

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04297

研究課題名(和文) 前立腺癌における悪性形質およびアンドロゲン不応性の一元的制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the unitary regulation on the malignant transformation and androgen insensitivity in prostate cancer.

研究代表者

渡部 昌実 (Watanabe, Masami)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：70444677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：REIC/Dkk-3遺伝子を癌細胞内で強制発現することにより、アポトーシスが誘導される。本研究により、REIC/Dkk-3はAndrogen標的性を持つ前立腺癌において、RasおよびAndrogenシグナルの両方を制御し、Androgen除去療法抵抗性前立腺癌の発生に関与すると考えられた。またREIC/Dkk-3のこれらの機能と、細胞内に張り巡らされた細胞骨格に基づく分子輸送システムとの関連を示唆する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療遺伝子REIC/Dkk-3を用いた前立腺癌に対するin situ遺伝子治療の臨床研究では、癌細胞において細胞死が誘導されることが示されている。本研究の学術的な成果は、特に臨床の現場で問題となる内分泌療法抵抗性前立腺癌の発生制御に関わる細胞内因子として、REIC/Dkk-3タンパク質およびその関連タンパク質群の存在を明らかにしたことにある。これらのタンパク質群の更なる分子的・機能的解析を行うことにより、前立腺癌をはじめとする各種癌疾患に対する新規の医薬品開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Reduced expression in immortalized cells (REIC)/Dickkopf (Dkk)-3, a tumor suppressor gene, induces apoptosis in cancer cells when overexpressed in the cells. In this study, we disclosed the significance of REIC/DKK-3 in the development of androgen-independent prostate cancer involving the regulation of Ras signaling and androgen sensitivity. Furthermore, we obtained findings that provide novel insights to improve the understanding of cytoskeleton based molecular transport system which could be associated with the molecular functions of REIC/Dkk-3.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 内分泌療法抵抗性 REIC/Dkk-3 細胞骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の我々の研究において、癌抑制タンパク質 REIC/Dkk-3 が各種正常・癌細胞内において Oncogenic Ras シグナルを抑制していることが示唆され、また、REIC/Dkk-3 に結合するタンパク質として、SGTA (small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein) が同定された。単量体 p21GTP 結合タンパク質 (Small GTPase) である Ras は、不活性型の GDP 結合状態と活性型の GTP 結合状態間を循環し、増殖・形質転換・アポトーシス・移動・細胞周期の進行など、多くの細胞機能を制御している。そして活性型 Ras の細胞内蓄積は、正常細胞の癌化誘導の一つの要因になると考えられている。一方で、SGTA タンパク質は、各種タンパク質のフォールディングや品質制御 (特に複合体形成、輸送、リフォールディング等) に重要な働きをするシャペロン補助因子である。諸家の報告により SGTA が Androgen シグナルを標的細胞内で抑制することが知られていた。

2. 研究の目的

我々は新たに、癌抑制遺伝子・タンパク質である REIC/Dkk-3 が SGTA と結合して SGTA により抑制された Androgen シグナルを回復させる作用を持つことを見出した。REIC/Dkk-3 の細胞内発現の減少により男性ホルモン受容体 (AR: Androgen Receptor) シグナルへの不応性が誘導され、また悪性形質獲得シグナルが活性化され、Androgen 除去療法抵抗性の前立腺癌細胞が誘導されるという仮説に基づき、検証を行う。この過程で、REIC/Dkk-3 による AR シグナルの制御機構および REIC/Dkk-3 による Ras 活性化の制御機構のそれぞれについて分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) REIC/Dkk-3 が SGTA と結合して SGTA により抑制された Androgen シグナルを回復させる作用を持つことを検証する研究を実施した。さらに Androgen 感受性を有するヒト正常前立腺上皮細胞 (PrEC) およびヒト前立腺癌細胞 (PC3)、またマウス正常前立腺原基に癌化遺伝子である Ras および Myc を導入して確立されたマウス前立腺由来癌細胞 (RM-9) 等の細胞を用いて、REIC/Dkk-3 発現を特異的 siRNA でノックダウンする等、in vitro 実験系での各種遺伝子操作により研究を実施した。

(2) 内分泌療法抵抗性前立腺癌の発生機序を明らかにするべく、REIC/Dkk-3 およびその関連因子の機能を解析し、前立腺癌における悪性形質および Androgen 不応性の一元的制御機構の分子メカニズムの解明を進めた。REIC/Dkk-3 と SGTA および Tctex-1 による AR シグナルの制御機構および悪性形質活性化の制御機構の観点から、解析を実施した。また、Androgen 産生性の幹細胞に関する研究として間葉系幹細胞に着目し、当該幹細胞に関する分離、細胞機能に関する研究を実施した。

(3) Androgen シグナル解析と同様に、REIC/Dkk-3 と SGTA との機能的結合に基づく各種ステロイド核内受容体 (Glucocorticoid 受容体および Estrogen 受容体) の核内移行制御機構に関する解析を実施した。各ステロイド受容体の核内移行受容体・転写活性因子としての機能をレポーターアッセイで解析する為に、それぞれの受容体シグナル伝達強度を数値化できる各種 promoter-ルシフェラーゼ遺伝子発現系を用いた。

(4) REIC/Dkk-3 遺伝子および SGTA 遺伝子の機能ドメインの同定する為の研究を実施した。ヒト前立腺癌 cDNA ライブラリーを標的とした Yeast two-hybrid assay により同定された REIC/Dkk-3 相互作用タンパク質である SGTA について、これら両分子の部分配列 construct を作製し、Mammalian two-hybrid assay を用いて相互結合 (機能) ドメインを解析した。SGTA の N 末端側で REIC/Dkk-3 と結合しかつ自身で 2 量体を形成する部位 (SGTA [24-41]) の 18 個のアミノ酸と、REIC/Dkk-3 の N

末端側でSGTAと結合する部位のREIC/Dkk-3 [57-74]の18個のアミノ酸が高いホモロジーを有することを踏まえて、REIC/Dkk-3 [57-74]の部位がPutative competitive region for SGTA dimerization としてSGTA dimerization regionであるSGTA [24-41]に結合するとの仮説のもと、各種解析を行った。本研究では、さらに悪性形質の獲得と癌化の観点から、各種の癌関連遺伝子および細胞内代謝関連遺伝子のmutationに関する研究を実施した。

4. 研究成果

REIC/Dkk-3はAndrogen 標的性を持つ前立腺癌において、Ras および Androgen シグナルの両方を制御することにより Androgen 除去療法抵抗性前立腺癌の発生に与関することを示す数々の知見を得ることができた。また REIC/Dkk-3 のこれらの機能と、細胞内に張り巡らされた細胞骨格に基づく分子輸送システムとの関連を示唆する知見が得られた。すなわち、REIC/Dkk-3 と SGTA または Tctex-1 と細胞骨格を司る既知のタンパク質群とが協働して Androgen Receptor 複合体および Ras 活性化制御因子の細胞内輸送に与関し、AR シグナルおよび Oncogenic Ras レベルを制御していると考えられる。今後、細胞骨格関連タンパク質群の解析を含めた細胞生物学的なアプローチにより、各種癌の悪性形質獲得に関する解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10件)

Ochiai K, Azakami D, Morimatsu M, Hirama H, Kawakami S, Nakagawa T, Michishita M, Egusa AS, Sasaki T, Watanabe M, Omi T. Endogenous Leu332Gln mutation in p53 disrupts the tetramerization ability in a canine mammary gland tumor cell line. *Oncol Rep.* 2018 Jul;40(1):488-494. DOI: 10.3892/or.2018.6409. 査読有.

Kato Y, Ochiai K, Kawakami S, Nakao N, Azakami D, Bonkobara M, Michishita M, Morimatsu M, Watanabe M, Omi T. Canine REIC/Dkk-3 interacts with SGTA and restores androgen receptor signalling in androgenindependent prostate cancer cell lines. *BMC Vet Res.* 2017 Jun 9;13(1):170. DOI: 10.1186/s12917-017-1094-4. 査読有.

Azakami D, Nakahira R, Kato Y, Michishita M, Kobayashi M, Onozawa E, Bonkobara M, Kobayashi M, Takahashi K, Watanabe M, Ishioka K, Sako T, Ochiai K, Omi T. The canine prostate cancer cell line CHP-1 shows over-expression of the co-chaperone small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein . *Vet Comp Oncol.* 2017 Jun;15(2):557-562. DOI: 10.1111/vco.12199. 査読有.

Xu J, Sadahira T, Kinoshita R, Li SA, Huang P, Wada K, Araki M, Ochiai K, Noguchi H, Sakaguchi M, Nasu Y, Watanabe M. Exogenous DKK-3/REIC inhibits Wnt/ -catenin signaling and cell proliferation in human kidney cancer KPK1. *Oncol Lett.* 2017 Nov;14(5):5638-5642. DOI:10.3892/ol.2017.6833. 査読有.

Horikawa Y, Watanabe M, Sadahira T, Ariyoshi Y, Kobayashi Y, Araki M, Wada K, Ochiai K, Li SA, Nasu Y. Overexpression of REIC/Dkk-3 suppresses the expression of CD147 and inhibits the proliferation of human bladder cancer cells. *Oncol Lett.* 2017 Sep;14(3):3223-3228. DOI:10.3892/ol.2017.6548. 査読有.

Putranto EW, Kinoshita R, Watanabe M, Sadahira T, Murata H, Yamamoto KI, Futami J, Kataoka K, Inoue Y, Winarsa Ruma IM, Sumardika IW, Youyi C, Kubo M, Sakaguchi Y, Saito K, Nasu Y, Kumon H, Huh NH, Sakaguchi M. Expression of tumor suppressor REIC/Dkk-3 by a newly improved adenovirus vector with insertion of a hTERT promoter at the 3'-side of

the transgene. *Oncol Lett.* 2017 Jul;14(1):1041-1048. DOI:10.3892/ol.2017.6201. 査読有.

Mori A, Watanabe M, Sadahira T, Kobayashi Y, Ariyoshi Y, Ueki H, Wada K, Ochiai K, Li SA, Nasu Y. The Downregulation of the Expression of CD147 by Tumor Suppressor REIC/Dkk-3, and Its Implication in Human Prostate Cancer Cell Growth Inhibition. *Acta Med Okayama.* 2017 Apr;71(2):135-142. DOI:10.18926/AMO/54982. 査読有.

Ochiai K, Oda H, Shono S, Kato Y, Sugihara S, Nakazawa S, Azakami D, Michishita M, Onozawa E, Bonkobara M, Sako T, Shun-Ai L, Ueki H, Watanabe M, Omi T. Properties of the feline tumour suppressor reduced expression in immortalized cells (REIC/Dkk-3). *Vet Comp Oncol.* 2017 Dec;15(4):1181-1186. DOI:10.1111/vco.12254. 査読有.

Ariyoshi Y, Watanabe M, Eikawa S, Yamazaki C, Sadahira T, Hirata T, Araki M, Ebara S, Nasu Y, Udono H, Kumon H. The induction of antigen-specific CTL by in situ Ad-REIC gene therapy. *Gene Ther.* 2016 May;23(5):408-14. DOI: 10.1038/gt.2016.7. 査読有.

Uchida D, Shiraha H, Kato H, Sawahara H, Nagahara T, Iwamuro M, Kataoka J, Horiguchi S, Watanabe M, Takaki A, Nouse K, Nasu Y, Kumon H, Yamamoto K. Synergistic anti-pancreatic cancer immunological effects by treatment with reduced expression in immortalized cells/dickkopf-3 protein and peripheral blood mononuclear cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016 Jun;31(6):1154-9. DOI: 10.1111/jgh.13259. 査読有.

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：黄 鵬
ローマ字氏名：(PHAN PEN)
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：助教
研究者番号(8桁)：00610841

研究分担者氏名：野口 洋文
ローマ字氏名：(NOGUCHI HIROFUMI)
所属研究機関名：琉球大学

部局名：医学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：50378733

研究分担者氏名：植木 英雄
ローマ字氏名：(UEKI HIDEO)
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医学部
職名：技術専門職員
研究者番号（8桁）：90537218

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。