

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07486

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌に対する新規免疫療法の確立に目指した腫瘍免疫機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of tumor immune mechanisms aimed at establishing new immunotherapy for castration-resistant prostate cancer

研究代表者

高橋 智 (Takahashi, Satoru)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：60254281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌における新規の腫瘍免疫回避機構を見出すことを目的としている。マイクロアレイ解析により、正常免疫能ラットに生着できるPLS10で高発現しているCD81、Ccl2、Cx3cl1、Nradd、Tmem252の5遺伝子を抽出した。このうちCD81、Ccl2、Cx3cl1について正常免疫能ラットに生着できないPLS30に遺伝子導入して同所移植を行ったが、いずれも腫瘍形成は得られなかった。次に生体内における遺伝子発現について空間トランスクリプトーム解析を行い、Pmepa1がPLS10で高発現していることを確認した。Pmepa1導入PLS30株を作成し、ラット同所移植実験を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)に対する有効な治療法は未だ確立されていない。我々はラットCRPC細胞株を樹立し、正常免疫能ラットに同所移植するとPLS10は生着する一方で、PLS30では腫瘍形成はみられないことから、PLS10における腫瘍免疫回避機構を明らかにできれば、CRPCの治療法開発に繋がる基礎的データになると考えた。種々の解析により、PLS10で高発現している6遺伝子を抽出し、このうち3遺伝子についてPLS30に遺伝子導入して同所移植を行ったが、いずれも形質転換はなく腫瘍形成は得られなかった。他の遺伝子については遺伝子導入PLS30株を作成し、ラット同所移植実験を進めている。

研究成果の概要(英文)：The aim is to discover a new tumor immune evasion mechanism in castration-resistant prostate cancer (CRPC). Through microarray analysis, we extracted five genes, CD81, Ccl2, Cx3cl1, Nradd, and Tmem252, highly expressed in rat CRPC PLS10 cells, that can be engrafted in normal immunocompetent rats. Among these, CD81, Ccl2, and Cx3cl1 were transfected into rat CRPC PLS30 cells, which cannot survive in normal immunocompetent rats and orthotopically transplanted, but no tumor formation was observed in any of them. Next, we performed spatial transcriptome gene expression analysis in vivo and confirmed that Pmepa1 was highly expressed in PLS10. We have established the Pmepa1-introduced PLS30 strain and are conducting orthotopic transplant experiments in rats.

研究分野：病理学

キーワード：前立腺癌 腫瘍免疫 去勢抵抗性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

我々が樹立したラット去勢抵抗性前立腺癌(Castration-Resistant Prostate Cancer, CRPC)細胞株(PLS10, PLS20, PLS30)はいずれもヌードマウス背部皮下に正着する。しかし、正常免疫能を有するF344ラットの前立腺腹葉に同所移植を行うと、PLS10は生着するが、PLS20、PLS30は移植後8週まで観察しても腫瘍は形成されないことを見出している。この結果からPLS10は腫瘍免疫を回避することができると推察された。これら3種の細胞株についてマイクロアレイ解析を行い、それぞれの遺伝子発現プロファイルを比較検討したところ、PLS10において有意に高発現あるいは低発現している遺伝子群を抽出することができた。これらの遺伝子群の中に免疫チェックポイント遺伝子PD1/PD-L1は含まれていないことが確認され、PLS10は免疫チェックポイント分子を介さずに腫瘍免疫から逃避していると推察された。これらの事象から、我々が樹立したラットCRPC細胞株における免疫回避機構を明らかにすれば、CRPCに対する新規の免疫療法の開発に繋がる基礎的なデータが得られるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が樹立したラットCRPC細胞株PLS10における新規の腫瘍免疫回避機構を見出し、前立腺癌の予防法および治療法の開発に繋がる基礎的なデータを得ることである。そのために、PLS10由来cDNA発現ライブラリーの作成、PLS10マイクロアレイ解析に基づく候補遺伝子群の検討、ラット前立腺に同所移植したPLS10の空間トランスクリプトーム解析といった方法を用いて、責任遺伝子の同定を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) cDNA発現ライブラリーの作成

PLS10からmRNAを抽出し、キットを用いてエンタリーベクターに組み込み、cDNAライブラリーを作成する。その後、Gateway® クローニングテクノロジーによりレンチウイルスベクターに組み替えを行い、cDNA発現ライブラリーを作成する。樹立したPLS10由来cDNA発現ライブラリーをPLS30に遺伝子導入し、 $5 \times 10^6$ 個程度の細胞をF344ラット前立腺腹葉に移植し、4あるいは8週間後開腹して腫瘍形成の有無を確認する。腫瘍形成がみられた場合は、腫瘍を摘出し、遺伝子産物の解析を行う。

### (2) マイクロアレイ解析から抽出した遺伝子群の検討

マイクロアレイ解析で有意な発現差を認めた遺伝子の上位から発現ベクターを作成し、PLS30に遺伝子導入をして安定発現株を樹立する。それぞれ安定発現株を $5 \times 10^6$ 個程度F344ラットの前立腺腹葉に移植し、形質転換の有無について検討する。

### (3) ラット前立腺複葉に同所移植した細胞株の空間トランスクリプトーム解析

PLS10, PLS30 それぞれを  $5 \times 10^6$  個程度 F344 ラットの前立腺腹葉に移植し、3 あるいは 7 日後に開腹して腫瘍を摘出し、液体窒素で固定して凍結切片を作成する。これに Photoisolation chemistry 技術を用いてトランスクリプトーム解析を行い、PLS30 と比較して PLS10 で高発現あるいは低発現している遺伝子を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) PLS10 由来の cDNA 発現ライブラリーの作成

###### (i) cDNA 発現ライブラリーの作成

PLS10 から total RNA を抽出し、キットを用いて mRNA を精製した。精製した mRNA から逆転写反応により cDNA 群を作成し、この cDNA 群をエントリーベクターに組み込み cDNA ライブラリーを作成した。さらに cDNA ライブラリーをレンチウイルスベクターに組み替え、cDNA 発現ライブラリーを作成した。

###### (ii) cDNA 発現ライブラリーの評価

cDNA 発現ライブラリーが適切に作成されたか検討した。PLS10 から抽出、精製した mRNA、エントリーベクターに組み込まれた cDNA ライブラリー、レンチウイルスベクターに組み替えた cDNA 発現ライブラリーのそれぞれを鋳型として、PCR 法を用いて特定の遺伝子が検出されるか検討した。検討のために以下の遺伝子を用いた。PLS10、PLS20、PLS30 のマイクロアレイ解析において PLS10 のみ高発現がみられた 9 遺伝子 (CD81、Ccl2、Cx3cl1、Ifi44、Pycard、Nradd、Tmem9、Ubx8、Tmem252)、PLS10 のみ発現低下がみられた 1 遺伝子 (Mal)、ハウスキーピング遺伝子 (GAPDH、Gusb、Fadd) の 13 遺伝子について検討した。精製 mRNA では 13 遺伝子全てが検出されたが、エントリーベクター中の cDNA ライブラリーでは CD81、Pycard、GAPDH の 3 遺伝子のみ、レンチウイルスベクター中の cDNA 発現ライブラリーでは GAPDH のみが検出された。精製 mRNA をエントリーベクターに組み込む段階での組み込み効率が 23%程度、エントリーベクターからレンチウイルスベクターに組み替える段階での組換え効率が 33%程度であったと考えられ、適切な cDNA 発現ライブラリーが作成されていないことが明らかとなった。

##### (2) マイクロアレイ解析から抽出した遺伝子群の検討

###### (i) mRNA レベルでの遺伝子発現の比較

PLS10、PLS20、PLS30 のマイクロアレイ解析から PLS10 のみで高発現がみられた遺伝子を 9 種類 (CD81、Ccl2、Cx3cl1、Ifi44、Pycard、Nradd、Tmem9、Ubx8、Tmem252) 見いだした。PLS10、PLS20、PLS30 細胞それぞれにおける 9 遺伝子の mRNA 発現量を qRT-PCR 法を用いて検討した。CD81、Ccl2、Cx3cl1、Nradd、Tmem252 の 5 遺伝子は PLS10 のみで高い mRNA 発現量を示した (図 1)。

###### (ii) CD81 高発現 PLS30 細胞株の作成

上記 5 遺伝子の中からまず CD81 の PLS30 導入を検討した。PLS10 の total RNA から逆転写反応により cDNA を作成し、これを鋳型として CD81 の cDNA を PCR により増幅し

た。その際 CD81 の N 末端に FLAG タグを組み込んだ FLAG-CD81 融合タンパク質を作成した。これをレンチウイルスベクターに組み込み、CD81 発現ベクターを作成し、PLS30 に導入した。陰性コントロールとして lacZ を導入した細胞も作成した。遺伝子導入した PLS30 のタンパク質を抽出し、SDS-PAGE で FLAG-CD81 が発現しているか抗 FLAG 抗体により確認した。CD81 (分子量約 25kDa) の位置に FLAG が検出されたことから、FLAG-CD81 が導入・発現していることが確認された。次に Flow cytometry で遺伝子導入した PLS30 の細胞表面に FLAG-CD81 が発現しているか検討した。CD81 を導入した PLS30 の細胞表面に CD81 が発現していることを確かめた。

#### (iii) CD81 導入による細胞増殖能の検討

CD81 を導入した PLS30 の細胞増殖能を検討した。WST-1 により 48 時間後の cell viability を比較したところ、CD81 を導入した PLS30 は有意に細胞増殖速度が増加していた。

#### (iv) 遺伝子改変 PLS30 のラット前立腺腹葉への同所移植

CD81 導入 PLS30 を  $2 \times 10^6$  個 F344 ラットのの前立腺腹葉に同所移植した。8 週後に開腹したが、明らかな腫瘍形成はみられなかった。CD81 と同様に Ccl2, Cx3cl1 についてもそれぞれ遺伝子導入 PLS30 を作成、移植実験を行ったが、いずれも腫瘍形成は得られなかった。

#### (3) 前立腺腹葉に同所移植した細胞株の空間トランスクリプトーム解析

##### (i) PLS10, PLS30 のラット前立腺移植および腫瘍摘出

PLS10, PLS30 をそれぞれ  $2 \times 10^6$  個 F344 ラットのの前立腺腹葉に移植し、3 および 7 日後にそれぞれ腫瘍を摘出した。腫瘍を半割し、半側は液体窒素で急速凍結、残りはホルマリン固定に供した。7 日後に摘出した腫瘍の増殖およびアポトーシス誘導をそれぞれ Ki-67, TUNEL 染色を用いて評価した。増殖能およびアポトーシスに有意な差はみられなかった。

##### (ii) 同所移植した PLS10, PLS30 の空間トランスクリプトーム解析

凍結切片の特定の領域のみに紫外線を照射することで、照射した領域のみのトランスクリプトーム解析を行う Photo-isolation chemistry 技術を用いて、ラット前立腺に移植した PLS10 および PLS30 の細胞のみに紫外線を照射した。その後逆転写反応により照射した領域のみから得られた cDNA を用いてトランスクリプトーム解析を行った。PLS10 において高発現している遺伝子群が 115、低発現している遺伝子群が 14 見出された (図 2)。高発現している 115 遺伝子のなかから候補となる 3 遺伝子(Pmepa1, Lamp1, Ceacam1)を抽出した。これら 3 遺伝子について、PLS10, PLS30 から抽出した mRNA における発現量の比較を qRT-PCR 法を用いて検討したところ、Pmepa1 は PLS10 で高発現していることが確認された (図 3)。この結果をもとに Pmepa1 を PLS30 に導入する発現ベクターを作成した。今後 Pmepa1 を安定発現する PLS30 株を作成し、F344 ラットのの前立腺腹葉に移植する予定である。

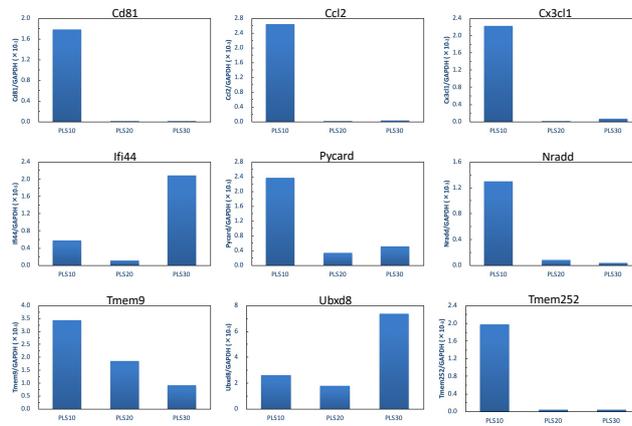


図 2.9 遺伝子の mRNA 発現量の比較.

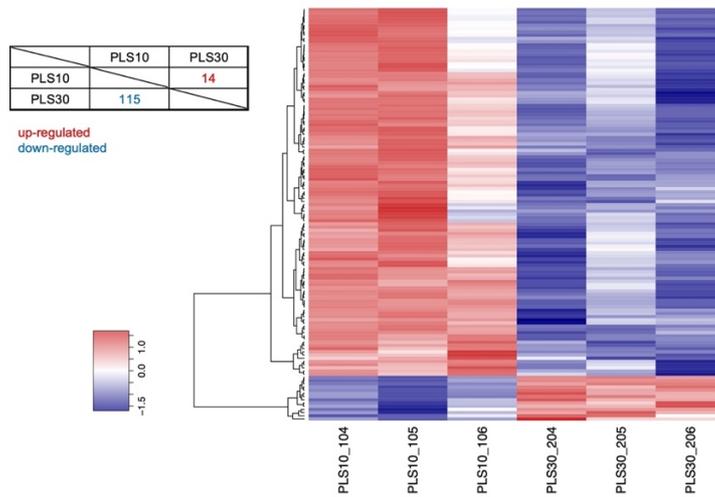


図 2. 遺伝子発現のクラスター解析.

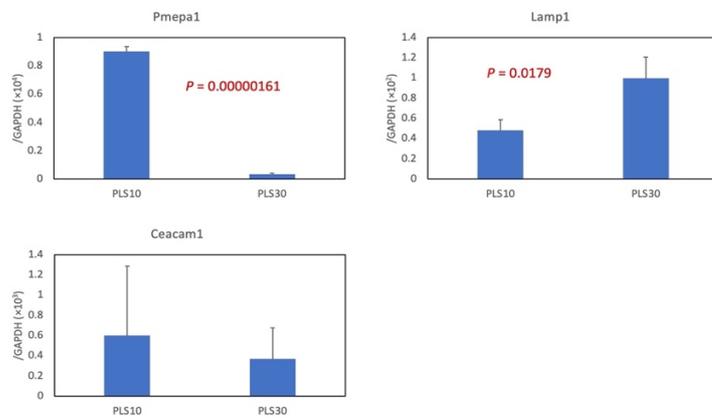


図 3. Pmepa1, Lamp1, Ceacam1 の mRNA 発現量の比較.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 1.Ota, H., Sato, H., Mizumoto, S., Wakai, K., Yoneda, K., Yamamoto, K., Nakanishi, H., Ikeda, J-I., Sakamoto, S., Ichikawa, T., Yamada, S., Takahashi, S., Ikehara, Y., Nishihara, S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Switching mechanism from AR to EGFR signaling via-3-O-sulfated heparan sulfate in castration-resistant prostate cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-38746-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sadovska, L., Auders, J., Keisa, L., Romanchikova, N., Silamikele, L., Kreismane, M., Zayakin, P., Takahashi, S., Kalnina, Z., Line, A.	4. 巻 8
2. 論文標題 Exercise-induced extracellular vesicles delay the progression of prostate cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 784080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2021.784080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Subhawa, S., Naiki-Ito, A., Kato, H., Naiki, T., Komura, M., Nagano-Matsuo, A., Yeewa, R., Inaguma, S., Chewonarin, T., Banjerpongchai, R., Takahashi, S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Suppressive effect and molecular mechanism of Houttuynia cordata Thunb. Extract against prostate carcinogenesis and castration-resistant prostate cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13143403	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P.	4. 巻 25
2. 論文標題 Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25122737	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagai T, Naiki T, Hamamoto S, Etani T, Naiki-Ito A, Nakagawa M, Iida K, Iwatsuki S, Taguchi K, Maruyama T, Kawai N, Takahashi S, Yasui T.	4. 巻 34
2. 論文標題 Comparison of Real-Time Virtual Sonography Navigation Versus BioJet Navigation on Magnetic Resonance Imaging-Guided Prostate Needle Biopsy: A Single Institutional Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Endourology	6. 最初と最後の頁 739-745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/end.2020.0042	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 -

1. 著者名 5.Yeewa, R., Naiki-Ito, A., Naiki, T., Kato, H., Suzuki, S., Chewonarin, T., Takahashi, S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Hexane insoluble fraction from purple rice extract retards carcinogenesis and castration-resistant cancer growth of prostate through suppression of androgen receptor mediated cell proliferation and metabolism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12020558	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 11.Naiki-Ito, A., Naiki, T., Kato, H., Iida, K., Etani, T., Nagayasu, Y., Suzuki, S., Yamashita, Y., Inaguma, S., Onishi, M., Tanaka, Y., Yasui, T., Takahashi, S.	4. 巻 41
2. 論文標題 Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1145-1157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgz193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Etani, T., Naiki, T., Shimizu, N., Noda, Y., Nagai, T., Nozaki, S., Iida, K., Ando, R., Kawai, N., Takahashi, S., Suzuki, T., Yasui, T.
2. 発表標題 Novel selective lysine-specific demethylase 1 inhibitors, NCL1 and NCD38, suppress testicular tumor cell proliferation.
3. 学会等名 AUA Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内木 綾、加藤 寛之、稲熊 真悟、山下 依子、高橋 智
2. 発表標題 MiR-8080はandrogen receptorスプライスバリエーションの発現低下により 去勢抵抗性前立腺癌を抑制する
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Subhawa Subhawatt、内木綾、Chewonarin Teera、高橋智、Banjerdpongchai Ratana
2. 発表標題 Anti-Cancer Properties of Houttuynia cordata and Piper ribesiodes on Breast Cancer Cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yeewa Ranchana、内木綾、Kiriya Chanarat、Sakuludomkan Wannachai、Khanaree Chakkrit、高橋智、Chewonarin Teera
2. 発表標題 Comparative study of anti-prostate cancer activity between hydrophilic and lipophilic extract from purple rice
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内木綾、加藤寛之、内木拓、高橋智
2. 発表標題 抗酸化物質ルテオリンを用いたがん予防
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内木綾、加藤寛之、鈴木周五、山下依子、高橋智
2. 発表標題 LuteolinはRNAサイレンシングによるAR-V7制御により去勢抵抗性前立腺癌を抑制する
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ranchana, Y., Naiki-Ito, A., Naiki, T., Kato, H., Chewonarin, T., Takahashi, S.
2. 発表標題 Chemotherapeutic effects of purple rice ( <i>Oryza sativa</i> L. <i>indica</i> ) extract on castration-resistant prostate cancer.
3. 学会等名 第26回日本がん予防学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内木綾、加藤寛之、鈴木周五、高橋智
2. 発表標題 LuteolinはRNAサイレンシングによるAR-V7制御により去勢抵抗性前立腺癌を抑制する
3. 学会等名 第26回日本がん予防学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内木綾、内木拓、加藤寛之、山下依子、高橋智
2. 発表標題 Luteolinの去勢抵抗性前立腺癌に対する抑制効果とandrogen receptor splice variantの役割
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ranchana, Y., Naiki-Ito, A., Naiki, T., Kato, H., Chewonarin, T., Takahashi, S.
2. 発表標題 Inhibitory effect of purple rice ( <i>Oryza sativa</i> L. indica) extract on prostate carcinogenesis.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内木綾、加藤寛之、鈴木周五、高橋智
2. 発表標題 去勢抵抗性前立腺癌におけるandrogen receptor splice variantの役割とmicroRNAによる制御機構
3. 学会等名 第36回日本毒性病理学会総会および学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高橋智 (分担)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中日新聞社	5. 総ページ数 159
3. 書名 名市大ブックス5 医療の知識で自分を守る	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学  <a href="http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/patho1.dir/index.html">http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/patho1.dir/index.html</a></p>
--

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	内木 綾  (Naiki-Ito Aya)  (20509236)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授    (23903)	
研究分担者	加藤 寛之  (Kato Hiroyuki)  (80791293)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師    (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関