

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08352

研究課題名(和文) 前立腺癌進展および去勢抵抗性に対するHMGB2の役割解明

研究課題名(英文) The role of HMGB2 on prostate cancer progression and castration resistance

研究代表者

鈴木 周五 (Suzuki, Shugo)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60363933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：正常に比べ、前立腺癌で発現上昇を認めるHigh mobility group box 2 (HMGB2)の役割を、前立腺癌進展およびアンドロゲン依存性および去勢抵抗性それぞれの状態について検討した。ヒト手術検体で、組織異型や進行度に対して発現上昇を認めたものの、生存期間には関与していなかった。ホルモン療法によりHMGB2は発現低下傾向を示し、治療効果とHMGB2発現は反比例する結果が見られた。前立腺癌細胞株では、HMGB2がアンドロゲンレセプターを介する経路に関与することを確認した。また、アンドロゲン依存性および去勢抵抗性いずれの前立腺癌細胞株においても細胞増殖に関与した。

研究成果の概要(英文)：High mobility group box 2 (HMGB2), which belongs the HMG protein families, was up-regulated in prostate adenocarcinoma compared to normal epithelium. In this study, we investigated functions of HMGB2 for progression, androgen regulation and cell proliferation of hormone naive and castration resistant prostate cancer.

In prostatectomy samples, HMGB2 expression was correlated with Gleason grading and tumor stage, but was not related with overall survival. Compared to hormone naive prostate cancer, HMGB2 expression in hormone-treated prostate cancer tended to be decreased, and was reverse correlated with therapeutic effect.

In prostate cancer cell lines, HMGB2 regulated androgen receptor-mediated pathway in androgen dependent cell line, LNCaP. HMGB2 also regulated cell proliferation in both androgen dependent and independent cancer cell lines.

研究分野：病理学

キーワード：Prostate cancer HMGB2 progression cell proliferation androgen receptor

## 1. 研究開始当初の背景

High mobility group box 2 (HMGB2)は、high-mobility group protein family に属する核内非ヒストタンパクで、転写制御に関わる報告がされている。以前に我々は、ラットを用いた肝臓がん課程での遺伝子発現解析を行った結果、腺腫から癌に悪性転化する際に発現上昇する遺伝子として HMGB2 を見だし、ラット肝細胞癌細胞株において HMGB2 の発現抑制が細胞増殖抑制効果を示すことを報告した。また、HMGB1/2 抗体を用いた免疫組織化学染色で、核陽性率がラット肝細胞癌において、正常肝細胞や腺腫細胞よりも高いことを確認し(図1)、ヒト肝細胞癌においても周囲の非腫瘍部よりも有意に高いことを示した<sup>1)</sup>。近年、HMGB2 特異的な抗体が製品化され、同抗体を用いて非腫瘍部と腺腫、肝細胞癌に対して免疫組織化学染色を行った結果、より癌特異的な陽性率を占めるデータを取得した(図2)。その後、Kwonら<sup>2)</sup>がヒト肝細胞癌において、HMGB2 の mRNA 発現および免疫組織化学染色による核陽性率が、進展や予後に関わるデータを示している。

図1: HMGB1/2 発現

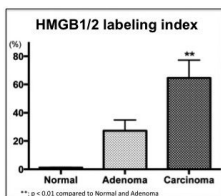
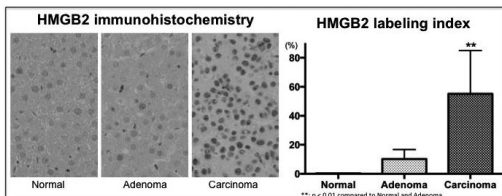


図2: ラット肝臓における HMGB2 発現



一方、ラットに、ヘテロサイクリックアミンに属する前立腺発癌物質である 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine(PhIP)を単回投与した際、発がん標的臓器である前立腺腺葉における遺伝子変動を Microarray 解析により検討した結果、HMGB2 の高発現を認めた。そこで前立腺腺葉に対して HMGB2 抗体を用いた免疫組織化学染色を行ったところ、対照群に比べ PhIP 投与群において核陽性率が有意に上昇することを確認した。加えて、前立腺発癌物質である PhIP や 3,2'-dimethyl-4-amino-biphenyl (DMAB)を用いて作成された前立腺腫瘍病変において HMGB2 の核染色陽性率を検討した結果、周囲の非腫瘍性病変に比べ有意な高陽性率を示すことが確認された。また、乳癌において HMGB2 は Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1)を介して、ホ

ルモン抵抗性に関与することが報告された<sup>3)</sup>。

## 2. 研究の目的

ヒト前立腺癌における HMGB2 の役割について、(1)ヒト前立腺癌において HMGB2 が予後因子などのバイオマーカーとしての役割を有するか、(2)前立腺癌における HMGB2 の役割について、前立腺癌細胞株を用いた機能解析を行う。特に去勢抵抗性に関連した HMGB2 の機能を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト前立腺癌における HMGB2 発現とバイオマーカーとしての役割検討

HMGB2 抗体を用いた免疫組織化学染色を下記の組織に行い、その核陽性率から HMGB2 の発現を確認することで、癌の進展との関連や、予後因子などバイオマーカーとして HMGB2 が役立つことを検討する。

以前<sup>4)</sup>に報告した膀胱癌摘出術時の正常前立腺組織および未治療の前立腺癌全摘出標本組織を用いて、正常前立腺上皮、前立腺上皮内腫瘍および腺癌病変における HMGB2 陽性率を検討し、癌の進展と HMGB2 発がんに正の相関が存在することを確認する。

治療抵抗性の前立腺癌組織に対する HMGB2 発現に注目して、去勢抵抗性に対する反応を検討する。

ホルモン療法を行われた後に前立腺を摘出した前立腺癌患者症例を用いて、組織内に存在する治療抵抗性腺癌の HMGB2 陽性率を上記の未治療例前立腺癌の陽性率と比較し、治療抵抗性病変における HMGB2 発現状態を検討する。

### (2) 前立腺癌における HMGB2 の役割について、前立腺癌細胞株を用いた機能解析

アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP を用いて、アンドロゲンに対する反応と HMGB2 発現および細胞増殖に関する因子を検討する。特に HMGB2 発現がアンドロゲン関連増殖活性に対して、どの程度関与するかを同定する。

アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP 細胞に、チャコール処理しアンドロゲンを除去したウシ胎児血清を使用した細胞培養液およびジヒドロテストステロンを用いて培養液内テストステロン濃度を变化した際の HMGB2 発現解析とともに、アンドロゲンレセプター(AR)活性を前立腺特異抗原(PSA)発現により検討する。

LNCaP 細胞に、HMGB2 の siRNA を作成し暴露することで HMGB2 発現の低下した環境を作成する。この環境下で、AR や SRC-1 の発現とともに、AR 活性を前立腺特異抗原(PSA)発現により検討する。

LNCaP 細胞由来抽出物に対して、HMGB2 や AR、SRC-1 に対する抗体を用いた免疫沈

降を行い、精製したタンパク質に対して Western blot により AR と SRC-1、HMGB2 が複合体を形成しているかを確認する。アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 PC3 は、AR タンパク発現がなく、他の経路による細胞増殖活性を有する。そこで、siRNA による HMGB2 発現低下後の細胞増殖抑制効果を確認するとともに、別の増殖因子に対する HMGB2 の機能を検討する。多くの増殖因子が抑制されている可能性があり、Microarray 解析により網羅的な遺伝子発現解析も行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト前立腺癌における HMGB2 発現とバイオマーカーとしての役割検討

未治療の前立腺癌全摘出標本を用いて、HMGB2 陽性率を検討した結果、HMGB2 は正常上皮および腺癌上皮いずれも核に染色され、周囲正常前立腺上皮に比べ、腺癌病変での高陽性率を確認した(図3)。核陽性率を基にしてその発現解析を行った結果、Gleason grade による組織悪性度(図4)や病期(図5)に比例して発現上昇することが確認された。

図3: 癌と正常上皮

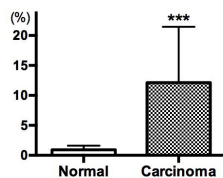


図4: Gleason grade

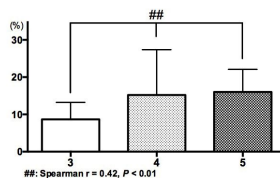
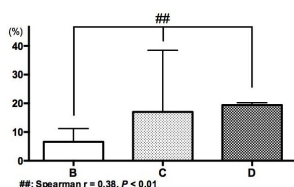


図5: 病期 (Jewett staging system)



前立腺針生検を用いた検討において、HMGB2 陽性率と前立腺癌再発率および生存期間については明瞭な相関を見いだせなかった。University of California, Santa Cruz の公開している Xena Functional Genomics Explorer においても、前立腺癌と HMGB2 発現の関係について解析を行ったが、HMGB2 発現と生存期間については差がないことが確認出来た。

治療により変性を認めた前立腺癌病変は、未治療の前立腺全摘術で採取された前立腺癌病変よりも HMGB2 陽性率が低下していたが、有意差は認められなかった(図6)。また、HMGB2 陽性率と治療効果判定 Grade は反比例しており、内分泌治療による HMGB2 発現低下を確認出来

た(図7)。

図6: 未治療と治療前立腺癌病変比較

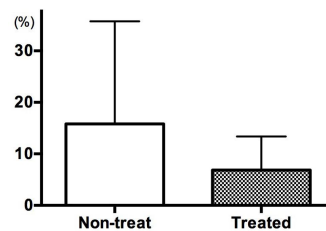
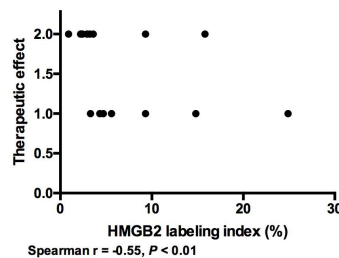


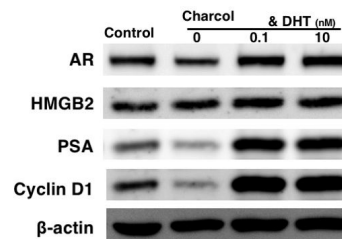
図7: 前立腺治療効果と発現の相関



##### (2) 前立腺癌における HMGB2 の役割について、前立腺癌細胞株を用いた機能解析

アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP 細胞に、チャコール処理しアンドロゲンを除去したウシ胎児血清を使用した細胞培養液で培養後、ジヒドロテストステロン(DHT)を用いて 24 時間培養した結果、DHT 濃度依存性に、AR、PSA および cyclin D1 の発現が上昇した。一方、HMGB2 発現については、やや増加傾向を認めるものの明瞭な差はなかった(図8)。

図8: DHT による蛋白発現変化



LNCaP 細胞に、HMGB2 siRNA を暴露し、HMGB2 発現の低下した状態(図9)で細胞増殖活性を計測した結果、有意な細胞増殖抑制を認めた(図10)。その状況下でのタンパク発現を検討した結果、AR、SRC1 および PSA いずれも発現低下を認めた。加えて cyclin D1 発現低下も存在した(図11)。

図 9 : HMGB2 RNA 発現

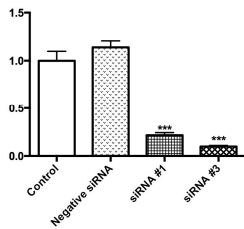


図 10 : 細胞増殖測定

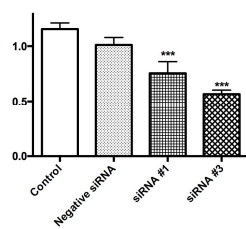
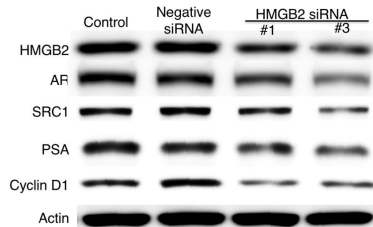
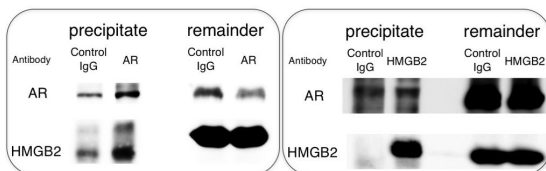


図 11 : HMGB2 発現抑制時のタンパク発現



LNCaP 細胞由来抽出物に対して、AR および SRC-1 に対する抗体を用いた免疫沈降を行った結果、比較対象の非特異的な IgG 抗体に比べ、AR や SRC-1 および HMGB2 いずれも高い蛋白結合を認め、複合体を形成している可能性を示した。一方で、HMGB2 に対する抗体を用いた免疫沈降では、免疫沈降された HMGB2 の量が総量の極一部であり、AR との結合性については比較対照群を変わず、結合性を示唆する結果は得られなかった。HMGB2 は AR や SRC-1 に比べ発現量が多く、AR だけではなく種々のタンパクと複合体形成している可能性を示した (図 12)。

図 12 : AR および HMGB2 抗体による免疫沈降結果



アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 PC3 において、HMGB2 siRNA を暴露し、HMGB2 発現の低下した状態 (図 13) で細胞増殖活性を計測した結果、有意な細胞増殖抑制を認めた (図 14)。AR に関与しない細胞増殖制御機構を解明するために microarray を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、有意に上昇した 289 遺伝子、低下した 129 遺伝子が同定され、その中には fibronectin<sup>15)</sup> や TM4SF<sup>6)</sup> といった前立腺癌進展や AR に関与する遺伝子が存在した。

図 13 : HMGB2 RNA 発現

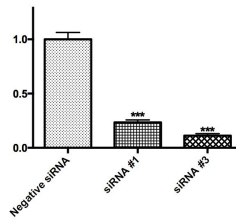
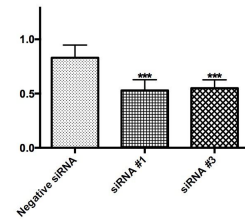


図 14 : 細胞増殖測定



< 引用文献 >

- 1) Suzuki, S., Takeshita, K., Asamoto, M., Takahashi, S., Kandori, H., Tsujimura, K., Saito, F., Masuko, K., Shirai, T. High mobility group box associated with cell proliferation appears to play an important role in hepatocellular carcinogenesis in rats and humans. *Toxicology*, 255: 160-170, 2009.
- 2) Kwon JH, Kim J, Park JY, Hong SM, Park CW, Hong SJ, Park SY, Choi YJ, Do IG, Joh JW, Kim DS, Choi KY. Overexpression of high-mobility group box 2 is associated with tumor aggressiveness and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 16(22): 5511-5521, 2010.
- 3) Redmond AM, Byrne C, Bane FT, Brown GD, Tibbitts P, O'Brien K, Hill AD, Carroll JS, Young LS. Genomic interaction between ER and HMGB2 identifies DDX18 as a novel driver of endocrine resistance in breast cancer cells. *Oncogene*, 34(29): 3871-3880, 2015.
- 4) Suzuki, S., Takahashi, S., Takahashi, S., Takeshita, K., Hikosaka, A., Wakita, T., Nishiyama, N., Fujita, T., Okamura, T., Shirai, T. Expression of prothymosin alpha is correlated with development and progression in human prostate cancers. *Prostate*, 66: 463-469, 2006.
- 5) D.K. Das, O.O. Ogunwobi. A novel microRNA-1207-3p/FNDC1/FN1/AR regulatory pathway in prostate cancer. *RNA Dis*, 4, 2017.
- 6) N. Allioli, S. Vincent, V. Vlaeminck-Guillem, M. Decaussin-Petrucci, F. Ragage, A. Ruffion, J. Samarut. TM4SF1, a novel primary androgen receptor target gene over-expressed in human prostate cancer and involved in cell migration. *Prostate*, 71: 1239-1250, 2011.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Suzuki, S., Cohen, S.M., Arnold, L.L., Kato, H., Fuji, S., Pennington, K.L., Nagayasu, Y., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., Takahashi, S.: Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis. *Toxicology*, 398-399:31-40, 2018.  
DOI: 10.1016/j.tox.2018.02.008, 査読有
2. Naiki, T., Naiki-Ito, A., Iida, K., Etani, T., Kato, H., Suzuki, S., Yamashita, Y., Kawai, N., Yasui, T., Takahashi, S.: GPX2 promotes development of bladder cancer with squamous cell differentiation through the control of apoptosis. *Oncotarget*, 9:15847-15859, 2018.  
DOI: 10.18632/oncotarget.24627, 査読有
3. Ito Y, Naiki-Ito A, Kato H, Suzuki S., Kuno T, Ishiguro Y, Takahashi S., Uemura H.: Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by the down-regulation of the androgen receptor. *Oncotarget*, 9: 13859-13869, 2018.  
DOI:10.18632/oncotarget.24492, 査読有
4. Suzuki, S., Kato, H., Fuji, S., Naiki, T., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., Takahashi, S.: Early detection of prostate carcinogenesis by immunohistochemistry of HMGB2. *J Toxicol Sci*, in press.  
DOI:
5. 上村博司、伊藤悠亮、内木綾、加藤寛之、鈴木周五、久野壽也、高橋智：アンジオテンシン 2 レセプターアゴニストのアンドロゲン受容体発現抑制による前立腺癌の化学予防効果。泌尿器外科, 30: 1221-1224, 2017.  
URL:  
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=aa6hngke/2017/003008/006&name=1221-1224j&UserID=202.35.208.7>
6. Kato, H., Naiki-Ito, A., Naiki, T., Suzuki, S., Yamashita, Y., Sato, S., Sagawa, H., Kato, A., Kuno, T., Takahashi, S.: Connexin 32 dysfunction promotes ethanol-related hepatocarcinogenesis via activation of Dusp1-Erk axis. *Oncotarget*, 7: 2009-2021, 2016.  
DOI: 10.18632/oncotarget.6511, 査読有
7. Kuno, T., Nagano, A., Mori, Y., Kato, H., Nagayasu, Y., Naiki-Ito, A., Suzuki, S., Mori, H., Takahashi, S.: Preventive effects of fermented brown rice and rice bran against prostate carcinogenesis in TRAP rats. *Nutrients*, 8:421, 2016.  
DOI: 10.3390/nu8070421, 査読有
8. Sato, S., Katsushima, K., Shinjo, K., Hatanaka, A., Ohka, F., Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Soga, N., Takahashi, S., Kondo, Y.: Histone deacetylase inhibition in prostate cancer triggers miR-320-mediated suppression of the androgen receptor. *Cancer Res*, 76:4192-4204, 2016.  
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3339, 査読有
9. Suzuki, S., Mori, Y., Nagano, A., Naiki-Ito, A., Kato, H., Nagayasu, Y., Kobayashi, M., Kuno, T., Takahashi, S.: Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Int J Mol Sci*, 17:2071, 2016.  
DOI: 10.3390/ijms17122071, 査読有
10. 鈴木周五、内木綾、加藤寛之、早川将史、高橋智：前立腺発癌と炎症、別冊 BIO Clinica、5 巻、84-88, 2016.  
URL:  
[http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/08bio2/bio2\\_13.html](http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/08bio2/bio2_13.html)
11. Naiki-Ito, A., Chewonarin, T., Tang, M., Pitchakarn, P., Kuno, T., Ogawa, K., Asamoto, M., Shirai, T., Takahashi, S.: Ellagic acid, a component of pomegranate fruit juice, suppresses androgen-dependent prostate carcinogenesis via induction of apoptosis. *Prostate*, 75: 151-160, 2015.  
DOI: 10.1002/pros.22900 , 査読有
12. Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Kuno, T., Punfa, W., Long, N., Kato, H., Inaguma, S., Komiya, M., Shirai, T., Takahashi, S.: Establishment of a syngeneic orthotopic model of prostate cancer in immunocompetent rats. *J Toxicol Pathol*, 28: 21-26, 2015.  
DOI: 10.1293/tox.2014-0050, 査読有
13. Etani, T., Suzuki, T., Naiki, T., Naiki-Ito, A., Ando, R., Iida, K., Kawai, N., Tozawa, K., Miyata, N., Kohri, K.,

Takahashi, S.: NCL1, a highly selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, suppresses prostate cancer without adverse effect. *Oncotarget*, 6: 2865-2878, 2015.

DOI: 10.18632/oncotarget.3067, 査読有

14. Kato, A., Naiki-Ito, A., Nakazawa, T., Hayashi, K., Naitoh, I., Miyabe, K., Shimizu, S., Kondo, H., Nishi, Y., Yoshida, M., Umemura, S., Hori, Y., Mori, T., Tsutsumi, M., Kuno, T., Susuki, S., Kato, H., Ohara, H., Joh, T., Takahashi, S.: Chemopreventive effect of resveratrol and apocynin on pancreatic carcinogenesis via modulation of nuclear phosphorylated GSK3b and ERK1/2. *Oncotarget*, 6: 42963-42975, 2015.

DOI: 10.18632/oncotarget.5981, 査読有

15. 恵谷俊紀、内木拓、安藤亮介、河合憲康、戸澤啓一、鈴木孝禎、郡健二郎、高橋智：新規ヒストン脱メチル化酵素阻害剤 NCL1 の前立腺癌に対する抗腫瘍効果。泌尿器外科, 28: 1289-1292, 2015.

DOI や URL : なし

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 鈴木 周五、内木 綾、加藤 寛之、高橋 智、前立腺発がん物質の早期検出モデルの確立、第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇、2018
2. 鈴木 周五、加藤 寛之、内木 綾、山下 依子、久野 壽也、高橋 智、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第 106 回日本病理学会総会、東京都、2017
3. 鈴木 周五、内木 綾、佐藤 慎哉、加藤 寛之、久野 壽也、高橋 智、NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるラット肝発がん抑制効果、第 105 回日本病理学会総会、仙台、2016
4. S. Suzuki, S. Sato, A. Naiki-Ito, H. Kato, T. Kuno, and S. Takahashi, Apocynin, an NADPH Oxidase Inhibitor, Suppresses Rat Prostate Carcinogenesis, SOT 54th Annual Meeting and ToxExpo, San Diego, 2015
5. 鈴木 周五、佐藤 慎哉、加藤 寛之、内木 綾、久野 壽也、高橋 智、Pioglitazone によるラット前立腺発癌抑制効果、第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 周五 (SUZUKI, Shugo)  
名古屋市立大学大学院・医学研究科・講師  
研究者番号：60363933

(2) 研究分担者

佐藤 慎哉 (SATO, Shinya)  
名古屋市立大学大学院・医学研究科・研究員  
研究者番号：30464564

高橋 智 (TAKAHASHI, Satoru)  
名古屋市立大学大学院・医学研究科・教授  
研究者番号：60254281

内木 拓 (NAIKI, Taku)  
名古屋市立大学大学院・医学研究科・助教  
研究者番号：50551272

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者