

平成 22 年 4 月 5 現在

研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2007～2009
課題番号：19390104
研究課題名 (和文) ヒト前立腺の組織幹細胞を用いた癌化の分子メカニズムに関する研究
研究課題名 (英文) Study on molecular carcinogenesis in transient amplifying cell of human prostate

研究代表者
 小西 登 (KONISHI NOBORU)
 奈良県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号：20145832

研究成果の概要 (和文)：前立腺癌における発癌や進展メカニズムを明らかにするためにヒト前立腺における transient amplifying (TA) 細胞を分離、培養した。Senescence (老化) 誘導とその回避機構を解析したところ、senescence 状態では junB の発現が有意に上昇し、p16, pRb の誘導を認める一方、これを回避する TA 細胞では junB/p16/pRb 発現が低下していた。siRNA 遺伝子導入によって junB をノックダウンすると、senescence に至った細胞でも再び増殖活性を獲得することができた。以上から、junB 発現の低下が TA 細胞の腫瘍化シグナル、つまり前立腺の癌化を促進させる可能性が示唆された。また、前立腺癌好発部位である辺縁領域からの TA 細胞は他の領域の TA 細胞より有意に senescence を回避した。junB の発現 profile を検討したところ、正常腺管では腺上皮ならびに基底細胞の核に一致して高発現するが、癌細胞では陽性率が有意に低下した。腺癌においては Gleason score (GS) 6 以下ならびに GS 3+4 に比較して、GS 4+3, GS 8 以上で junB 陽性率が有意に低下し、転移性前立腺癌では junB 発現がほとんど認められなかった。以上のことから、junB は前立腺の癌化だけでなく前立腺癌の進展にも大きく影響すると考えられ、治療上の重要なターゲット分子となる可能性があり、前立腺癌の悪性度や予後を予測することができると期待される。

研究成果の概要 (英文)：Transient amplifying (TA) cells are a subset of basal cell populations within the prostate from which cancers are thought to originate. Most TA cell populations showed increased expression of p53, p21, p16, and pRb, resulting in senescence. However, TA cell clones with reduced p16 expression successfully bypassed this phase. The close correlation was found between the levels of junB and p16 expression. Transfection of junB siRNA in prostatic TA cells allowed the cells to escape senescence, presumably through inactivation of p16/pRb; this suggests that activation of junB/p16/pRb is required to block clonal expansion. Interestingly, the percentage of peripheral zone TA cells evading senescence was significantly higher than those from central and transition zones. Metastatic prostate tumors, as well as prostate cancers with high Gleason scores, demonstrated significantly low junB immunopositivity. junB thus apparently plays an important role in controlling prostate carcinogenesis and may be a new target for cancer prevention and therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
総計	7,500,000	2,250,000	9,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：前立腺、癌化、組織幹細胞、senescence, transient amplifying cell, junB

1. 研究開始当初の背景

ヒト前立腺癌は欧米において男性の腫瘍死では肺癌に次いで高頻度で発生する悪性腫瘍であり、我国にあっても近年急激な増加傾向を示し、今後最も増加すると予想されている腫瘍の一つである。疫学的研究は生活様式の欧米化に伴う種々の要因を示唆しているが、その原因はいまだ不明である。同様に腫瘍の発生メカニズムは遺伝子変異を中心に活発に研究され、多くの遺伝子群がその原因候補に挙げられており、筆者らも先の科学研究費：基盤研究(B) (課題番号 16390109)にて前立腺癌やその前癌病変と考えられる prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) に極めて強く発現する PCA-1 をクローニングし、同定した。しかし、前立腺癌の臨床治療上の問題点として、アンドロゲン不応性獲得に関わるメカニズムとこれに決定的な影響を及ぼす分子シグナルの同定が癌化の解明と治療上の問題点を解決するうえで急務となっている。

近年癌化に関連する新しい仮説として cancer stem cell theory が提唱されている。癌細胞は分化した細胞から発生するのではなく、幹細胞のレベルで発症する「幹細胞の癌化」とする説であるが、前立腺においてはその stem cell, progenitor cell はいずれもアンドロゲン非依存性であることから、その腫瘍化シグナルの解析は癌化のみならずアンドロゲン不応性獲得メカニズムの解明にもつながると考えられる。他臓器同様、前立腺においてもその stem cell の再生、分化、増殖メカニズムに焦点を当てた研究は多いが、progenitor cell についてはいまだ十分検討されていない。

2. 研究の目的

腫瘍化シグナルとして、われわれが注目したのは細胞の senescence (老化) 回避 (バイパス) メカニズムである。細胞が形質転換し腫瘍としての性質を獲得する上で欠かせない重要なメカニズムが細胞の不死化であるが、senescence はこの不死化を阻止する最初の関門といえる。従って、progenitor cell が癌化する場合においても senescence を回避する何らかのシグナルが機能すると推察される。これを追究することで、前立腺の発癌やアンドロゲン非依存性に関わる決定的なシグナルを同定できると考えられる。

ヒト前立腺全摘出標本から peripheral

zone (PZ), transition zone (TZ) および central zone (CZ) における progenitor cell を CD133 ならびに $\alpha 2 \beta 1$ integrin 陽性細胞として magnet cell sorter システムを用いて分離、培養した上で、検討したところ、senescence が誘導される際には junB ならびに p16 の発現が高度に増加すること、siRNA を用いて junB をノックダウンすると p16 発現が抑制され senescence が回避されることが確認された。本研究では、junB のノックダウンにより progenitor cell の不死化と腫瘍化を *in vitro*, *in vivo* で観察し、p16 以外のシグナルについても網羅的に解析する。さらに、progenitor cell を使用した実験結果をもとに、癌細胞における junB 発現ならびにその関連シグナルについても同定し、前立腺全摘出標本も用いてその生物学的、病理組織学的意義を明らかにする。また、junB やその関連シグナルをターゲットとした治療法の確立や病理組織学的な予後因子としての有用性についても検討を加える。

3. 研究の方法

(1) ヒト正常前立腺からの transient amplifying (TA) cells の分離・培養

前立腺全摘出術を受けた前立腺癌患者のうち、奈良県立医科大学・医の倫理委員会に基づく informed consent を行った上で同意を得た 8 症例 (化学・放射線療法の既往なし) の前立腺を実験に用いた。非腫瘍部前立腺組織について、PZ, TZ および CZ 領域に分けて、上皮細胞ならびに非上皮細胞画分に分離した。細胞を anti-CD133 抗体結合の MACS beads とともに培養し、MACS バッファーで elution することで、CD133 抗体と結合しない細胞を抽出し、低カルシウム培地で長期培養した。本培養条件下では、細胞の分化が抑制されるために TA cells としての性状を維持した細胞を実験に供することができる。

(2) 原発並びに転移性前立腺癌標本の収集

前立腺全摘出術を受けた原発性前立腺癌 55 症例ならびに転移性前立腺癌 7 症例よりパラフィン包埋標本作製した。免疫組織・細胞化学的解析はもともと染色強度の高いところを選択し、1,000 細胞中の陽性細胞割合を算出して陽性率とした。

(3) ヒト前立腺癌細胞株

ヒト前立腺癌細胞株 DU145 を 10% fetal bovine serum を添加した RPMI 培地に培養して実験に供した。

(4) Senescence 解析

細胞の senescence (老化) は、 β -gal 染色法にて確認し、定量した。細胞を回収した後、 β -gal 染色液を添加して反応させ、陽性細胞を senescence と判断し、全細胞に占める陽性細胞の割合を算出して定量した。

(5) Flow cytometry

培養した TA cells の $\alpha 2 \beta 1$ integrin 発現を Flow cytometry によって比較、定量した。

(6) Western blotting 解析

回収した細胞を protease 阻害剤を含有した lysis buffer で溶解した後に遠心し、SDS-PAGE を添加して熱処理 (95°C、5 分) を加えた後にアクリアミドゲルで電気泳動を行なった。Polyvinylidene difluoride 膜に転写後、一次・二次抗体を反応させ、X線フィルムに現像した。

(7) Reverse Transcriptase (RT)-PCR 法

Trizol 試薬を用いて RNA を抽出した後、one step RT-PCR kit に従って RT-PCR 法を行なった。

(8) junB siRNA 導入

DUI145 細胞に対して、control RNA ならびに junB siRNA を GFP encoding vector とともに、Lipofectamine 試薬 (Invitrogen) を用いて遺伝子導入した。siRNA 濃度は 100nM で、培養時間は 72 時間である。

(9) Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay

DUI145 に control RNA あるいは siRNA を導入した後、細胞を胎生 3 日目の CAM 上に移植した。GFP encoding vector を co-transfection しているため、FITC 下、あるいは anti-GFP 抗体を用いた免疫組織化学的解析により癌細胞の大きさや浸潤能 (浸潤細胞数や浸潤距離を算出) を定量した。

(10) Cell survival assay

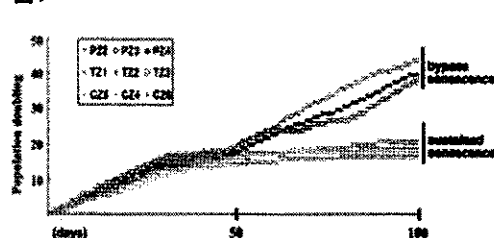
DUI145 細胞を 96 穴プレートで培養し、様々な処理の後に、吸光度を測定し、細胞生存について比較、定量した。

4. 研究成果

(1) TA cells の senescence 誘導

TA cells を PZ, TZ および CZ 領域より分離、培養した。これらの細胞 (primary culture) を長期間培養したところ、約 50 日目以降 senescence が誘導され、population doubling が強く抑制された。一部のクローンでは senescence を回避して増殖活性を維持し続けたが、この現象は前立腺癌の好発部位である PZ 由来の TA cells にもっとも高率に観察された (図 1)。

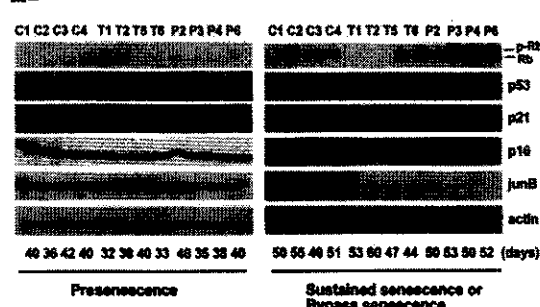
図 1



(2) TA cells の senescence 回避と senescence 誘導 marker との関連

Senescence 誘導は癌化を抑制する重要なメカニズムのひとつである。PZ 由来の TA cells が senescence を回避し増殖活性を獲得しやすい傾向にあるという事実は、senescence 回避機構を解明することで前立腺の癌化メカニズムを明らかにできる可能性を示唆する。そこで、CZ, PZ, TZ 由来の TA cells について、主たる senescence 誘導 marker の蛋白発現を追及した。その結果、senescence を回避した TA cells では、Rb 蛋白のリン酸化と p16 の発現低下を来すとともに jun family のひとつである junB 発現が有意に低下していた。(図 2)

図 2



Senescence回避細胞: T5, T6, P3, P4, P6
(C, CZ; T, TZ; P, PZ)

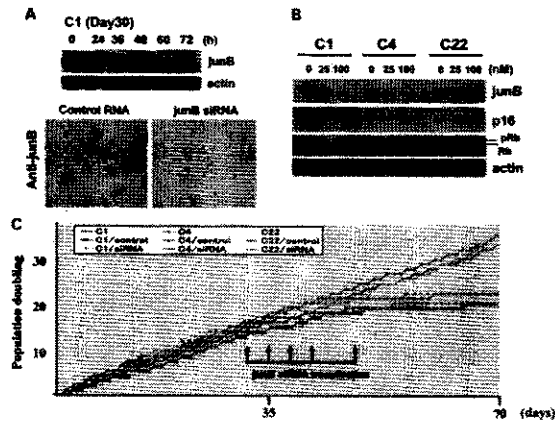
(3) junB を介した TA cells の senescence 誘導メカニズム

TA cells の senescence 誘導に junB がどのような役割を担うかを明らかにするため、senescence をまったく回避できなかった CZ 由来の TA cells (3 種: C1, C4, C22) における junB ノックダウンの影響を観察した。その結果、これら 3 種のクローンのうち、2 種では junB 分子のノックダウンにより senescence を回避して、再び population doubling の増加に転じることが判明した。また、junB 発現の低下とともに p16 発現が低下し、Rb 蛋白のリン酸化が誘導された。

1), 2), 3) の結果から、前立腺 TA cells では、junB が上流分子として、p16/pRb シグナルを調整して senescence 誘導を来すこと、junB 発現の低下が senescence 回避に欠かせない重要なステップであることが分かった。そして、junB 発現の低下を介した senescence 回

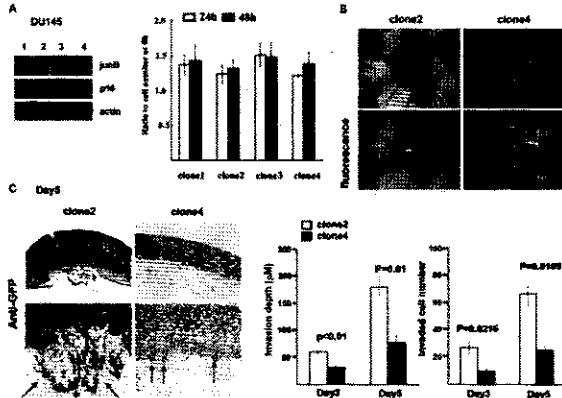
避システムはPZ由来のTA cellsにおいて高頻度に生じることも明らかとなった(図3)。

図3



(4) junB を介した前立腺癌浸潤メカニズム幹細胞維持に関わるシグナルと癌進展シグナルとの間に共通する点が多い。DU145 細胞について、異なる junB 発現を示すクローンを 4 種獲得し(図 4A)、p16 発現を比較したが、junB 発現量との間に有意な相関関係は認められなかった。しかし、CAM assay の結果、junB を高発現する DU145 より、junB 低発現群のほうが腫瘍の増殖が強く、腫瘍血管が顕著に増生することが分かった(図 4B)。anti-GFP 抗体を用いて移植癌細胞のみを染色し検討すると、junB 低発現群は高発現群に比して癌浸潤能が有意に上昇していた(図 4C)。逆に、junB 高発現群に対し、junB siRNA 導入後 CAM に移植すると浸潤能が有意に促進された。

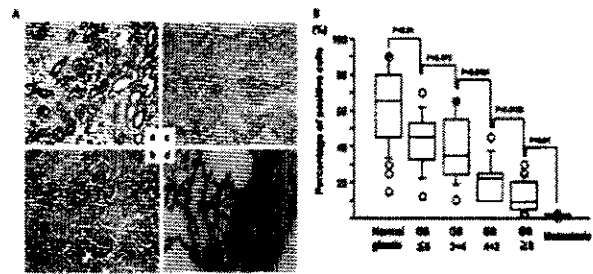
図4



(5) 前立腺癌における junB の病理学的意義原発性ならびに転移性前立腺癌組織切片を用いて junB の発現 profile を検討したところ、正常腺管では腺上皮ならびに基底細胞の核に一致して高発現する一方、腺癌細胞では陽性率が有意に低下した。腺癌においては、Gleason score (GS) 6 以下ならびに GS 3+4 に比較して、GS 4+3, GS 8 以上で junB 陽性率が有意に低下し、転移性前立腺癌では junB

発現がほとんど認められなかった(図 5A、B)。

図5



以上から、junB は前立腺の癌化だけでなく前立腺癌の進展、特にその浸潤能に対して抑制的に機能するといえ、今後、治療戦略上の重要なターゲット分子となる可能性がある。さらに、生検や手術材料から junB 陽性率を算出することで、前立腺癌の悪性度や予後を予測することができるかと期待される。

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 19 件)

1. Tanaka, N., Asakawa, I., Kondo, H., Tanaka, M., Fujimoto, K., Hasegawa, M., Konishi, N., Hirao, Y, Technical acquisition and dosimetric assessment of iodine-125 permanent brachytherapy in a series of 100 patients with localized prostate cancer: our first series of 100 patients, Int. J. Urology, Vol. 16(1): 70-74, 2009, 査読有
2. Sasaoka, N., Kawaguchi, M., Kawaraguchi, Y., Nakamura, M., Konishi, N., Patel, H., Patel, P. M., Furuya, H., Isoflurane exerts a short-term but not a long-term preconditioning effect in neonatal rats exposed to a hypoxic-ischaemic neuronal injury, Acta Anaesthesiol Scand, Vol. 53(1):46-54, 2009, 査読有
3. Ishida, E., Nakamura, M., Shimada, K., Tasaki, M., Konishi, N., Immunohistochemical analysis of neuroendocrine differentiation in prostate cancer, Pathobiology, Vol. 76(1):30-38, 2009, 査読有
4. Shimada, K., Nakamura, M., Anai, S., De Velasco, M., Tanaka, M., Tsujikawa, K., O uji, Y., Konishi, N., A novel human AlkB homologue, ALKBH8, contributes to human bladder cancer progression, Cancer Res, Vol.

- 69(7):3157-3164, 2009, 査読有
5. Shimada, K., Nakamura, M., Konishi, N., A case of urothelial carcinoma with triple variants featuring nested, plasmacytoid, and lipoid cell morphology, *Diagn Cytopathol*, Vol. 37(4): 272-276, 2009, 査読有
 6. Shimada, K., Nakamura, M., De Velasco, M. A., Tanaka, M., Ouji, Y., Konishi, N., Syndecan-1, a new target molecule involved in progression of androgen-independent prostate cancer, *Cancer Sci*, Vol. 100(7): 1248-1254, 2009, 査読有
 7. Tanaka, N., Fujimoto, K., Hirao, Y., Asakawa, I., Hasegawa, M., Konishi, N., Variations in international prostate symptom scores, uroflowmetric parameters, and prostate volume after 125I permanent brachytherapy for localized prostate cancer, *Urology*, Vol. 74(2):407-411, 2009, 査読有
 8. Asai, H., Hirano, M., Shimada, K., Kiriyama, T., Furiya, Y., Ikeda, M., Iwamoto, T., Mori, T., Nishinaka, K., Konishi, N., Udaka, F., Ueno, S., Protein kinase C γ , a protein causative for dominant ataxia, negatively regulates nuclear import of recessive-ataxia-related aprataxin, *Hum Mol Genet*, Vol. 18(19):3533-3543, 2009, 査読有
 9. Matsumura, Y., Shimada, K., Tanaka, N., Fujimoto, K., Hirao, Y., Konishi, N., Phosphorylation status of fas-associated death domain-containing protein regulates telomerase activity and strongly correlates with prostate cancer outcomes, *Pathobiology*, Vol. 76(6):293-302, 2009, 査読有
 10. Yamato, I., Sho, M., Nomi, T., Akahori, T., Shimada, K., Hotta, K., Kanehiro, H., Konishi, N., Yagita, H., Nakajima, Y., Clinical importance of B7-H3 expression in human pancreatic cancer, *Br J Cancer*, Vol. 101(10):1709-1716, 2009, 査読有
 11. Horiuchi, T., Kawaguchi, M., Kurita, N., Inoue, S., Nakamura, M., Konishi, N., Furuya, H., The long-term effects of mild to moderate hypothermia on gray and white matter injury after spinal cord ischemia in rats, *Anesth Analg*, Vol. 109(2):559-566, 2009, 査読有
 12. Higuchi, T., Nakamura, M., Shimada, K., Ishida, E., Hirao, K., Konishi, N., HRK inactivation associated with promoter methylation and LOH in prostate cancer, *Prostate*, Vol. 68(1): 105-113, 2008, 査読有
 13. Shimada, K., Nakamura, M., Ishida, E., Higuchi, T., Yamamoto, H., Tsujikawa, K., Konishi, N., Prostate cancer antigen-1 contributes to cell survival and invasion through discoidin receptor 1 in human prostate cancer, *Cancer Sci*, Vol. 99: 39-45, 2008, 査読有
 14. 島田啓司, 小西 登, 尿路系腫瘍をめぐる諸問題 尿路上皮癌の分子病理をめぐる、病理と臨床、文光堂、第 26 巻第 2 号、133-139, 2008, 査読有
 15. 小西 登, Cancer stem cell therapy と前立腺癌、病理と臨床、文光堂、第 26 巻第 6 号、626-627, 2008, 査読無
 16. Konishi, N., Shimada, K., Nakamura, M., Ishida, E., Ota, I., Tanaka, N., Fujimoto, K., Function of JunB in transient amplifying cell senescence and progression of human prostate cancer, *Clin Cancer Res*, Vol. 14(14): 4408-4416, 2008, 査読有
 17. 島田啓司, 小西 登, 特集 前立腺がんの診療 (精巣腫瘍を含む) 1. 前立腺がんを疑うとき-検査の進め方 3) Gleason score, 臨床腫瘍プラクティス, Vol. 3(3): 253-257, 2007, 査読無
 18. Shimada, K., Nakamura, M., Ishida, E., Higuchi, T., Tanaka, M., Ota, I., Konishi, N., c-Jun NH2 terminal kinase activation and decreased expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 play important roles in invasion and angiogenesis of urothelial carcinomas, *Am J Pathol*, Vol. 171(3): 1003-1012, 2007, 査読有
 19. Tsujikawa, K., Koike, K., Kitae, K., Shinkawa, A., Arima, H., Suzuki, T., Tsuchiya, M., Makino, Y., Furukawa, T., Konishi, N., Yamamoto, H., Expression and sub-cellular localization of human ABH family molecules, *J Cell Mol Med*, Vol. 11(5): 1105-1116, 2007, 査読有
- [学会発表] (計 33 件)
1. 島田啓司, 中村光利, Marco A. De Velasco, 田中基幹, 小西 登, Syndecan-1(CD138) を介した前立腺癌進展メカニズムの検討、第 25 回前立腺シンポジウム、2009 年 12 月 12 日、東京 (他 2 演題)
 2. Ishida, E., Nakamura, M., Shimada,

- K., Tasaki, M., Ohshima, M., Konishi, N., Analysis of the genes associated with premature senescence in prostate cancer and stromal cells of treated cases、第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 2 日、横浜
3. Ikeda, T., Shimada, K., Tanaka, N., Matsumura, Y., Miyake, M., Anai, S., Tomioka, A., Okajima, E., Fujimoto, K., Hirao, Y., Konishi, N., The phosphorylation status of FADD in biopsy specimens is associated with biochemical recurrence after prostatectomy、第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 2 日、横浜
 4. Shimada, K., Nakamura, M., Marco A. De Velasco, Tanaka, M., Konishi, N., The role of syndecan-1 (CD138) in progression of human urinary bladder cancer、第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 2 日、横浜 (他 3 演題)
 5. 島田啓司, 中村光利, 田崎正人, 小西 登、膀胱癌における CD138(Syndecan-1)発現の分子病理学的意義について、第 98 回日本病理学会総会、2009 年 5 月 2 日、京都 (他 5 演題)
 6. 穴井 智, 池田朋博, 松村善昭, 三宅牧人, 富岡厚志, 田中宣道, 藤本清秀, 平尾佳彦, 島田啓司, 小西 登、前立腺全摘標本における分子生物学的生化学的再発予測因子の検討、第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009 年 4 月 16-19 日、岡山
 7. 田中宣道, 壬生寿一, 富岡厚志, 平尾周也, 田中雅博, 永吉純一, 吉井将人, 仲川嘉紀, 渡辺秀次, 藤本清秀, 平尾佳彦, 島田啓司, 小西 登、年齢別 PSA カットオフ値および体積・年齢別生検本数ノモグラムを用いた前立腺生検の試み、第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009 年 4 月 16-19 日、岡山
 8. Shimada, K., Nakamura, M., Tasaki, M., Anai, S., Tanaka, M., Tsujikawa, K., Konishi, N., Human ABH-8 is a new molecule for the development of bladder cancer、第 67 回日本癌学会総会、2008 年 10 月 28 日、名古屋 (他 2 演題)
 9. 樋口智紀, 島田啓司, 石田英和, 中村光利, 小西 登、前立腺癌新規遺伝子 PCA-1 の機能解析、第 97 回日本病理学会総会、2008 年 5 月 16 日、金沢
 10. 島田啓司, 中村光利, 石田英和, 樋口智紀, 小西 登、前立腺 progenitor cell の生物学的特性と病理組織学的意義について、第 97 回日本病理学会総会、2008 年 5 月 15 日、金沢 (他 1 演題)
 11. 島田啓司, 中村光利, 石田英和, 樋口智紀, 田中基幹, 小西 登、膀胱尿路上皮癌における新規浸潤メカニズムの解析、第 66 回日本癌学会総会、2007 年 10 月 3 日、横浜 (他 6 演題)
 12. 石田英和, 中村光利, 島田啓司, 松吉修一, 樋口智紀, 小西 登、前立腺癌における神経内分泌化の検討、第 96 回日本病理学会総会、2007 年 3 月 14 日、大阪 (他 2 演題)
- [図書] (計 3 件)
1. 白石泰三 他編、小西 登、文光堂、腫瘍病理鑑別診断アトラス 前立腺癌、2009、9-14
 2. 青笹克之 編、小西 登、医歯薬出版、解明 病理学 病気のメカニズムを解く、2009、451-468
 3. 吉田修 (監修)、大藪誠一郎、荒井陽一 (編)、小西 登、医薬ジャーナル、インフォームドコンセントのための図説シリーズ 前立腺がん、2008、40-45
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 1 件)
- 名称：膀胱癌の予防・治療剤及びそのスクリーニング方法並びに診断剤
- 発明者：小西 登
- 権利者：リンク・ジェノミクス
- 種類：特願
- 番号：2009-144760
- 取得年月日：2009 年 6 月 17 日
- 国内外の別：国内
- [その他]
- ホームページ等
- <http://www.naramed-u.ac.jp/~2path/gyouseki.html>
6. 研究組織
- (1)研究代表者
- 小西 登 (KONISHI, NOBORU)
- 奈良県立医科大学・医学部・教授
- 研究者番号：20145832
- (2)研究分担者
- 島田啓司 (SHIMADA, KEIJI)
- 奈良県立医科大学・医学部・講師
- 研究者番号：90336850