

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20084

研究課題名(和文) 癌関連タンパク質GGCTを標的とした前立腺癌治療の検討

研究課題名(英文) Investigation of a therapy for prostate cancer by inhibition of GGCT expression

研究代表者

花田 英紀 (Hanada, Eiki)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：40555067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌関連タンパク質GGCTを標的とした前立腺癌治療の検討を行った。Tissue microarrayを用いた免疫組織化学的検討では、ヒト正常前立腺組織9切片のうち2切片(22%)で高発現であったのに対し、ヒト前立腺癌組織では40切片のうち35切片(78%)で高発現であった。前立腺癌細胞株へのGGCT siRNA投与実験では有意な細胞増殖抑制効果を認めた。またドセタキセルとの併用群ではドセタキセル単独群と比較して細胞増殖抑制効果の増強が認められた。以上より、GGCTを標的とした前立腺癌治療は有用な方法となりえる可能性があると思われた。

研究成果の概要(英文)：We studied a therapy for prostate cancer by inhibition of GGCT expression. In the immunohistochemical study using tissue microarray, GGCT was highly expressed in two sections out of 9 sections (22%) of normal human prostate tissue. On the other hand, GGCT was highly expressed in 35 sections out of 40 sections (78%) of prostate cancer tissue. A significant antiproliferative effect via GGCT-targeting siRNA was shown in prostate cancer cell lines, and combination treatment consisting of Docetaxel and GGCT-targeting siRNA reduced cell viability more than the treatment with Docetaxel alone. Therefore, a therapy for prostate cancer by inhibition of GGCT expression may be an effective method.

研究分野：泌尿器癌

キーワード： グルタミルシクロトランスフェラーゼ RNA干渉 前立腺癌

1. 研究開始当初の背景

当研究室では尿路上皮癌の診断・治療の標的となる特異タンパク質を求めて長年研究してきた。このようなタンパク質をスクリーニングする目的で、尿路上皮癌組織と正常尿路上皮組織とを試料として、プロテオーム解析を行ってきた。本研究の対象にしている GGCT (gamma-glutamyl cyclotransferase, 別名 C7orf24, CRF21) は尿路上皮癌で高発現しているタンパク質群のひとつとして同定したものである。

当研究室が GGCT を同定した 2001 年当時、機能はおろかタンパク質としての実在も明らかではなかった。リコンビナントタンパク質を作製してモノクローナル抗体を樹立し、当初の結果を検証すべく、ウエスタンブロットで多数の臨床検体で検討したところ、正常組織と比べて癌組織で明らかに高発現しているタンパク質であることを確認した。また予備実験において、尿路上皮癌に限らず各種の癌細胞株でも高発現していることを確かめた。続いて GGCT の癌細胞における機能を明らかにする目的で、遺伝子導入およびノックダウン実験を行った。NIH3T3 細胞に GGCT 遺伝子を導入した安定発現株を樹立し観察したところ、悪性形質転換は認めず癌化能は有さないものの、細胞増殖促進がみられた。また、ノックダウンでは複数の癌細胞株において cell viability の低下を認めた (Kageyama, Proteomics Clin Appl, 2007)。これまでの報告の多くは基礎的知見のみで、臨床的意義や癌での発現意義は不明であった。しかし、2010 年 Gromov らは大変興味深い報告をしている (J Proteome Res)。乳癌 123 例の臨床検体を試料として当研究室と同様の二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析を行い、GGCT が高発現タンパク質であると同定した。免疫組織学的検討を行ったところ 46% の陽性率であった。また、高発現症例は有意に生存率が低いことも示した。さらに他種の癌でも検討しており、子宮癌で 58%、肺癌で 38%、大腸癌で 72% の陽性率であり、多くの癌でも高発現していると報告した。われわれは多くの研究者と共同研究を行い、癌における GGCT の役割の解明と GGCT を標的とした治療法の開発を研究主題としていくつもの研究を積み重ねてきた。正常組織での基礎検討としてラットにおける GGCT mRNA の臓器分布を解析し報告した (Oda, J Histochem Cytochem, 2009)。肝、腎に比較的多く発現しているものの、全般的に諸臓器では低発現であった。このことは、GGCT を治療標的とした場合に正常組織への傷害が軽微である可能性を示唆した。また 2011 年、Uejima らが骨肉腫を対象とした論文を発表した (Anticancer Res)。骨肉腫手術標本 40 例での GGCT mRNA の発現は対照とした正常骨芽細胞株より全例で高値 (1.3 ~ 21.8 倍、平均 8.7 倍) を示した。タンパク質レ

ベルでも骨肉腫細胞株 5 種類のすべてで正常骨芽細胞株より高い発現が確認された。骨肉腫細胞株 (HOS) を試料としてマトリゲルチャンネルを用いた検討では、siRNA 投与による GGCT 発現抑制で HOS 細胞の遊走能と浸潤能の双方が抑制された。増殖だけでなく遊走、浸潤といった癌細胞の特徴的性質のいずれにも GGCT が深くかかわっていることが示唆された。動物モデルを用いた研究に関しては Hama らが報告をしている。ヌードマウスの皮膚にヒト肺がん細胞 (EBC-1) を移植し、腫瘍体積が 100mm³ に達したのちに Jet injection 法で control siRNA と GGCT-siRNA を投与し、腫瘍体積の変化を観察した。GGCT siRNA を投与したものは明らかな腫瘍増殖抑制効果が観察された (Cancer Gene Ther, 2012)。

以上から GGCT の働きを効率よく抑制できる方法を確立すれば、臨床の現場において全く新しい癌治療法の発展が期待できると考えた。前立腺癌細胞株 PC-3、LNCaP を用いた予備検討では GGCT の高発現が観察されたため、前立腺癌治療として GGCT を標的とした治療が期待できるのではと考え研究を行った。

2. 研究の目的

前立腺癌細胞株、前立腺癌組織における GGCT 発現の検討を行い、多くの臨床検体を試料として検討し、臨床的意義を明らかにすること、In vitro で前立腺癌細胞株に siRNA 投与し細胞増殖抑制効果を検討すること、In vivo における前立腺癌治療効果の検証を行うこと、GGCT 発現抑制による細胞増殖抑制効果のメカニズムの解明を行うことを研究の目的とした。

3. 研究の方法

1) 前立腺癌細胞株における GGCT 発現程度の検討を、われわれが樹立した抗 GGCT 抗体である 6.1E 抗体を用いてウエスタンブロット法で発現の程度を観察した。また、ヒト前立腺組織、ヒト前立腺癌組織を含んだ Tissue microarray (TMA) を用いて免疫組織化学的検討を行った。TMA は SUPER BIO CHIPS 社より購入した。1 次抗体に anti-human cytochrome c-releasing factor 21 抗体 (R&D 社)、2 次抗体に HRP 標識抗ヒツジ IgG 抗体 (Life technology) を用いて DAB により発色させ、Image J (National Institute of Health) で発現の程度を評価した。生検や手術での臨床検体を試料として GGCT 発現の検討 (臨床病理学的因子との相関の解析) を行うこと、多くの検体で免疫組織化学的検討を行い、結果を集積することを計画した。

2) *In vitro* で siRNA 投与による GGCT 発現抑制による前立腺癌細胞株の細胞増殖抑制効果を検討した。GGCT 発現抑制を効率よく行うための siRNA 配列の検討を行い、至適投与量の検討を行った。前立腺癌に対する代表的化学療法剤であるドセタキセルとの併用による治療効果の検討を行った。WST-8 assay を用いて細胞増殖抑制効果を検討した。

3) *In vivo* における治療モデルを作成する。前立腺癌皮下移植マウスを作製し siRNA ± 抗癌剤の治療効果を検証することを計画した。

4) GGCT 発現抑制による細胞増殖抑制効果のメカニズムの解明を行うために DAPI 染色を用いて細胞核の観察を行った。アポトーシス関連タンパクの評価を行った。

4. 研究成果

1) 前立腺癌細胞株 LNCaP, PC-3, DU145 における GGCT の発現を観察した。ウエスタンブロット法を用いて検討した。予備検討で高発現を示した膀胱癌細胞株の RT112 と、中程度の発現を示した膀胱癌細胞株の UM-UC-3 を対象として比較すると、それぞれの前立腺癌細胞株において GGCT の高発現が観察された。(図 1)

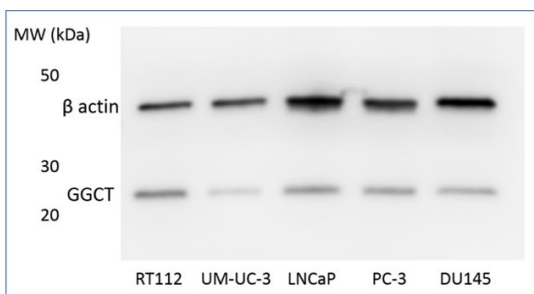


図 1 膀胱癌細胞株 RT112, UM-UC-3 と比較

ヒト前立腺癌組織における GGCT の発現程度を観察するため、Tissue microarray (TMA) を用いて免疫組織化学的検討を行った。TMA にはヒト正常前立腺組織 9 切片と、ヒト前立腺癌組織 40 切片とが 1 枚の同じプレパラートに含まれており、同じ条件下に免疫染色を行うことで GGCT の発現程度を観察し比較検討を行った。(図 2)

GGCT 抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。400 倍の倍率で観察し、ImageJ を用いて代表的病巣での GGCT 高発現領域の割合を測定した。ヒト正常前立腺組織 9 切片のうち 2 切片 (22%) で高発現していたのに対し、ヒト前立腺癌組織では 40 切片のうち 35 切片 (78%) で高発現であった。このことから前立腺癌では GGCT が高発現していることが予想された。また、ヒト前立腺癌組織 40 切片での検討ではグリソンスコア別での GGCT 発

現の差は観察されなかった。この結果から、前立腺生検や手術摘出で得られた検体を集めてさらなる検討を行うことを計画した。正常前立腺組織、ホルモン治療前の前立腺癌組織 (PSA の数値別、グリソンスコア別、転移の有無別など) やホルモン療法治療後の去勢抵抗性前立腺癌組織といった様々な臨床検体を試料として GGCT の発現程度を比較して検討することを計画したが、本研究期間内に試料を集めることができず、検討することができなかった。引き続き、研究を継続する予定である。

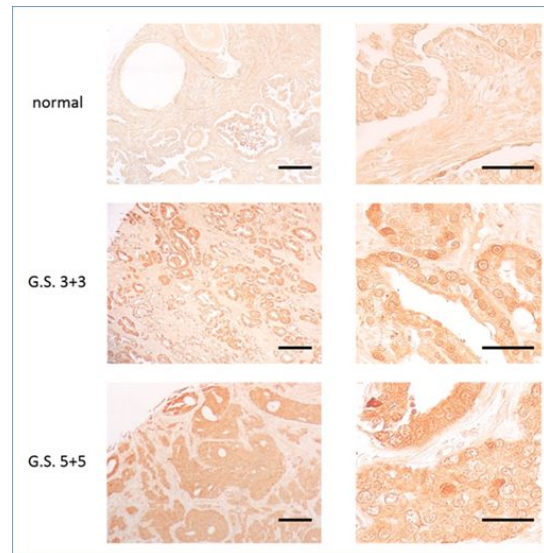


図 2 TMA を用いた免疫組織学的検討

2) *In vitro* で GGCT を標的とした細胞増殖抑制効果を検討した。対象として前立腺癌細胞株 PC-3 を用いて検討した。数種類の配列の異なった GGCT を標的とした siRNA を設計し、リポフェクション法を用いた RNA 干渉で GGCT の発現抑制効果の検討を行った。設計した unrelated siRNA と GGCT-targeting siRNA の GGCT 発現抑制効果を、ウエスタンブロット法を用いて観察した。(図 3)

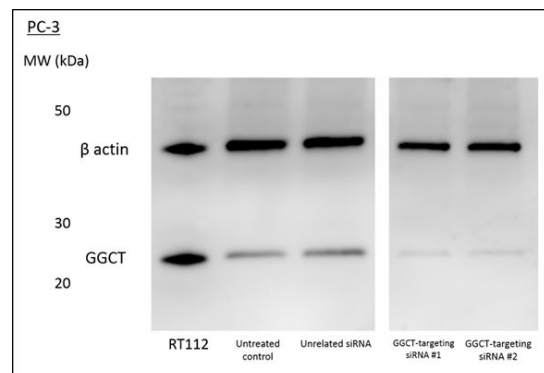


図 3 control 群、unrelated siRNA 投与群と比較

設計した siRNA の配列を示す。

Unrelated siRNA

5' -GUACCGCACGUAUCGUAUC-3' (sense)

and 5' - UACGAAUGACGUGCGGUACGU-3'

(antisense)

GGCT-targeting siRNA

#1 5' -CCUGUCGAAGUUAUCUGAUGA-3' (sense)

and 5' -AUCAGAUAAUCUUCGACAGGU-3'

(antisense)

GGCT-targeting siRNA

#2 5' -GAUAGGAGUUAGACAAUUUAA-3' (sense)

And 5' -AAAUUGUCUAACUCCUAUCCC-3'

(antisense)

設計した siRNA のうち GGCT 発現抑制効果の高い 2 種類の siRNA を選択し、細胞増殖抑制効果の検討を行った。細胞増殖抑制効果は WST-8 assay を用いて検討した。コントロール siRNA 投与群と比較して抗 GGCT siRNA 投与群で細胞増殖抑制効果が観察された。siRNA 投与量によっては試薬そのものによる細胞毒性を認めたため、投与量を調整し、至適投与濃度を検討し、評価を行った。(表 1)

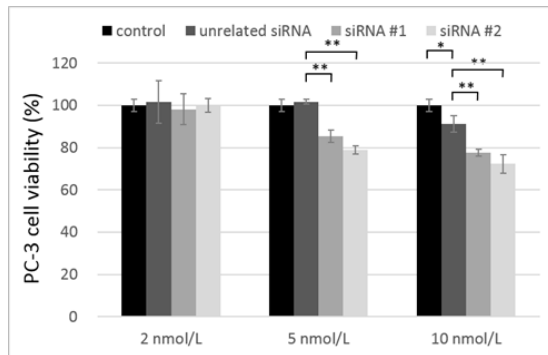


表 1 細胞数を WST-8 assay を用いて比較

次に、去勢抵抗性前立腺癌治療に用いる抗癌剤ドセタキセルを用いて前立腺癌細胞株の細胞増殖抑制実験を行った。ドセタキセル投与による IC50 を設定し、RNA 干渉による GGCT 発現抑制を組み合わせによる細胞増殖抑制効果の検討を行った。(表 2)

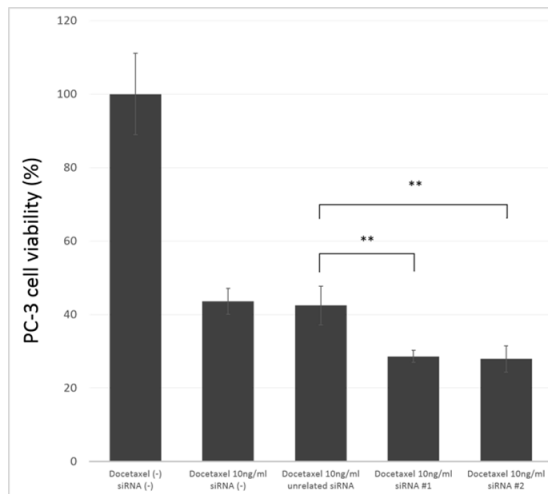


表 2 DTX 単独投与(IC50)、siRNA 併用との比較

結果、RNA 干渉を組み合わせることで細胞増殖抑制効果の上乗せ効果が観察された。

3) Invitro における前立腺癌細胞株を用いての細胞増殖抑制効果で、GGCT を標的とした前立腺癌治療の可能性について検討することができたため、in vivo においてマウス前立腺癌モデルを作成し、RNA 干渉での腫瘍縮小効果、またドセタキセルとの併用による腫瘍縮小効果の検討を計画したが、本研究期間内に目標到達ができなかった。引き続き担癌マウスでの治療効果と有害事象の評価を検討する予定である。

4) GGCT 発現抑制に伴う細胞増殖抑制効果のメカニズムを解明するため、アポトーシスに関する検討を行った。GGCT の発現を抑制した細胞ではアポトーシスで観察される核の凝集や、断片化は観察されなかった。さらに、アポトーシスの際に観察される Caspase-8 と PARP の切断フラグメントの検出について観察を行った。エトポシドを用いてアポトーシスを誘導した膀胱癌細胞株 HL-60 では Caspase-8、PARP の切断フラグメントが検出されたが、GGCT 発現を抑制した PC-3 では切断フラグメントの検出は認めなかった。(図 4)

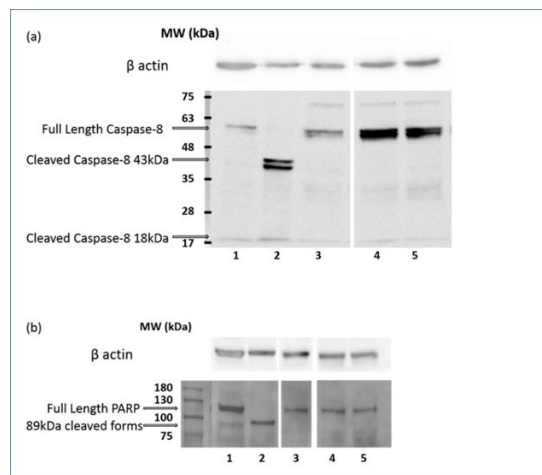


図 4 Caspase-8 と PARP の観察

また、DAPI 染色により細胞核の染色を行った実験においてもドセタキセル投与によりアポトーシスを誘導した細胞では核の断片化が観察されたが、GGCT 発現を抑制した細胞では核の断片化は観察されなかった。(図 5) このことから GGCT 発現抑制による細胞増殖抑制効果はアポトーシスによる細胞死を介さない経路であることが推測された。

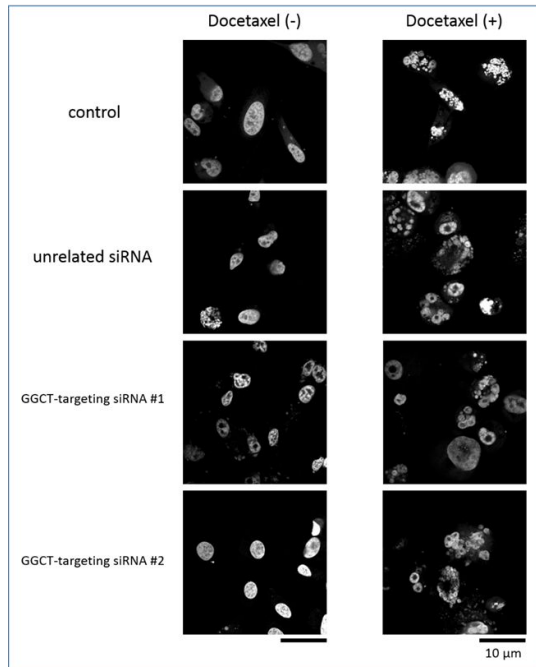


図5 DAPI 染色による PS-3 細胞の観察

また、細胞周期の変化について着目し、CDK (cyclin-dependent kinase) inhibitor の観察を行った。われわれの共同研究者らによって様々な癌種で GGCT 発現抑制の検討を行ったところ、有意に細胞老化が誘導されることが観察された。CDK inhibitor の1種であり、重要な細胞老化の誘導因子である p21WAF1/CIP1, p16INK4A は検討したすべての癌細胞株で GGCT 発現抑制により高発現となっていた。また、乳癌細胞株である MCF7 において GGCT 発現抑制をしたのちに、p21WAF1/CIP1, p16INK4A を同時にノックダウンする実験では、細胞周期停止が回復し、細胞老化への誘導が減弱することにより細胞増殖抑制効果が弱まるといった結果を報告した。

今後も GGCT 発現抑制に伴う細胞増殖抑制効果のメカニズムを解明し、治療標的として応用していくために研究を継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

影山進、花田英紀、吉貴達寛、河内明宏、新規癌増殖因子 GGCT/C7orf24 を標的とした抗がん剤の開発 -小規模プロテオーム解析からの挑戦-、第 105 回泌尿器科学会総会 2017年4月23日、鹿児島市

〔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

花田 英紀 (Hanada, Eiki)
 滋賀医科大学・医学部・助教
 研究者番号：40555067