  
of cell proliferation and invasion in prostate cancer  
(ARHGAP29 発現は前立腺癌における細胞増殖と浸  
潤の新規予後予測因子になり得る)

氏名 清水 宏輔

所属 山口大学大学院医学系研究科

情報解析医学系専攻 泌尿器科学講座

令和2年12月

## 目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	3～4
3. 目的	4
4. 方法	4～7
(1) 対象	4
(2) 方法	4～6
(3) 解析	6～7
5. 結果	7～8
6. 考察	8～10
7. 結語	10
8. 謝辞	10
9. 参考文献	10～12

## 1. 要旨

前立腺癌は世界の男性の癌罹患率で2番目、癌死亡率で5番目に位置する悪性腫瘍である。局所進行性・転移性前立腺癌に対しては androgen deprivation therapy (ADT) が治療の主体となるが、その多くが ADT に対して抵抗性となり去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) に移行する。近年、CRPC に対する新規治療薬が多数承認されおり治療選択が広がっているにも関わらず、予後不良な病態である。Androgen receptor (AR) signal の変化が前立腺癌における去勢抵抗性の獲得に関連することは知られているが、未解明の点が多く、前立腺癌の進展メカニズムの解明が望まれている。

Yes-associated protein (YAP) は、Hippo 経路で中心的な役割を果たす転写共役因子であり、その活性化は細胞増殖と発癌を調節する。YAP の活性化は様々な悪性腫瘍で報告されており、腫瘍の遊走能および浸潤能に影響を及ぼす。いくつかの研究は、YAP の発現が前立腺癌と密接に関連していることを示唆している。さらに YAP は Rho GTPase 活性化タンパク質 29 (ARHGAP29) を介して細胞骨格に関連する F-actin の不安定化を調節することが明らかになっており、胃癌細胞株において ARHGAP29 が癌の転移に関連していることが示唆されている。本研究では、前立腺癌細胞株 (22Rv1、LNCaP、DU145、PC-3) において ARHGAP29 の機能解析を行い、ARHGAP29 の発現が最も低い LNCaP および DU145 細胞で ARHGAP29 のアップレギュレーションが細胞増殖能、浸潤能を促進することが明らかにした。反対に、発現レベルが最も高い PC-3 細胞で ARHGAP29 をノックダウンすることで、細胞増殖と浸潤が大幅に減少することがわかった。さらに、根治的前立腺切除術を受けた 133 人の患者からの標本の免疫組織化学を実施して、ARHGAP29 発現と前立腺癌患者の予後について臨床的関連を解析したところ、多変量解析により、ARHGAP29 は生化学的無増悪生存期間の独立した予後因子であることが示された ( $P = 0.0123$ )。これらの発見は、前立腺癌において ARHGAP29 が潜在的な予後予測のバイオマーカーとなり、また治療標的となる可能性があることが示された。

## 2. 研究の背景

Globocan によると、2018 年には前立腺癌が全世界の男性の癌発生率の 2 番目に多い原因疾患 (約 950 万人の新規症例の 13.5%) であり、5 番目に多い死亡原因 (約 540 万人の死亡の 6.7%) となっている (1)。進行性または転移性の前立腺癌患者は通常、初期のアンドロゲン遮断療法 (ADT) によく反応する。ただし、ADT は、長期間にわたって低レベルのテストステロンが維持されているにもかかわらず、前立腺癌の進行を完全に抑制することは困難である。この段階に至った前立腺癌は、去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) と呼ばれる。CRPC の治療にはいくつかの薬剤が承認されているが、治療法の選択肢が増えたにも関わらず、CRPC は依然として致命的な疾患である (2)。ゲノム異常は前立腺癌細胞においては一般的なもので、さまざまな癌遺伝子と癌抑制遺伝子が前立腺癌に関連している (3-8)。腫瘍抑制遺伝子である PTEN (9, 10) は、前立腺癌のアンドロゲン受容体 (AR) シグナル伝達 (11) を調節する。AR シグナル伝達の変化は、前立腺癌における去勢抵抗性の獲得に関連していることが知られている (12)。しかし、前立腺癌の進行メカニズムはまだ完全には解明できていないのが現状である。

1990 年代以降、Hippo シグナル伝達経路が腫瘍抑制シグナル伝達経路として明らかにされてきた。Yes-associated protein (YAP) は、Hippo 経路で中心的な役割を果たし、前立腺癌を含むさまざまな癌の細胞増殖、遊走、および浸潤を調節することが明らかになっている (13)。前立腺癌においても、YAP の高発現が、その分化と前立腺外への進展に関与していることが示された (14, 15)。また YAP の発現は、去勢抵抗性の前立腺癌細胞の獲得やアンドロゲン非依存性ヒト前立腺癌細胞の増殖に関連すること

も明らかにされている (13, 16)。YAP は、ECM の硬度を介したメカノトランスダクションによって活性化されることが知られている (17)。YAP は特定の Rho GTPase 活性化タンパク質 (ARHGAP) に結合することが示されており、一部の ARHGAP は YAP のエフェクターと見なされている (17-19)。Rho GTPase 活性化タンパク質 29 (ARHGAP29) は、胃癌において F-actin/ G-actin の代謝回転のダイナミクスを変化させることにより、細胞骨格の再配列と細胞移動の促進をもたらすことが明らかにされた (18)。しかしながら、これまでのところ前立腺癌については ARHGAP29 の機能は不明であった。

### 3. 目的

本研究の目的は *in vitro* で ARHGAP29 の役割を解明し、臨床検体を用いて、YAP あるいは ARHGAP29 の発現が前立腺癌の予後と関連しているかどうかを検討することである。

### 4. 方法

#### (1) 対象

*In vitro* 解析については、American Type Culture Collection (ATCC) から購入した 4 つの前立腺癌細胞株 (22Rv1、LNCaP、DU145、PC-3) を用いて解析を行った。

臨床検体を用いた解析については、2000 年 11 月から 2016 年 9 月にかけて山口大学医学部附属病院にて根治的前立腺全摘除術を受けた計 133 人の患者を対象とした。すべての患者は病理学的に前立腺癌と診断された。詳細な患者の特徴を table1 に示す。本研究は山口大学大学院医学研究科の倫理委員会によって承認され、研究に登録されたすべての個人から書面によるインフォームドコンセントを得た。

#### (2) 方法

##### **Immunohistochemistry**

ホルマリン固定およびパラフィン包埋組織標本を用いて、H&E 染色および免疫組織化学 (IHC) 染色を行った。各サンプルについて、厚さ  $3\mu\text{m}$  の切片をキシレンで脱パラフィン化し、エタノールで脱水後、0.3%過酸化水素/メタノール溶液中を用いて 10 分間室温でインキュベートした。次に切片を 0.01M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) で 15 分間マイクロ波処理し、ブロッッキング溶液 (IMMUNO SHOT; Cosmo Bio Co., Ltd.) を用いて室温で 30 分間カバーした。次に、一次抗体 [anti-ARHGAP29 抗体 (1:200 dilution; cat. no. HPA026534; Atlas Antibodies) または anti-YAP 抗体 (1:200 dilution; product no. 14074; Cell Signaling Technology, Inc.)] を加えて、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩インキュベートした。続いて、二次抗体 (N-Histofine Simple Stain MAX PO MULTI; cat. no. 414152F; Nichirei Biosciences, Inc.) を使用して、室温で 30 分間インキュベートした。

IHC 染色を評価するために、本研究では H スコアを使用した。簡単に説明すると、各セクションの 5 つの異なる視野 (x100 倍率) で 500 を超える腫瘍細胞をカウントして陽性細胞のパーセンテージを計測し、強度 (強く染色: 3、中程度に染色: 2、弱く染色: 1) を乗じて H スコアを 0~300 の範囲で算出した。2 人の独立した研究者 (KS と HM) がスコアを測定し、平均スコアを代表スコアに設定した。H スコアのカットオフは、ROC 曲線によって決定した。

##### **ノックダウンとトランスフェクション**

PC-3 細胞株については、Life Technologies から購入した si-ARHGAP29 とコントロール siRNA を用いて、Lipofectamine RNAi MAX (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を使用して、遺伝子をノックダウンした。

LNCaP と DU145 細胞株については、Addgene, Inc. から購入した ARHGAP29 発現プラスミドと Thermo Fisher Scientific, Inc. から購入した pcDNA3.1-empty vector プラスミドを用いて、X-tremeGENE HP DNA transfection Reagent (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) を使用して、遺伝子をトランスフェクションした。

DU145 細胞株については、Amaxa cell line Nucleofector Kit L (カタログ番号 VACA-1005; Lonza Group, Ltd.) を使用し、エレクトロポレーション システムを介してプラスミドのトランスフェクションを行った。

mRNA と蛋白発現の定量的評価は、それぞれ Western blotting と RT-qPCR によって行われました。

### 逆転写定量 PCR (RT-qPCR)

iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (カタログナンバー1725037; Bio-Rad Laboratories, Inc.) を使用して、各前立腺癌細胞株 (22Rv1、LNCaP、DU145、PC-3) から抽出した mRNA を逆転写して cDNA を作成した。

定量的リアルタイム RT-PCR は、TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を使用して、Applied Biosystems StepOnePlus で 3 回実行した。

TaqMan プローブとプライマーは Applied Biosystems から購入した。内在性コントロールとして GAPDH (assay ID: 02786624) を使用した。ARHGAP29 (assay ID: 00191351) および MMP-2 (assay ID: 01548727) RNA 発現のレベルは、StepOnePlus software (version 2.2.2; Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を使用して決定した。miRNA の発現レベルは  $\Delta\Delta Ct$  法を使用して決定した (23)。

サイクリング条件は、95°C で 30 秒間の初期変性と、95°C で 5 秒間および 60°C で 30 秒間を 1 サイクルとする 40 サイクルの PCR で構成した。

### qPCR による遺伝子発現分析

PC-3 細胞株 (si-NC および si-ARHGAP29) から Total RNA を分離し、RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (Qiagen RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Cell Motility; cat. no. PAHS-128Z, product no. 330231) を用いて、human cell motility に関する遺伝子発現パターンを解析した。遺伝子発現レベルを分析し、Web ベースの software ‘RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array’ Data Analysis version 3.5 (Qiagen, Inc.) を使用してヒートマップを作成した。

### Western blotting

1% プロテアーゼ阻害剤 (cOmplete™, Mini、カタログ番号 04693124001; Sigma-Aldrich) を添加した RIPA バッファー (カタログ番号 89900; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて細胞サンプルを溶解し、Total protein を抽出した。

BCA 法でタンパク濃度を定量化した。各ライセートサンプル (タンパク質 30  $\mu$ g) を 4-20% SDS-PAGE (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gels、カタログ番号 4568095; Bio-Rad Laboratories) を用いて電気泳動し、PVDF 膜に転写した。5% スキムミルクまたは 5% BSA を用いて 1 時間室温でブロッキングした後、PVDF 膜を一次抗体と共に一晩

4°Cでインキュベートした。0.05% Tween-20を含むTBS (TBST) で洗浄した後、メンブレンをHRP標識二次抗体とともに室温で1時間インキュベートした。TBSTで洗浄した後、ECL detection system (ChemiDoc™XRS +; Bio-Rad Laboratories, Inc) を使用してシグナルを検出した。一次抗体は、anti-ARHGAP29抗体 (product code ab85853, 1:2,000 dilution)、anti-AR抗体 (product code ab133273, 1:1,000 dilution)、anti-F-actin抗体 (product code ab205, 1:500 dilution)、およびanti-MMP-2抗体 (product code ab97779, 1:1,000 dilution) をAbcamから、anti-YAP抗体 (cat. no. 14074S; 1:1,000 dilution)、anti-リン酸化YAP抗体 (cat. no. 13008S; 1:1,000 dilution)、anti-GAPDH抗体 (cat. no. 5174S; 1:1,000 dilution)、anti-cofilin抗体 (cat. no. 5175T; 1:1,000 dilution) およびanti-リン酸化cofilin抗体 (cat. no. 3313T; 1:1,000 dilution) をCell Signaling Technologyから各々購入した。二次抗体は、goat anti-rabbit IgG H&L (HRP) (product code ab6721; 1:10,000 dilution)、およびgoat anti-mouse IgG H&L (HRP) (product code ab6789; 1:10,000 dilution) をアブカムから購入した。GAPDHはハウスキーピングタンパク質として各蛋白発現量のノーマライズに使用した。パブリックドメインのフリーソフトウェアであるImageJ (version 1.51; National Institutes of Health) を使用してデンシトメトリーを実行した。

### Cell viability and invasion assays

Cell viability は、MTS assay (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega Corporation) を使用して評価した。細胞を96-well plate に  $5 \times 10^3$  /well の密度で播種した後、24、48、および72時間でOD490 nmを測定した。データは、3回の独立した実験の平均±SDとして表した。

Cell invasion assayは、CytoSelect 24-well cell invasion assay kit (Cell BioLabs, Inc.) を使用して実施した。CytoSelect™ Cell Invasion Assay Kitには、24-well plate に polycarbonate membrane inserts (孔径  $8 \mu\text{m}$ ) が含まれている。Insert membrane の上面は、乾燥した基底膜マトリックス溶液の均一な層でコーティングされている。この基底膜層は、浸潤細胞と非浸潤細胞を区別するためのバリアとして機能する。 $0.5\text{--}1.0 \times 10^6$  細胞/ml を含む細胞懸濁液を、無血清培地の上部チャンバーに入れる。10%ウシ胎児血清を含む計  $500 \mu\text{l}$  の培地を浸潤プレートの下部のウェルに加えた。37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで48時間インキュベーション後、細胞は基底膜層から浸潤し、挿入膜の底に付着し、非侵襲性細胞は上部チャンバーに残った。非侵襲性細胞を除去した後、Cell Stain Solution (Part no. 11002; CytoSelect 24-well cell invasion assay kit) を使用して、浸潤細胞を室温で10分間染色して定量化した。各インサートを空のウェルに移し、 $200 \mu\text{l}$  の抽出溶液 (Part no. 11003; CytoSelect 24-well cell invasion assay kit) をウェルごとに加え、オービタルシェーカーで10分間インキュベートした。続いて、各サンプルから  $100 \mu\text{l}$  を96-well microtiter plate に移し、各サンプルのOD 560nmをプレートリーダーで測定した。

### Database

米国国立がん研究所のホームページ (<http://cancergenome.nih.gov/>) のデータポータルからアクセスしたCancer Genome Atlas (TCGA) を使用して、我々のデータと比較した。

### (3) 統計解析

カテゴリカル変数は、カイ二乗検定によって比較した。連続変数は、2 群間を比較するとき、対応のない Student's t-test を使用して解析した。3 つ以上の群を比較する場合は、One-way ANOVA とそれに続く Turkey-Kramer test を使用した。生存分析は、Kaplan-Meier 法によって評価し、log-rank test によって比較した。コックス比例ハザード回帰モデルを用いて多変量解析を行い、疾患進行の危険因子を同定した。JMP software (Pro.13; SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用して統計分析を行った。P 値は両側検定で、 $P < 0.05$  を統計的有意と定義した。蛋白発現に関しては、二変量解析を行い、JMP software を用いて ROC 曲線を作成し、カットオフを設定して蛋白の高/低発現を決定した (24)。

## 5. 結果

### 前立腺癌細胞株における AR、YAP、ARHGAP29、および F-アクチンの発現。

前立腺癌細胞株間で AR と YAP 発現に応じた ARHGAP29 発現の違いがあるかどうかを明らかにする目的で、RT-qPCR と Western blotting を行った。AR は、22Rv1 および LNCaP 細胞株で発現を認めた。YAP は、すべての前立腺癌細胞株で発現していた (図 1A および B)。YAP の発現レベルは、LNCaP および 22Rv1 細胞より DU-145 および PC-3 細胞で高かった。ARHGAP29 の発現が PC-3 細胞で他の細胞株よりも高かった。F-actin は、他の細胞株と比較して PC-3 細胞で最も弱く発現していた (図 1C)。

### 前立腺癌細胞株 (PC-3、LNCaP および DU145) における ARHGAP29 のダウンレギュレーションまたはアップレギュレーションの影響。

前立腺癌細胞株における ARHGAP29 のダウンレギュレーション (PC-3 細胞) またはアップレギュレーション (LNCaP および DU145 細胞) 後の、いくつかの蛋白発現について検討した (図 2A および B)。最近の研究 (18) に基づいて、RhoA-LIMK-cofilin シグナル伝達経路は、胃癌細胞株において ARHGAP29 の影響を受けることが明らかになっている。したがって、特定の関連遺伝子 (cofilin、リン酸化 cofilin、F-actin) について Western blotting で解析した (図 2B)。PC-3 細胞で ARHGAP29 をほぼ完全にノックダウンした後、リン酸化 cofilin と F-actin が増加し、cofilin の発現は変化しなかった。対照的に、DU145 細胞で ARHGAP29 を過剰発現させた後、F-actin はわずかに減少したが、リン酸化 cofilin の変化はなかった。YAP とリン酸化 YAP はコントロールと比較して si-ARHGAP29 PC-3 トランスフェクタントに有意差なかったものの、わずかに増加を認めた。逆に、DU145 細胞においては ARHGAP29 の過剰発現後に YAP が減少した。ハウスキーピング遺伝子 GAPDH の発現と比較したこれらのタンパク質の発現、およびリン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質 (YAP およびコフィリン) の比率を図 2C および D に示す。MTS および invasion assay による機能解析を、これらの 3 つの細胞株で行った (図 3)。PC-3 細胞における ARHGAP29 のダウンレギュレーション後、細胞増殖と浸潤は有意に減少した (図 3A および B)。LNCaP および DU145 細胞における ARHGAP29 のアップレギュレーション後、細胞増殖と浸潤が有意に増加した (図 3A および B)。

### ARHGAP29 のノックダウン後の Cell motility 関連遺伝子の同定。

機能解析に基づく、ARHGAP29 は細胞の増殖または浸潤に関与している可能性が考えられる。前立腺癌細胞における ARHGAP29 に関連する新しい治療標的または遺伝子を同定する目的で、Qiagen RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Cell Motility を使用した。事前に設計されたアレイには、細胞の運動性に関連する 84 個の遺伝子が含まれて

いた (図 4A)。データ分析は、前述のように Web ベースのソフトウェア 'RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array' Data Analysis version 3.5 を使用して実行した。ヒートマップを図 4B に示す。境界を 3 に設定すると、PC3 細胞で ARHGAP29 をノックダウンした後、1 つの遺伝子 (STAT3) がアップレギュレートされ、多数の遺伝子 (CSF1、ACTN3、HGF を含む) がダウンレギュレートされた (図 4C)。HGF、RHO、CAPN1 などの一部のタンパク質の調節は、Western blotting によって検証した。ただし、si-NC 細胞と si-ARHGAP29 細胞の間でこれらのタンパク質の発現に違いは認めなかった (データ未提示)。アレイ内の 84 個の遺伝子のダウンレギュレートされた遺伝子の中で、PC3 細胞における ARHGAP29 のノックダウン後、mRNA および蛋白発現レベルにおいてアクティブな MMP2 発現が有意に減少した (図 2B および C および 4D)。

### ARHGAP29 の発現レベルと前立腺癌患者の予後との関連。

根治的前立腺全摘除術を受けた 133 人の前立腺癌患者を対象に IHC によって ARHGAP29 の発現レベルについて評価した。前立腺癌標本 (陰性および陽性) における YAP および ARHGAP29 染色の代表的な画像を図 5A に示す。YAP の発現は基底細胞の核と管腔細胞の細胞質で高かったが、ARHGAP29 の発現は両方の細胞の細胞質で高かった。特に、YAP 発現はグリーソンスコアとは関連は認められなかった。前立腺癌患者の特徴を表 I に示す。ARHGAP29 の発現は、前立腺癌のリスク分類と有意に関連していた (図 5B)。YAP と ARHGAP29 はどちらも、予後マーカーとして AUC スコアが低かったが、これらの蛋白発現と生化学的無増悪生存期間との間に有意差を認めた (b-PFS : P = 0.0422、および P = 0.0123、それぞれ) (図 5C および D)。さらに、両方の蛋白が高発現な場合、有意に予後が悪い結果であった (図 5D)。TCGA データベースでは、YAP は高発現患者の予後不良の傾向を示さなかった。対照的に、ARHGAP29 は、TCGA で高発現している患者では予後不良の傾向を示した (図 S1A および S1B)。さらに、前立腺特異抗原 (PSA)、D'Amico リスク分類、グリーソンスコア、pathological T カテゴリなどの臨床病理学的パラメーターの予後的意義と、YAP、ARHGAP29 の発現レベルについて前立腺癌患者で評価した (表 II)。その結果、多変量解析を行い、ARHGAP29 の高発現が、b-PFS に関連する有意な独立したリスク因子であることがわかった (HR = 2.27; P < 0.05; データは未提示)。

## 6. 考察

YAP は、悪性黒色腫だけでなく、胃癌、乳癌、肝細胞癌、膵臓癌、肺癌などの幾つかの癌で発癌性タンパク質として明らかにされている (25-31)。他の癌と同様に、YAP は前立腺癌細胞の遊走と浸潤を調節する (13)。幾つかの ARHGAP は、ほとんど全ての基本的な細胞プロセスで Rho GTPase 活性を増強し、発癌性または腫瘍抑制タンパク質として働くことがわかっている (32)。たとえば、ARHGAP5 および ARHGAP42 は鼻咽頭癌の発癌性タンパク質であることが明らかになっている一方で (33, 34)、ARHGAP24 は肺癌、乳癌、および結腸直腸癌の腫瘍抑制タンパク質であることが示されている (35-38)。多数の研究により、ARHGAP と幾つかの悪性腫瘍との間に密接な関連が実証されている。

最近、ARHGAP18 や ARHGAP29 (17, 18) などの ARHGAP が YAP の転写標的として同定され、ARHGAP29 が胃癌の予後マーカーとして報告された。前立腺癌における ARHGAP29 に関する研究はないため、本研究では、ARHGAP29 が前立腺癌の進行または転移にどのように影響するか、および ARHGAP29 が前立腺癌の予後マーカーであるかどうかを検証する目的で実験を行った。最初に、4 つの前立腺癌細胞株 (22Rv1、LNCaP、DU145、お



および PC-3) でのタンパク質発現を評価した。これらの細胞株の中で、PC-3 と DU145 は AR を発現しなかったが、YAP を高度に発現していた。対照的に、YAP 発現は AR 発現細胞株 (22Rv1 および LNCaP) では低かった。PC-3 は、他の 3 つの細胞株と比較して ARHGAP29 を高度に発現していた。AR-null PC-3 細胞は、骨転移に由来する (39, 40)。PC-3 細胞で ARHGAP29 を完全にノックダウンした後、それらの増殖能と浸潤能は大幅に低下した。対照的に、LNCaP および DU145 細胞における ARHGAP29 のアップレギュレーション後に、細胞の増殖能と浸潤能は増加した。本研究では、AR と ARHGAP29 の間の直接的な相互作用については検証していないが、これらの結果から、ARHGAP29 が前立腺癌細胞の細胞増殖と浸潤を調節することを示している。最近、Qiao らは、ARHGAP29 が RhoA-コフィリン経路を抑制し、F-actin を不安定化し、細胞骨格の再配列を引き起こし、遊走能を促進することを実証した (18)。本研究では、RhoA-cofilin 経路の特定のタンパク質を PC-3、LNCaP、および DU145 細胞で解析した。具体的には、PC-3 細胞で ARHGAP29 が完全にノックダウンしたとき、リン酸化 cofilin と F-actin が増加した。さらに、リン酸化 cofilin の cofilin に対する相対的なタンパク質レベルが増加した。これらのデータは、胃癌細胞株に関する最近の研究の結果と一致していた (18)。DU145 細胞で ARHGAP29 のアップレギュレーション後に、F-actin はわずかに減少した。PC-3 細胞では、ARHGAP29 は、以前の研究と同様に RhoA-cofilin 経路を抑制することにより、細胞の遊走に関連している可能性がある (18)。ただし、cofilin とリン酸化 cofilin の発現は、LNCaP 細胞と DU145 細胞では変化しなかった。すなわち、LNCaP と Du145 の結果は、ARHGAP29 ノックダウン PC-3 の実験結果の逆の結果とはならなかった。これらのことは、各細胞株が異なる遺伝子型/表現型を持っているという過去の論文によって説明されるかもしれない (例えば、PC-3 細胞だけが  $\alpha$ -カテニンを発現していない) (40)。LNCaP および DU145 細胞では、ARHGAP29 を上流で制御することで、別の経路を介して F-アクチンが減少する可能性があるが、これを実証するには更なる実験が必要である。

Rho-A-cofilin 経路とは別に、ARHGAP29 に関連する新しい標的または癌経路を特定するために、本研究の機能解析データに基づいて事前に設計されたアレイ (Human Cell Motility) を使用した。アレイ内の 84 個の遺伝子のうち、PC-3 細胞で ARHGAP29 のノックダウン後、いくつかの遺伝子の発現が変化した。これらの遺伝子の中で、MMP-2 の発現について RT-qPCR とウエスタンブロッティングによって検証した。ECM を分解するマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) ファミリーの中で、ゲラチナーゼ A としても知られる MMP-2 は、癌細胞の浸潤と転移、および多数のヒト癌組織における血管新生と関連していることが報告されている (41, 42)。さらに、Zhang らは、胃癌における YAP の役割を示し、LATS1 が YAP の核内移行を抑制し、同時に MMP-2 発現をダウンレギュレートすることにより、胃癌細胞の増殖と転移を阻害することを明らかにした (43)。これは、癌細胞の進行を調節する YAP 経路が MMP-2 と関連していることを示唆している。前立腺癌の発生に関する以前の研究では、MMP-2 が浸潤、転移、および予後不良と関連していることが同様に示されている (44-46)。今回、ARHGAP29 は細胞の運動性を活性化して MMP-2 をアップレギュレートする可能性があることが考えられたが、ARGAP29 と MMP-2 の直接的な相関関係を示すことができなかった。したがって、この理論をサポートするには、さらなる実験が必要である。

次に、免疫組織化学染色を行い、前立腺癌患者における YAP および ARHGAP29 タンパク質発現の臨床的役割を調べた。その結果、ARHGAP29 の高発現が、前立腺癌のリスク分類である D'Amico リスク分類、および前立腺癌患者の予後 (PSA PFS) に関連していることがわかった。本研究では、YAP または ARHGAP29 の発現が高い前立腺癌患者の予

後は著しく不良であった。TCGA データベースと我々のデータには相違を認めるが、これは人種差を含むコホート間で異なる特性を有していることに起因する可能性がある。我々のデータに基づく、ARHGAP29 は予後予測マーカーとなり、また治療標的となる可能性がある。現在の結果を確認するために、将来的には日本のサンプルを用いた大規模なデータ分析が必要である。

本研究の limitation は、ヒト前立腺標本における AR、YAP、および ARHGAP29 の共局在研究の欠如、および前立腺癌細胞における ARHGAP29 レスキュー実験が欠如していることにある。

結論として、ARHGAP29 は、前立腺癌細胞の成長と浸潤、および前立腺癌患者の臨床的に不良な予後に関連している可能性があることが実証された。したがって、ARHGAP29 は、前立腺癌の新規のバイオマーカーまたは新しい治療標的として役立つ可能性がある。今後の研究では、YAP-ARHGAP29 pathway の関係を検証し、前立腺癌の根本的なメカニズムを解明する必要がある。

## 7. 結語

前立腺癌細胞株ごとに ARHGAP29 の発現量に差異があるものの、ARHGAP29 の発現が前立腺癌細胞株の増殖能や浸潤能を促進させることが確認できた。PC-3 細胞株では、胃癌細胞株と同様に「ARHGAP29-cofilin pathway」を介して増殖能、浸潤能を促進させている可能性が示唆された。ARHGAP29 の発現レベルはリスク分類と相関があり、ARHGAP29 発現が高い程、前立腺癌患者の予後は有意に悪い結果であった。ARHGAP29 は前立腺癌の進行や予後に関わる可能性が示唆され、今後 CRPC のメカニズムの解明や新規の予後予測バイオマーカーまたは新規治療標的として役立つ可能性が考えられた。

## 8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、技術支援を頂いた泌尿器科学講座の藤田喜代美さん、システムズ再生・病態医化学講座の北川孝雄先生に感謝致します。

## 9. 参考文献

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68: 394-424, 2018.
2. Pagliuca M, Buonerba C, Fizazi K, Di Lorenzo G. The Evolving Systemic Treatment Landscape for Patients with Advanced Prostate Cancer. *Drugs*. 2019 Feb 11.
3. Xu J, Zheng SL, Komiya A, et al.: Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet* 32: 321-325, 2002.
4. Jefferies MT, Cox AC, Shorning BY, et al.: PTEN loss and activation of K-RAS and  $\beta$ -catenin cooperate to accelerate prostate tumorigenesis. *J Pathol* 243: 442-456, 2017.
5. Suzuki H, Freije D, Nusskern DR, et al.: Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues. *Cancer Res* 58: 204-209, 1998.

6. Suzuki H, Komiya A, Aida S, Ito H, Yatani R, Shimazaki J: Detection of human papillomavirus DNA and p53 gene mutations in human prostate cancer. *Prostate* 28: 318-324, 1996.
7. Grignon DJ, Caplan R, Sarkar FH, et al.: p53 status and prognosis of locally advanced prostatic adenocarcinoma: a study based on RTOG 8610. *J Natl Cancer Inst* 89: 158-165, 1997.
8. Zhou Z, Flesken-Nikitin A, Corney DC, et al.: Synergy of p53 and Rb deficiency in a conditional mouse model for metastatic prostate cancer. *Cancer Res* 66: 7889-7898, 2006.
9. Dong JT, Li CL, Sipe TW, Frierson HF Jr: Mutations of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancers from Chinese patients. *Clin Cancer Res* 7: 304-308, 2001.
10. Wang SI, Parsons R, Ittmann M: Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in a subset of prostate adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 4: 811-815, 1998.
11. Lin HK, Hu YC, Lee DK, Chang C: Regulation of androgen receptor signaling by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) tumor suppressor through distinct mechanisms in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol* 18: 2409-2423, 2004.
12. Nelson PS: Molecular states underlying androgen receptor activation: a framework for therapeutics targeting androgen signaling in prostate cancer. *J Clin Oncol* 30: 644-646, 2012.
13. Zhang L, Yang S, Chen X, et al.: The hippo pathway effector YAP regulates motility, invasion, and castration-resistant growth of prostate cancer cells. *Mol Cell Biol* 35: 1350-1362, 2015.
14. Noh MG, Kim SS, Hwang EC, Kwon DD, Choi C: Yes-Associated Protein Expression Is Correlated to the Differentiation of Prostate Adenocarcinoma. *J Pathol Transl Med* 51: 365-373, 2017.
15. Collak FK, Demir U, Ozkanli S, Kurum E, Zerk PE: Increased expression of YAP1 in prostate cancer correlates with extraprostatic extension. *Cancer Biol Med* 14: 405-413, 2017.
16. Jin X, Zhao W, Zhou P, Niu T: YAP knockdown inhibits proliferation and induces apoptosis of human prostate cancer DU145 cells. *Mol Med Rep* 17: 3783-3788, 2018.
17. Porazinski S, Wang H, Asaoka Y, et al.: YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. *Nature* 521: 217-221, 2015.
18. Qiao Y, Chen J, Lim YB, et al.: YAP Regulates Actin Dynamics through ARHGAP29 and Promotes Metastasis. *Cell Rep* 19: 1495-1502, 2017.
19. Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al.: Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474: 179-183, 2011.
20. Goulding H, Pinder S, Cannon P, et al.: A new immunohistochemical antibody for the assessment of estrogen receptor status on routine formalin-fixed tissue samples. *Hum Pathol* 26: 291-294, 1995.
21. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, et al.: Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2309-2317, 2003.
22. Pirker R, Pereira JR, von Pawel J, et al.: EGFR expression as a predictor

- of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol* 13: 33-42, 2012.
23. Kawakami T, Takeuchi S, Arimura Y, et al.: Elevated antilyosomal-associated membrane protein-2 antibody levels in patients with adult Henoch-Schönlein purpura. *Br J Dermatol* 166: 1206-1212, 2012.
  24. Pan Z, Tian Y, Zhang B, et al.: YAP signaling in gastric cancer-derived mesenchymal stem cells is critical for its promoting role in cancer progression. *Int J Oncol* 51: 1055-1066, 2017.
  25. Chen D, Sun Y, Wei Y, et al.: LIFR is a breast cancer metastasis suppressor upstream of the Hippo-YAP pathway and a prognostic marker. *Nat Med* 18: 1511-1517, 2012.
  26. Lamar JM, Stern P, Liu H, Schindler JW, Jiang ZG, Hynes RO: The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E2441-2450, 2012.
  27. Xu MZ, Chan SW, Liu AM, et al.: AXL receptor kinase is a mediator of YAP-dependent oncogenic functions in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 30: 1229-1240, 2011.
  28. Zhang M, Zhao Y, Zhang Y, et al.: LncRNA UCA1 promotes migration and invasion in pancreatic cancer cells via the Hippo pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864: 1770-1782, 2018.
  29. Hsu PC, Miao J, Huang Z, et al.: Inhibition of yes-associated protein suppresses brain metastasis of human lung adenocarcinoma in a murine model. *J Cell Mol Med* 22: 3073-3085, 2018.
  30. Jin D, Guo J, Wang D, et al.: The antineoplastic drug metformin downregulates YAP by interfering with IRF-1 binding to the YAP promoter in NSCLC. *EBioMedicine* 37: 188-204, 2018.
  31. Tcherkezian J, Lamarche-Vane N: Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell* 99: 67-86, 2007.
  32. Fang Y, Zhu X, Wang J, et al.: MiR-744 functions as a proto-oncogene in nasopharyngeal carcinoma progression and metastasis via transcriptional control of ARHGAP5. *Oncotarget* 6: 13164-13175, 2015.
  33. Hu Q, Lin X, Ding L, et al.: ARHGAP42 promotes cell migration and invasion involving PI3K/Akt signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Med* 7: 3862-3874, 2018.
  34. Wang L, Shen S, Wang M, et al.: Rho GTPase Activating Protein 24 (ARHGAP24) Silencing Promotes Lung Cancer Cell Migration and Invasion by Activating  $\beta$ -Catenin Signaling. *Med Sci Monit* 25: 21-31, 2019.
  35. Dai X, Geng F, Dai J, Li M, Liu M: Rho GTPase Activating Protein 24 (ARHGAP24) Regulates the Anti-Cancer Activity of Sorafenib Against Breast Cancer MDA-MB-231 Cells via the Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Signaling Pathway. *Med Sci Monit* 24: 8669-8677, 2018.
  36. Uehara S, Saito K, Asami H, Ohta Y: Role of ARHGAP24 in ADP Ribosylation Factor 6 (ARF6)-dependent Pseudopod Formation in Human Breast Carcinoma

- Cells. 35. *Anticancer Res* 37: 4837-4844, 2017.
37. Zhang S, Sui L, Zhuang J, et al.: ARHGAP24 regulates cell ability and apoptosis of colorectal cancer cells via the regulation of P53. *Oncol Lett* 16: 3517-3524, 2018.
38. Mitchell S, Abel P, Ware M, et al.: Phenotypic and genotypic characterization of commonly used human prostatic cell lines. *BJU International* 85: 932-944, 2000.
39. Li Y, Song T, Chen Z, Wang Y, Zhang J, Wang X: Pancreatic Stellate Cells Activation and Matrix Metalloproteinase 2 Expression Correlate With Lymph Node Metastasis in Pancreatic Carcinoma. *Am J Med Sci* 357: 16-22, 2019.
40. Maekawa R, Maki H, Yoshida H, et al.: Correlation of antiangiogenic and antitumor efficacy of N-biphenyl sulfonyl-phenylalanine hydroxamic acid (BPHA), an orally-active, selective matrix metalloproteinase inhibitor. *Cancer Res* 59: 1231-1235, 1999.
41. Zhang J, Wang G, Chu SJ, et al.: Loss of large tumor suppressor 1 promotes growth and metastasis of gastric cancer cells through upregulation of the YAP signaling. *Oncotarget* 7: 16180-16193, 2016.
42. Maekawa R, Maki H, Yoshida H, Hojo K, Tanaka H, Wada T, Uchida N, Takeda Y, Kasai H, Okamoto H, et al.: Correlation of antiangiogenic and antitumor efficacy of N-biphenyl sulfonyl-phenylalanine hydroxamic acid (BPHA), an orally-active, selective matrix metalloproteinase inhibitor. *Cancer Res* 59: 1231-1235, 1999.
43. Zhang J, Wang G, Chu SJ, Zhu JS, Zhang R, Lu WW, Xia LQ, Lu YM, Da W and Sun Q: Loss of large tumor suppressor 1 promotes growth and metastasis of gastric cancer cells through upregulation of the YAP signaling. *Oncotarget* 7: 16180-16193, 2016.
44. Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Harel F and Têtu B: Significance of MMP-2 expression in prostate cancer: An immunohistochemical study. *Cancer Res* 63: 8511-8515, 2003.
45. Chen PC, Tang CH, Lin LW, Tsai CH, Chu CY, Lin TH and Huang YL: Thrombospondin-2 promotes prostate cancer bone metastasis by the up-regulation of matrix metalloproteinase-2 through down-regulating miR-376c expression. *J Hematol Oncol* 10: 33, 2017.
46. Ito Y, Ishiguro H, Kobayashi N, Hasumi H, Watanabe M, Yao M and Uemura H: Adipocyte-derived monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. *Prostate* 75: 1009-1019, 2015

图 1. AR, YAP, ARHGAP29, and F-actin expression in prostate cancer cell lines(22Rv1, LNCaP, DU145 and PC-3)

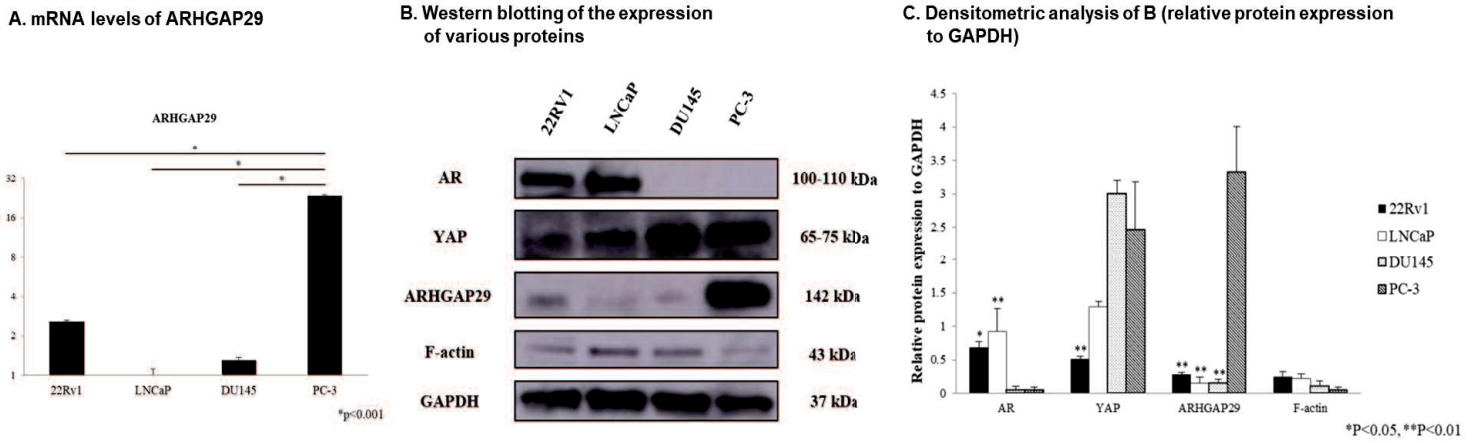


图 2. Effects of downregulation or upregulation of ARHGAP29 in prostate cancer cell lines (PC-3, LNCaP and DU145)

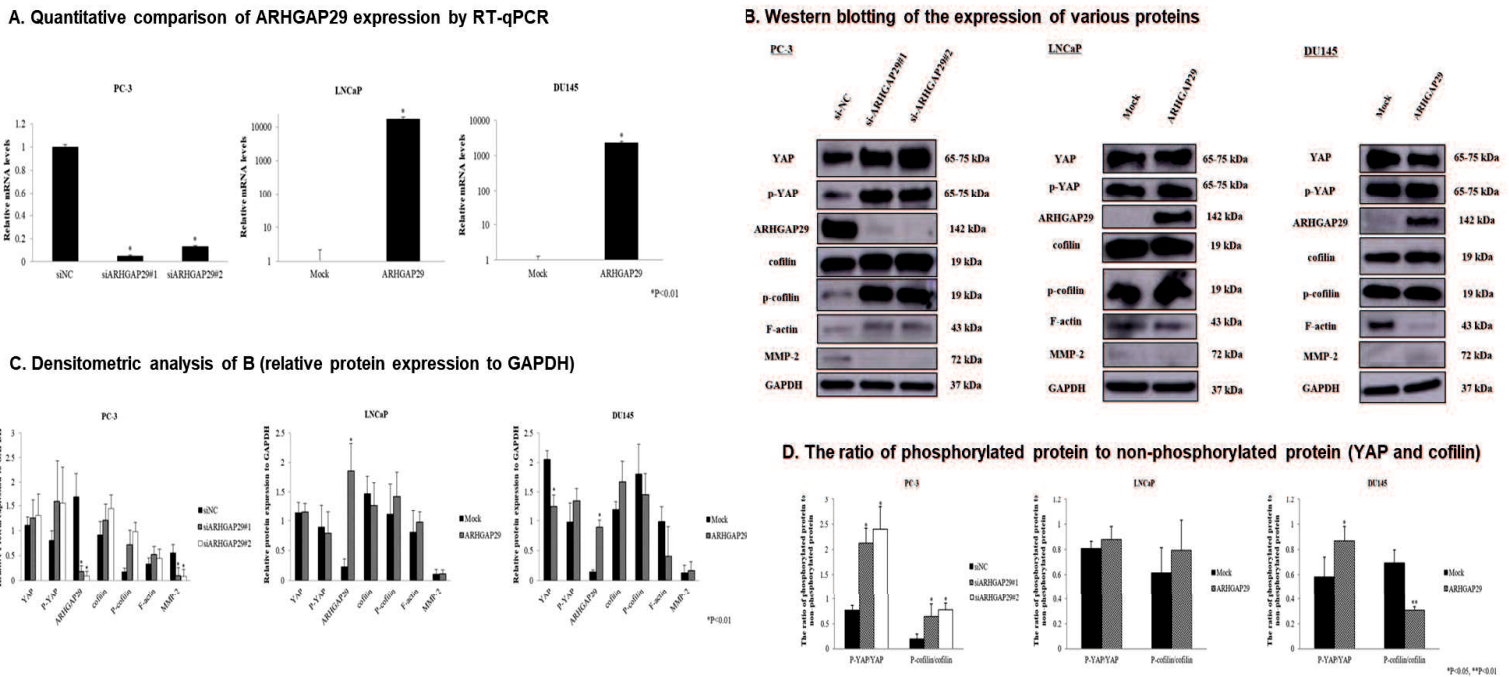
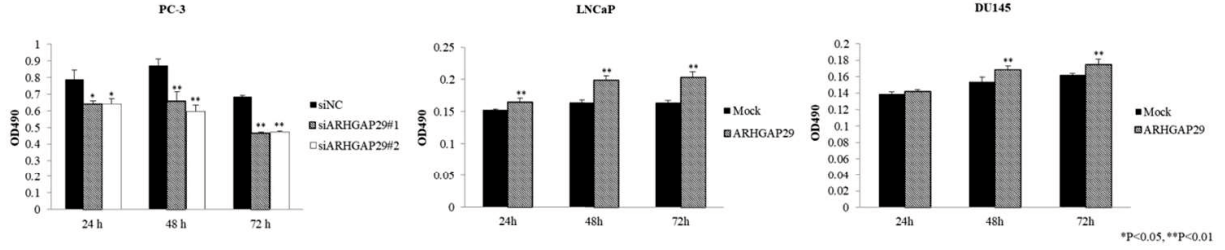


Fig 3. Effects of downregulation or upregulation of ARHGAP29 in prostate cancer cell lines (PC-3, LNCaP, and DU145)

A. MTS assay



B. Invasion assay

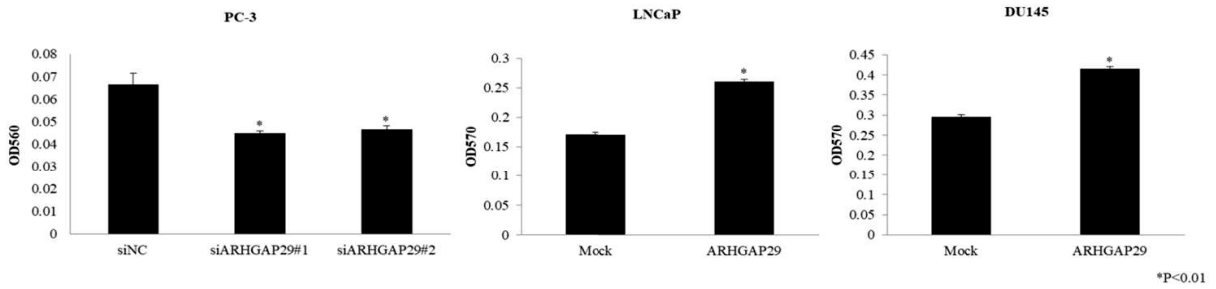
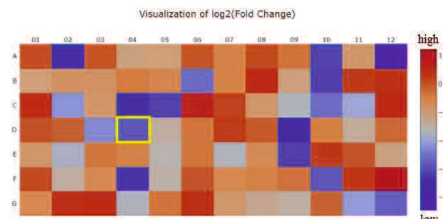


Fig 4. Identification of other cell motility-related genes after knockdown of ARHGAP29.

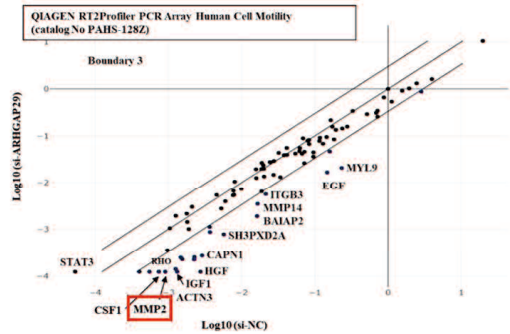
A. The 84 genes related to cell motility

gene information	gene information
A1 ACTN1 Actinin, alpha 1	E1 PFN1 Profilin 1
A2 ACTN3 Actinin, alpha 3	E2 PRKCA Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
A3 ACTN4 Actinin, alpha 4	E3 PLAUR Phosphotyrosine activator, arylsulfonamide receptor
A4 ACTR2 ARF2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	E4 PLCG1 Phospholipase C, gamma 1
A5 ACTR3 ARF3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	E5 PLEK1 Phospholipase D1, phosphatidylethanolamine-specific
A6 AKT1 v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	E6 PRKAC Protein kinase C, alpha
A7 ARF6 ADP-ribosylation factor 6	E7 PTEN Phosphatase and tensin homolog
A8 ARHGAP8 Rho GTP dissociation inhibitor (GDI) alpha	E8 PTK2B PTK2 protein tyrosine kinase 2
A9 ARHGAP7 Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	E9 PTK2K PTK2 protein tyrosine kinase 2 beta
A10 BAP1 BAP1 associated protein 2	E10 PTPN11 Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1
A11 BCAR1 Breast cancer anti-estrogen resistance 1	E11 PKN2 Parvillin
A12 CAPN3 Capillin 3 (sm) large subunit	E12 RAC1 Rac-related C3H/HeJ murine leukemia virus substrate 1 (rho family, small GTP-binding protein Rac1)
B1 CAPN3 Capillin 3 (sm) large subunit	E13 RAC2 Rac-related C3H/HeJ murine leukemia virus substrate 2 (rho family, small GTP-binding protein Rac2)
B2 CAV1 Cavolin 1, caveolar protein, 25kDa	E14 RASA1 RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1
B3 CDC42 Cell division cycle 42 GTP binding protein, 25kDa	F1 RHO RhoGuanin
B4 CTL1 Cellulin 1 (non-muscle)	F2 RHOA Rho GTPase
B5 CRK1 c-rk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)	F3 RHOB Rho GTPase
B6 CSF1 Colony stimulating factor 1 (macrophage)	F4 RHOCD Rho GTPase
B7 CTXN Cortactin	F5 RHOCT Rho GTPase
B8 DLAP1 Diaphanous homolog 1 (Drosophila)	F6 RHOH Rho GTPase
B9 DPP4 Dipeptidyl peptidase 4	F7 RHOI Rho GTPase
B10 EGF EGF-derived growth factor	F8 RHOJ Rho GTPase
B11 EGRF Epidermal growth factor receptor	F9 ROCK1 Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1
B12 ENAH Enabled homolog (Drosophila)	F10 SH3BP2 SH3 and PH domain 2A
C1 E2F1 E2F transcription factor, alpha	F11 SRC Src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
C2 E2F2 E2F transcription factor, beta	F12 STAT3 Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
C3 FGF2 Fibroblast growth factor 2 (basic)	G1 SYLN Nupregulin
C4 HGF Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A, scatter factor)	G2 TGFBI Transforming growth factor, beta 1
C5 IGF1 Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	G3 TMDP1 TMDP metalloproteinase inhibitor 2
C6 IGF1R Insulin-like growth factor 1 receptor	G4 TNLN1 Tnlm 1
C7 IIR Integrin-linked kinase	G5 VASP Vasodilator-stimulated phosphoprotein
C8 ITGA4 Integrin, alpha 4 (alpha 4 beta 4 subunit of VLA-4 receptor)	G6 VCL Vinculin
C9 ITGB1 Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29/alpha 5 beta 1)	G7 VEGFA Vascular endothelial growth factor A
C10 ITGB2 Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	G8 VEGFB Vascular endothelial growth factor B
C11 ITGB3 Integrin, beta 3 (alpha 5 beta 1 subunit of alpha 5 beta 1 integrin)	G9 WASF1 WAS protein family, member 1
C12 LAMC1 LIM domain class 1	G10 WASF2 WAS protein family, member 2
D1 NAKP1 Nucleoside diphosphate kinase 1	G11 WIP1 WIP1 phosphatase
D2 ME1 Mitogen-activated protein kinase 1	H1 ACTB Actin, beta
D3 MMP1 Matrix metalloproteinase 1 (matrilysin)	H2 ACTG1 Actin, gamma 1
D4 MMP2 Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	H3 ACTH Actin, theta
D5 MMP9 Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	H4 HPR1 Hyaluronidase phosphatase 1
D6 NNS Nucleoside diphosphate kinase 2 (non-muscle)	H5 RPLP0 Ribosomal protein, large, P0
D7 MYH9 Myosin, heavy chain 9, non-muscle	H6 RUC3 Rho GTPase
D8 MYH9 Myosin, heavy chain 9, non-muscle	H7 RUC4 Rho GTPase
D9 MYL9 Myosin, light chain 9, regulatory	H8 RUC5 Rho GTPase
D10 MYLK Myosin light chain kinase	H9 RUC6 Rho GTPase
D11 PAK1 P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1	H10 PFC Positive PCR Control
D12 PAK2 P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2	H11 PFC Positive PCR Control
	H12 PFC Positive PCR Control

B. heatmap



C. PCR Array of cell motility genes in PC-3 cells before and after downregulation of ARHGAP29.



D. Quantitative comparison of MMP-2 by RT-qPCR between si-NC and si-ARHGAP29 PC-3 transfectants.

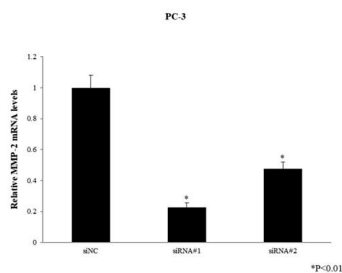
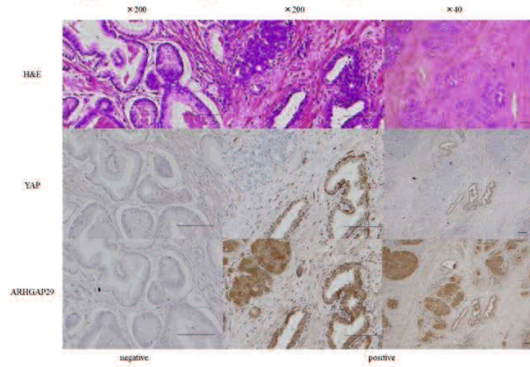


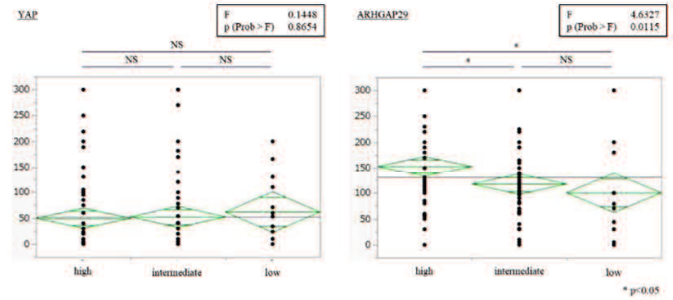


图 5. Association between the expression levels of YAP and ARHGAP29 and the prognosis of prostate cancer patients.

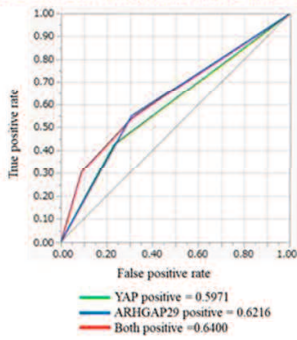
A. Histology (H&E staining) and IHC staining of YAP or ARHGAP29.



B. Association of the D'Amico risk classification with the expression of YAP and ARHGAP29.



5C. ROC curve of YAP, ARHGAP29 and both



5D. Kaplan-Meier plot of biochemical PFS stratified by the expression levels of YAP, ARHGAP29 and both.

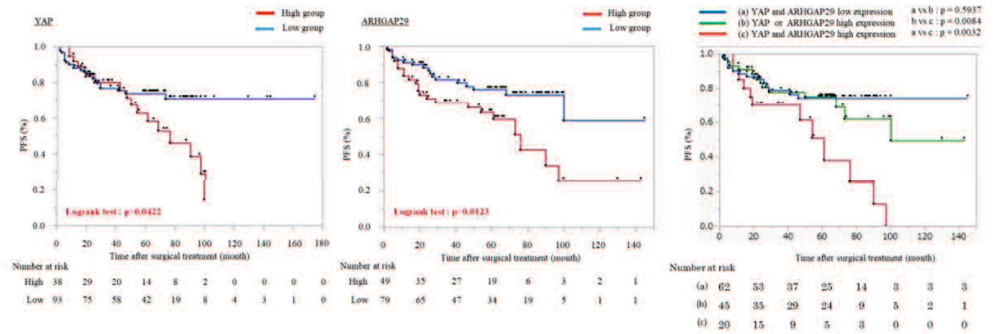
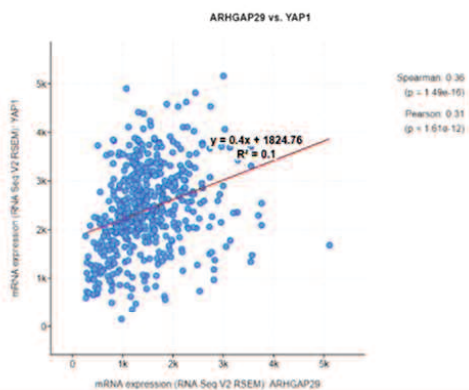


图 S1. YAP and ARHGAP29 expression in the TCGA database.

A. Correlation between YAP and ARHGAP29 expression in prostate cancer cells.



B. Kaplan-Meier plot of PFS stratified by the expression levels of YAP and ARHGAP29.

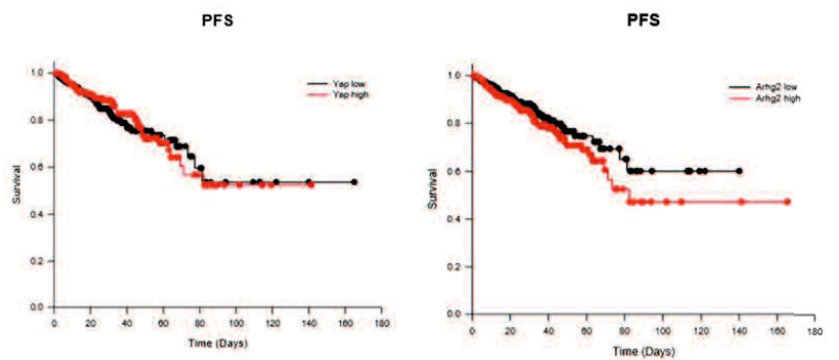




Table I. Characteristics of 133 patients who underwent radical prostatectomy.

Characteristics	n (%)
Age in years, median (range)	67 (54-76)
Initial PSA, median (range)	8.69 ng/ml (3.53-354 ng/ml)
Clinical T category	
≤ T1c	30 (23%)
T2a	21 (16%)
T2b	60 (45%)
T2c	17 (13%)
≥ T3	5 (4%)
D'Amico risk classification	
Low	15 (11%)
Intermediate	55 (41%)
High	63 (47%)
Gleason score	
≤ 6	33 (25%)
7	65 (49%)
≥ 8	35 (26%)
Preoperative ADT	
Yes	35 (25%)
No	98 (75%)

PSA, prostate specific antigen; ADT, androgen deprivation therapy.

Table II. Univariate and multivariate analyses of prognostic factors associated with biochemical recurrence-free survival of prostate cancer patients.

	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	P-value	HR (95% CI)	P-value
Initial PSA* (ng/ml)				
<20 vs. ≥20	0.53 (0.30-1.00)	0.049	0.37 (0.15-0.88)	0.025
D'Amico risk classification				
Low, Intermediate vs. High	0.73 (0.43-1.24)	0.248		
Gleason score				
<8 vs. ≥8	0.84 (0.47-1.57)	0.567		
Pathological T category				
<pT2c vs. ≥pT2c	0.60 (0.30-1.10)	0.099		
Expression of YAP				
Low vs. High	0.53 (0.28-1.01)	0.052		
Expression of ARHGAP29				
Low vs. High	0.46 (0.24-0.86)	0.015	0.44 (0.19-0.95)	0.037

HR, Hazard ratio; CI, confidence interval; PSA, prostate specific antigen; YAP, yes-associated protein; ARHGAP29, Rho GTPase-activating protein 29.