

令和元年6月15日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11008

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌における神経内分泌癌への進展機序と薬剤選択マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of novel markers for drug screening and discovery of mechanism to neuroendocrine differentiation in castration resistant prostate cancer

研究代表者

松本 洋明 (MATSUMOTO, Hiroaki)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60610673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺全摘出標本の免疫染色にてYAPとARHGAP29は臨床病理学的因子や予後と有意な相関を認めた。細胞株の解析ではYAP下流のARHGAP29の発現がPC3で優位に亢進、LNCaPで有意に低下しており、PC3でARHGAP29をノックダウンすると細胞増殖が有意に抑制され、浸潤能も低下し、YAPのリン酸化が促進された。逆にLNCaPにARHGAP29を強制発現すると細胞増殖が促進され、浸潤能も有意に増強された。またPC3のARHGAP29のノックダウンにてCofilinのリン酸化が上昇し、前立腺癌においてYAP-ARHGAP29-Cofilin経路を介した悪性形質の獲得の機序が解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により特にホルモン非依存性前立腺癌においてYAP-ARHGAP29経路の悪性形質獲得へのメカニズムの一端が解明され、それらが新たな前立腺癌の悪性度や予後を予測するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。またYAPやARHGAP29をターゲットとした創薬開発は去勢抵抗性前立腺癌の新たな治療戦略となる可能性があり、社会的意義は十分に高いものと思われる。

今後3Dオルガノイドを用いた解明がさらに加われば、動物実験を回避し、直接個人でのオーダーメイド医療に道が開けると思われ、臨床的意義は極めて高い。

研究成果の概要(英文)： We will continue to establish passage technology and functional analysis for preparation of 3D organoids from prostate cancer specimens.

In addition, immunostaining of YAP and ARHGAP29 showed significant correlation with clinical factors, pathological factors and prognosis using specimens of radical prostatectomy. In cell line analysis, expression of ARHGAP29 downstream of YAP is predominantly upregulated in PC3 and significantly downregulated in LNCaP, and knocking down ARHGAP29 in PC3 significantly suppresses cell proliferation and reduces invasiveness. And phosphorylation of YAP was promoted. Conversely, over-expression of ARHGAP29 in LNCaP promoted cell proliferation and significantly enhanced infiltration ability. Moreover, the phosphorylation of Cofilin was increased by knockdown of ARHGAP29 in PC3 and the mechanism of acquisition of malignant traits via the YAP-ARHGAP29-Cofilin pathway was elucidated in prostate cancer.

研究分野：泌尿器科腫瘍

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 3Dオルガノイド 神経内分泌癌 YAP ARHGAP29

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌において去勢抵抗性獲得の克服と共に神経内分泌癌の克服が去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) 治療の喫緊の課題であるが、治療開始時あるいは去勢抵抗性癌となった時点での薬剤選択が適切に行えれば生命予後を改善する上で大きなメリットをもたらすことは疑う余地がない。神経内分泌癌 (neuroendocrine prostate cancer: NEPC) はまれな前立腺癌のサブタイプであるが、基礎的な病理学的検討では前立腺癌組織標本の約半数に腺癌に混じって認められるとの報告もある。NEPC の予後は非常に悪く、ホルモン抵抗性、かつ抗癌剤に対しても多剤耐性であることが多い[Parimi V. et al. Am J Clin Exp Urol 2014;2(4):273-285.]。また一定の割合で CRPC となった癌に NEPC が含まれており、また、細胞株の検討でも LNCaP をテストステロン除去培地で培養すると神経内分泌系マーカーが上昇することが知られており、また、ホルモン非感受性の PC3 は神経内分泌マーカーを高発現していることが報告されている。NEPC の発生機序として 1. ホルモン療法中に上皮多能性幹細胞から神経内分泌上皮細胞が分化しそれが悪性化する。2. 初めから腺癌に NEPC が含まれており、ホルモン療法選択制に相対的に NEPC が生き残り、増勢してくるといふ 2 つが考えられている[Tombal B, Eur J Cancer. 2011 Sep;47 Supple 3:S179-88. Hu CD. Et al. Front Oncol 14 April 2015、図 1]。発生機序の仮説からするとホルモン療法自体もしくはアンドロゲン枯渇による細胞ストレスが癌微小環境下で前立腺癌幹細胞に NEPC への分化誘導のスイッチを入れることが推測される。そこで、前立腺癌幹細胞におけるホルモン療法の癌微小環境への影響と NEPC 制御機構が解明できれば CRPC は克服されることが期待される。

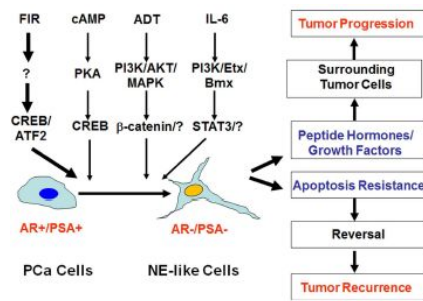


図 1 Hu CD. et al. Front Oncol

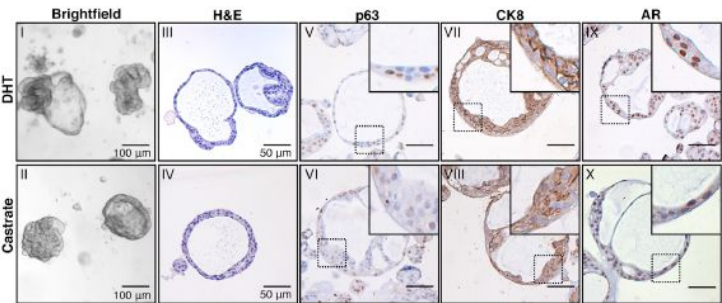


図 2 Karthaus WR. et al. Cell

従来の 2D 細胞培養と 3D 培養とでは、遺伝子発現や薬剤の効果が大きく異なることから、最近 3D オルガノイド培養技術が開発され、より生体の癌に近い状態での遺伝子変化やシグナル伝達系の解析が可能になった[Gao D, et al. Cell 159, 176-187, 2014. Karthaus WR. Et al. Cell 159, 163-175, 2014、図 2]。本研究では、この 3D 培養法を用いることで、新たな CRPC、NEPC の制御因子を同定する。これらの解析より CRPC と NEPC における新たな治療戦略を確立し、最終的には臨床応用を目指し、癌患者の予後改善を目標とする。

2. 研究の目的

前立腺癌において去勢抵抗性獲得の克服と共に神経内分泌癌の克服が去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) 治療の喫緊の課題であるが、至適薬剤選択が可能となれば生命予後を改善する上で大きなメリットをもたらす。しかし、既存の欧米人を中心とした解析でなく、日本人での因子の同定に意義がある。本研究の目的は、がん 3D オルガノイドを用いて CRPC における去勢抵抗性獲得と神経内分泌変化を促進する因子の同定を行う。生体により近い環境での細胞間の相互作用の機序を エクソーム解析とトランスクリプトーム解析で明らかにすることで、制御ターゲットを同定する。さらに同定した因子が患者血液サンプルを用いた検証でも治療効果を反映するかを検討する。

3. 研究の方法

H28-29 度は 3D オルガノイド作成を主研究課題として行った。まずは山口大学人医学系研究等審査委員会にて「三次元培養技術を用いた尿路悪性腫瘍における進展と薬剤耐性獲得機序の解析に関する研究: 承認番号 H28-112」審査と承認を得たのち、前立腺癌全摘出標本より 3D オルガノイドの作成を行った。オルガノイドの作成方法は Hans Clevers ら [Drost J, et al. Nat Protoc. 11,347-58, 2016.]の 3D オルガノイド培養プロトコールに準じて共同獣医学部からの指導も受けつつ行った。初代培養オルガノイドより凍結切片を作成し、オルガノイドの状態での各タンパク発現について免疫染色を行った。また、並行して前立腺癌における YAP の関連を検討した。YAP は Hippo signal 伝達系の主要な転写因子であり、Hippo signal 活性化することで YAP/TAZ は細胞質に留まり、細胞増殖が抑制されるが、YAP/TAZ が核移行すると細胞増殖が誘導され、癌の発生・進展に寄与することが報告されている。また、YAP は組織の 3 次元構

築や硬度を制御する因子としても機能しており、メカノトランスダクションの重要分子と言われており、臨床的に硬結を有する前立腺癌でも重要な役割を果たしていることが推測される。そこで、H29 年度は基礎的研究として、細胞株での YAP の発現と臨床検体での免疫染色での YAP の発現を検討した。

免疫染色は ABC 法に準じて行い、抗原賦活、ブロッキング試薬として、IMMUNO SHOT (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。1 次抗体は [anti-ARHGAP29 (1/200 dilution, catalog #HPA026534, ATLAS ANTIBODIES), anti-YAP (1/200 dilution, catalog #14074, CST)を用いて染色率を 500 個以上の細胞をカウントし、H-score を算出した。

また、in vitro の実験として前立腺癌細胞株(22Rv1; ATCC number: CRL-2505, LNCaP; ATCC number: CRL-1740, DU145; ATCC number: HTB-81, PC3; ATCC number: CRL-1435) を用いた。Thermo Fisher Scientific, Inc.より ARHGAP29 の siRNA とトランスフェクション試薬を購入し、細胞株で ARHGAP29 のノックダウンを行い、また TaqMan プロローベを購入して RT-PCR を行った。また、強制発現系として Origene より ARHGAP29 expression vector を購入して前立腺癌細胞株に強制発現を行い、それぞれ細胞増殖については MTS アッセイ、浸潤能については Matrigel invasion アッセイを行い、RT-PCR にてそれぞれ YAP、ARHGAP29 の遺伝子発現とウエスタンブロットにてタンパク発現を検討した。

4 . 研究成果

H30 度は 3D オルガノイド作成と並行して前立腺癌における YAP の関連を検討した。細胞株での YAP の発現と臨床検体での免疫染色での YAP の発現を検討した。引き続き前立腺癌全摘出標本より 3D オルガノイドの作成を行ったが、臨床検体からの提供数の問題と安定した継代とオルガノイドバンクとしての構築にはまだハードルが存在するため、今後は研究分担者とも協力し、新たな手法を用いて引き続き安定した継代技術の確立と機能解析を進めていく予定である。

また、根治的前立腺全摘術（開腹術、またはロボット手術）を施行した 133 名の患者標本を用いて免疫染色を行った。結果では YAP とリンパ管浸潤 ($p=0.0124$)、ARHGAP29 と D'Amico リスク分類、cT stage、術前 Gleason score、全摘標本 Gleason score との間に有意差を認めた ($p=0.0129, 0.0080, 0.0011, 0.0058$)。予後との関連については、YAP と ARHGAP29 のいずれも生化学的無再発生存率 (biochemical PFS) との間に有意差を認めた ($P=0.0422, 0.0123$; 図 3)。細胞株を用いた解析では YAP の下流の ARHGAP29 の発現が PC3 で優位に発現亢進、LNCaP で有意に発現低下しており (図 4)、これら細胞株を用いて YAP、ARHGAP29 の前立腺癌における機能解析を行った。PC3 にて ARHGAP29 をノックダウンすると細胞増殖が有意に抑制され、浸潤能も低下し、YAP のリン酸化が促進された (図 5)。逆に LNCaP に ARHGAP29 を強制発現すると細胞増殖が促進され、浸潤能も有意に増強された (図 6)。また PC3 において ARHGAP29 のノックダウンにて PCR アレイを行い (キアゲン)、変動する遺伝子群の検討を行ったところ MMP2 や RHO キナーゼ経路の抑制が示唆され (図 7)、Cofilin のリン酸化が上昇し、前立腺癌において YAP-ARHGAP29-Cofilin 経路を介した悪性形質の獲得の機序が解明された (図 8)。

図 3 カプランマイヤー曲線による YAP、ARHGAP29 発現と無生化学再発生存率

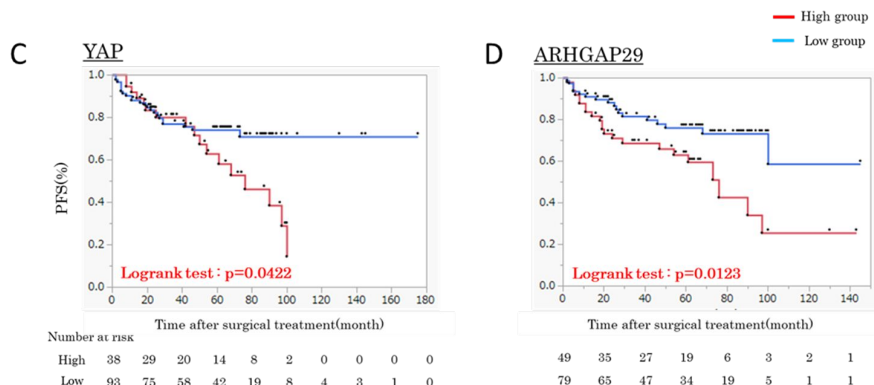


図 4 前立腺癌細胞株における YAP、ARHGAP29 の発現

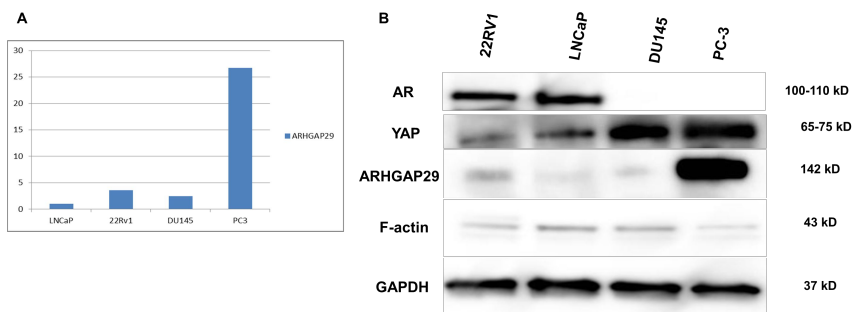


図 5 PC-3 における ARHGAP29 ノックダウンによる機能解析

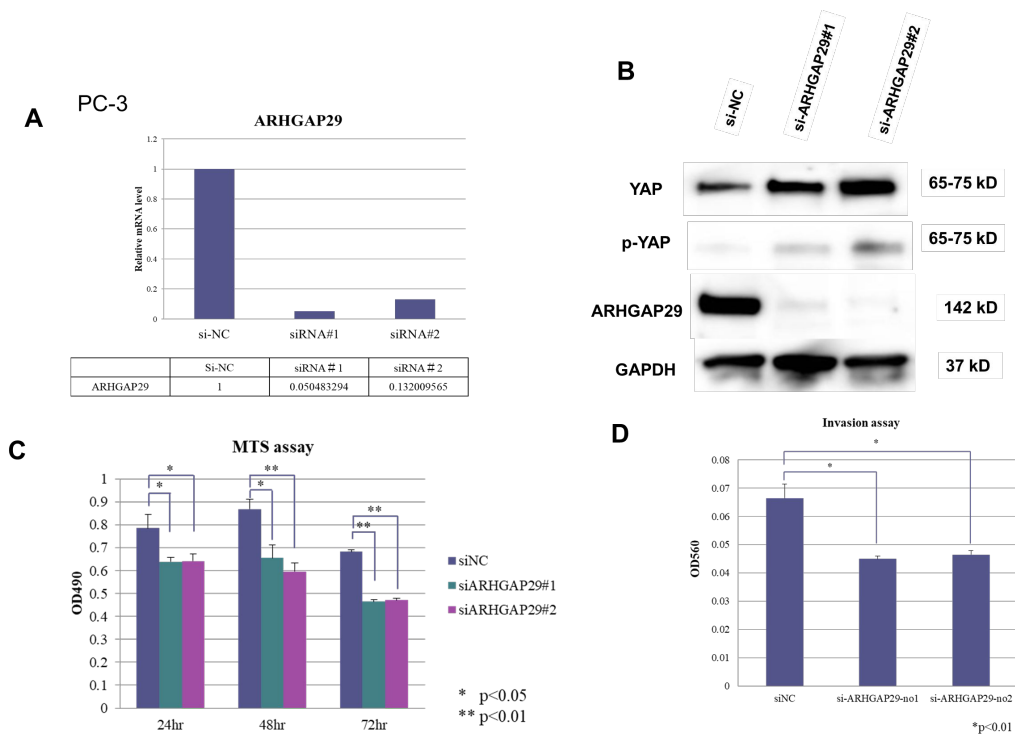


図 6 LNCaP における ARHGAP29 強制発現による機能解析

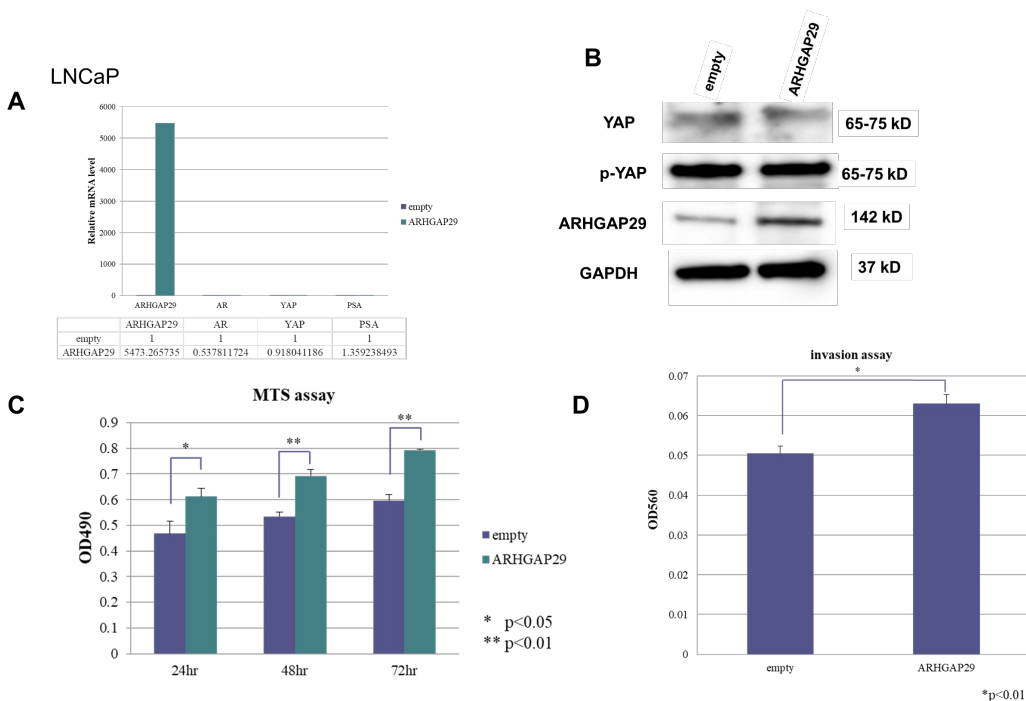


図7 PCR アレイによる ARHGAP29 ノックダウンによる遺伝子発現変化

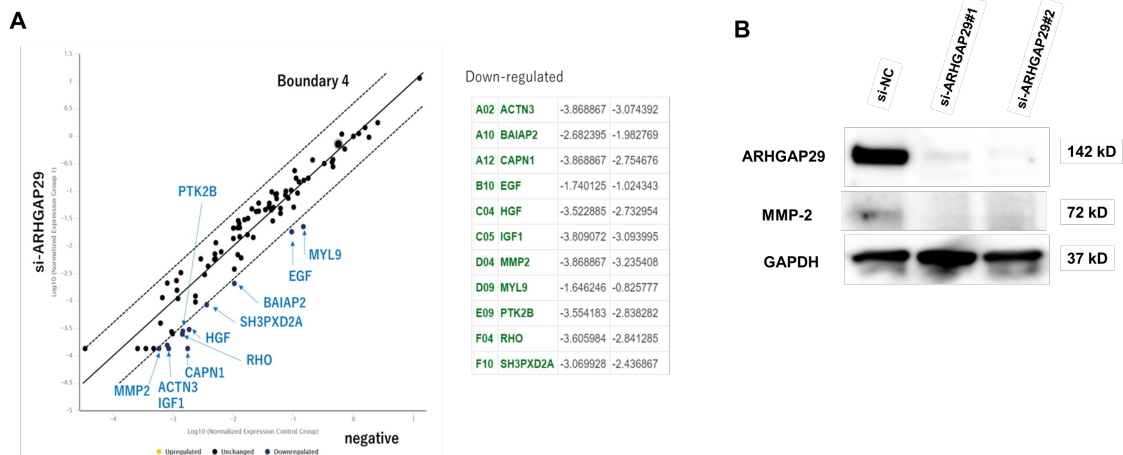
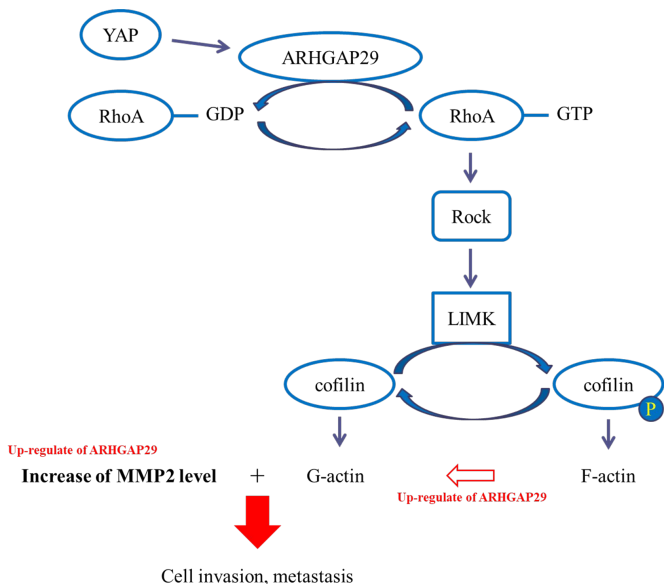


図8 前立腺癌における YAP-ARHGAP29-cofilin 経路を介した悪性形質獲得のシエーマ



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

第 28 回泌尿器科分子細胞研究会
前立腺癌における YAP 及びその下流因子 ARHGAP29 の有用性の検討
清水宏輔、松本洋明他、2019

第 107 回日本泌尿器科学会総会
前立腺癌と YAP 及びその下流因子 (ARHGAP29) との関連
清水宏輔、松本洋明他、2019

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山本 義明
ローマ字氏名：YAMAMOTO, Yoshiaki
所属研究機関名：山口大学
部局名：医学部附属病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：30593298

研究分担者氏名：清木 誠
ローマ字氏名：SEIKI, Makoto
所属研究機関名：山口大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：50226619

研究分担者氏名：松山 豪泰
ローマ字氏名：MATSUYAMA, Hideyasu
所属研究機関名：山口大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：70209667

(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。