

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11133

研究課題名(和文)レトロトランスポゾン遺伝子PEG10を標的とした神経内分泌前立腺癌の新規治療開発

研究課題名(英文)Development of retrotransposon gene PEG10 targeting treatment for neuroendocrine prostate cancer

研究代表者

赤松 秀輔 (Shusuke, Akamatsu)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20767248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：PEG10はレトロトランスポゾン由来の独特な分子であり、神経内分泌前立腺癌(NEPC)の増殖、浸潤を促進する。まずはPEG10と相互反応する分子に着目して腫瘍増殖を促進する機序の解明を目指したが、十分な成果が得られなかった。次に、NEPC患者由来組織からゼノグラフトと細胞株の培養を試み、モデル(KUCaP13)の樹立に成功した。このモデルは前立腺癌由来であり、NEPCの特徴を持つことを確認した。PEG10 knockdown (shPEG10)株を作成し、in vivoでの増殖を評価したところ、shPEG10株は明らかな増殖抑制がみられPEG10が治療標的になり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではPEG10を標的とした具体的な治療法開発までは到達できなかったが、NEPC患者由来の新規実験モデルが樹立できた。前立腺癌治療中に発生したNEPCであり、近年AR標的薬の増加に伴い増えているNEPCを反映する非常に有用な実験モデルである。このような特徴を有する細胞株の樹立は今までになく、KUCaP13は治療探索において貴重な細胞株と言える。今回作成されたKUCaP13のNEPC細胞株を使って改めてPEG10が治療標的となりうると確認できたことは大きな前進であり、今後この細胞株を利用した様々な実験系が想定され、新規治療開発への手掛かりとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：PEG10 is a unique particle derived from retrotransposon and promotes growth and invasion of neuroendocrine prostate cancer (NEPC). At first, we aimed to elucidate the mechanism of tumor proliferation focused on the particle interacting with PEG10, but enough achievements were not obtained. Next, we tried to culture xenograft model and cell line derived from a NEPC patient. We succeeded in establishing a new NEPC model named KUCaP13. We confirmed that the model was derived from prostate cancer and that it had features of NEPC. Furthermore, we generated the PEG10 knockdown (shPEG10) strain and evaluated its proliferation in vivo. The growth of shPEG10 was suppressed clearly, and this result suggested that PEG10 could be a therapeutic target.

研究分野：泌尿器科癌

キーワード：神経内分泌前立腺癌 PEG10 PDX 細胞株

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

進行性前立腺癌の標準治療は去勢療法であるが、大半はやがて去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)へと進展する。CRPC においても、アンドロゲン受容体(AR)経路の再活性化が認められるため、近年、AR 経路をさらに強力に阻害する薬剤が開発され、奏功している。しかし、これらの治療により、最終的に癌の一部は AR 経路に依存しない、肺小細胞癌に類似した非常に悪性度の高い神経内分泌前立腺癌(NEPC)となり、致死的となる。NEPC の研究はこれまで適切な実験モデルがなかったために遅れている。最近のゲノム医学の発達で、NMYC の遺伝子増幅、TP53 および RB1 の変異や喪失が NEPC の進展に重要であることが判明したが、NEPC 進展の分子機構はほとんどわかっておらず、治療方法は皆無であり、新規治療法の開発が急務である。申請者は、宿主マウスの去勢前はアンドロゲン依存性に増殖するが、去勢により縮小した後に NEPC として再増殖する、世界初のヒト前立腺癌神経内分泌分化を反映したヒト前立腺癌のマウス xenograft モデル(LTL331)樹立に成功し、同モデルを用いて、PEG10 が NEPC に変化する際に発現が上昇し、さらに NEPC の増殖、浸潤を促進することを明らかにしたが、これを用いた治療開発が可能かは不明であった。(Akamatsu S et al. Cell Reports. 2015)。

PEG10 はレトロトランスポゾン由来の遺伝子であり、-1 ribosomal frameshift というヒト細胞の他の遺伝子ではほとんど見られない現象が見られる。そのため NEPC における癌特異的な治療標的となりうるのではないかと考えられた。

## 2. 研究の目的

PEG10 を標的とした新規治療法開発を行い、予後不良とされる NEPC 患者の改善に寄与することを目的として具体的に(1)(2)を、NEPC の研究が遅れている大きな原因の一つである適切な実験モデル不足を克服して NEPC の研究を前進させることを目的として(3)を掲げる。

- (1) PEG10 -1 ribosomal frameshift を阻害することによる NEPC の新規治療開発
- (2) PEG10 の相互作用分子を通じて腫瘍増殖を促進する機序の解明
- (3) NEPC 患者腫瘍細胞を由来とした新規実験モデルの作成

## 3. 研究の方法

以下の方法で研究を進める予定とした。

(1) PEG10 -1 ribosomal frameshift を阻害することによる NEPC の新規治療開発  
CRISPR/Cas9 を用いた-1 ribosomal frameshift シーケンスへの変異導入によりフレームシフトが起こらない前立腺癌細胞株を樹立し、フレームシフトの阻害が薬剤標的となることを確認する。さらに、dual luciferase システムを用いた化合物スクリーニングを行い、-1 ribosomal frameshift を阻害する化合物を同定する。

(2) PEG10 の相互作用分子を通じた腫瘍増殖を促進する機序の解明  
質量分析によるスクリーニングにおいて抽出された候補分子 E3 ユビキチンリガーゼ WWP2 を中心に調べる。PEG10 が WWP2 による PTEN のユビキチン化を促進することを確認し、次に PTEN<sup>null</sup> の細胞で WWP2 の基質を網羅的に解析する。さらに NEPC 分化の過程で発現変化する基質を抽出し、PEG10 が同定した基質のユビキチン化を修飾するか検討する。

(3) NEPC 患者腫瘍細胞を由来とした新規実験モデルの作成  
NEPC 患者由来腫瘍組織を免疫抑制マウスに移植して Patient Derived Xenograft (PDX)を作成する。当研究室では KUCaP シリーズでいくつか論文報告しているが、PDX を樹立する方法が確立している。安定した PDX が作成できたら細胞株化を試みる。細胞株化できたらそれらの characterization を行い、分子生物学的に NEPC であることを示す。さらに PEG10 を knockdown することで PEG10 が治療標的となりうるかを確認する。

## 4. 研究成果

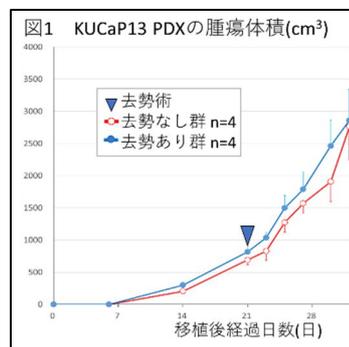
(1) PEG10 -1 ribosomal frameshift を阻害することによる NEPC の新規治療開発  
Dual luciferase システムのための基本ベクターは準備できたが CRISPR による変異株が準備できず完遂できなかった。  
今後も引き続き同実験は継続していく予定である。

(2) PEG10 の相互作用分子を通じた腫瘍増殖を促進する機序の解明  
質量分析で候補分子となった E3 ユビキチンリガーゼ WWP2 は免疫沈降の WB でも PEG10 と WWP2 が結合していることが確認できた。さらに PEG10 と WWP2 の遺伝子発現を変化させることで PTEN が同じような挙動を示したため、WWP2 過剰発現ベクターの遺伝子を変異させてユビキチン活性のない WWP2 変異ベクター (WWP2-C838A) を作成し、PTEN およびその下流の pAKT の変化を観察したが、当初想定していた結果が得られなかった。  
質量分析で絞り込まれた候補分子は WWP2 以外にもあるため、引き続き相互作用分子の対象を変更して研究している。

### (3) NEPC 患者腫瘍細胞を由来とした新規実験モデルの作成

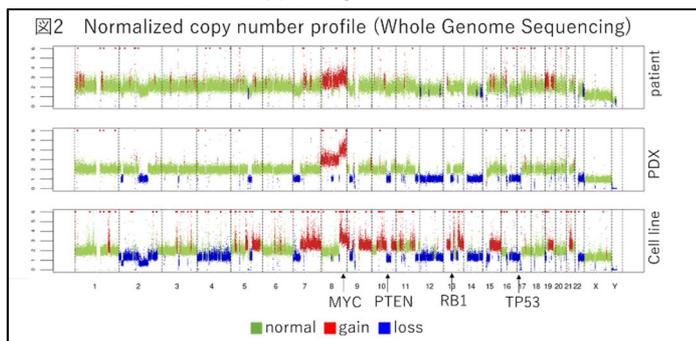
NEPC の陰茎転移症例において PDX の樹立に成功し、KUCaP13 と名付けた。さらに PDX から細胞株として培養することにも成功した。細胞株はスフェロイド様のコロニーを形成する浮遊細胞であり、マウス遺伝子の混入がないことを PCR で確認した。

KUCaP13 は *in vivo* において PDX、Cell line-Derived Xenograft (CDX) のともに腫瘍の増大速度が速く、マウスの去勢には全く反応しなかった (図 1)。



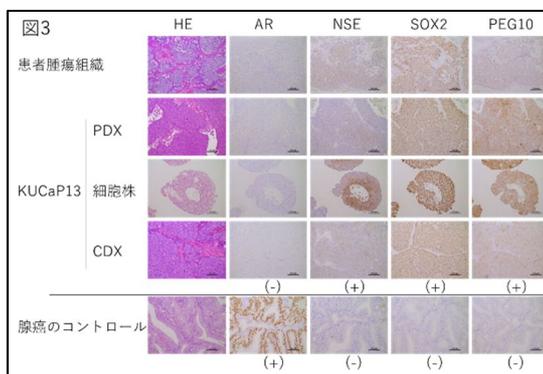
Western Blotting (WB)、免疫染色、次世代シーケンスによって蛋白レベルおよび遺伝子レベルで KUCaP13 の細胞株と PDX の characterization を行った。

患者腫瘍組織、PDX および細胞株に対して Whole genome-sequencing を行ったところ copy number の増減傾向が保たれていた (図 2)。さらに前立腺癌に特異的な *CHD1* の欠損が認められ、遺伝子的に前立腺癌由来であることが確認された。また NEPC に重要な *PTEN*、*TP53* には LOH が認められた。



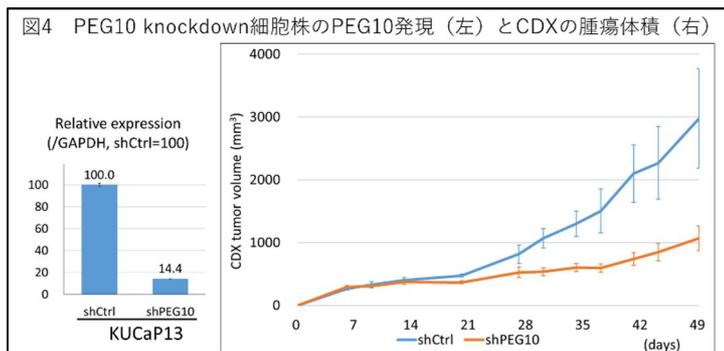
RNA sequencing では KUCaP13 は AR pathway 遺伝子及び NEPC 関連遺伝子において PDX、細胞株ともに NEPC 群にクラスタリングされた。さらに NEPC に関連の強い Rb1 loss の signature 遺伝子群が発現しており Rb1 が機能的に低下していることが確認された。

さらに患者腫瘍組織、PDX、細胞株、CDX に共通して同様の NEPC としての蛋白発現を示し、病理学的には小細胞癌の形態を示し、いずれも PEG10 が発現していることを WB と免疫染色で確認した (図 3)。



樹立した細胞株の PEG10 knockdown 株を作成して PEG10 が治療標的になり得ることを確認した。

Lentivirus を使った shRNA で PEG10 ノックダウン株を作成し、CDX による *in vivo* での増殖を評価したところ、shPEG10 株は明らかに増殖が抑制されており、改めて NEPC では PEG10 が治療標的となりうることを確認された。(図 4)



### 今後の展望

本研究では PEG10 を標的とした具体的な治療法開発には到達できなかったが、NEPC 患者由来の新規実験モデルが樹立できた。それも初発時から存在したのではなく前立腺癌治療中に発生した NEPC であり、近年 AR 標的薬の増加に伴い増えている NEPC を反映する非常に有用な実験モデルである。そういう特徴をもった細胞株の樹立は今までになかったため KUCaP13 は貴重な細胞株と言える。

今回作成された KUCaP13 の NEPC 細胞株を使って改めて PEG10 が治療標的となりうることを確認できたことは大きな前進であり、またこの細胞株を利用した様々な実験系が想定される。今回達成出来なかった(1)および(2)の研究においても KUCaP13 細胞株を使いながら継続して行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akamatsu Shusuke, Inoue Takahiro, Ogawa Osamu, Gleave Martin E	4. 巻 25
2. 論文標題 Clinical and molecular features of treatment-related neuroendocrine prostate cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 345 ~ 351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.13526	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kim Soojin, Thaper Daksh, Bidnur Samir, Toren Paul, Akamatsu Shusuke, Bishop Jennifer L, Colins Colin, Vahid Sepideh, Zoubeidi Amina	4. 巻 Epub
2. 論文標題 PEG10 is associated with treatment-induced neuroendocrine prostate cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 JME-18-0226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JME-18-0226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡所 広祐、赤松 秀輔、川井 禎久、水野 桂、李 新、住吉 崇幸、牧野 雄樹、後藤 崇之、小林 恭、井上 貴博、小川 修
2. 発表標題 The retrotransposon-derived gene PEG10 directly binds with WWP2 and affects PTEN protein degradation in prostate cancer.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山崎 俊成  (Yamasaki Toshinari)  (00607749)	京都大学・医学研究科・講師    (14301)	

