

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591855

研究課題名（和文） ヒト前立腺癌における Rap1 GAP SPA-1 を介した転移機序の解明

研究課題名（英文） Research for a mechanism of prostate cancer metastasis through a SPA-1(Rap1GAP) signaling pathway.

研究代表者

吉村 耕治 (YOSHIMURA KOUJI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：40397542

研究成果の概要（和文）：SPA-1の発現量が転移性前立腺癌組織において発現が亢進していることをもとに、SPA-1の発現抑制によってヒト前立腺癌細胞の転移能が低下すること、また逆にSPA-1の発現亢進によってヒト前立腺癌細胞の転移能が増強されることを見出した。さらに、Spa-1がRap1シグナルの不活性化による接着機能低下とBrd4の局在変化によるECM遺伝子群の発現変化によって、複合的に転移亢進に寄与していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：The expression of SPA-1, one of the Rap1GAPs, was increased in metastatic tissues of human prostate cancer, compared with the primary sites. Based on the results, we found that SPA-1 protein promotes the invasion and metastasis of prostate cancer, by down-regulation of attachment to ECM through Rap1's inactivation and by suppressing transcription of ECM-associated genes through translocation of Brd4.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	2,000,000	600,000	2,600,000
平成21年度	900,000	270,000	1,170,000
平成22年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：前立腺癌

科研費の分科・細目：泌尿器科学、腫瘍学

キーワード：前立腺癌、Rap1、Spa-1、転移

1. 研究開始当初の背景

本邦における前立腺癌罹患率と死亡率は年々増加しているが、特に死亡率を低下させるためには前立腺癌の浸潤・転移機序を明らかにすることが重要である。

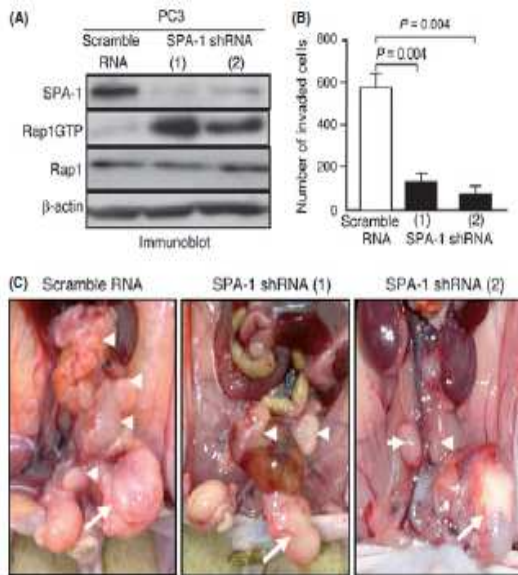
2005年10月号のNature Genetics誌において、Ras familyであるsmall G protein Rap1のGTPaseを負に調節する蛋白をコードする遺伝子SPA-1の遺伝子多型が乳癌マウスモデルの転移に関与し、実際に同遺伝子をRNA阻害すると肺転移数が減少することが報告された。SPA-1は共同研究者である湊

らによって1995年にクローニングされた遺伝子であり、今回我々はヒト前立腺癌において解析を行ったところ転移性前立腺癌組織においてその発現の上昇を認め、SPA-1遺伝子を過剰発現させたヒト前立腺癌細胞株では転移能の亢進を、また同遺伝子をRNA阻害すると転移能の低下を認めた。（下図）

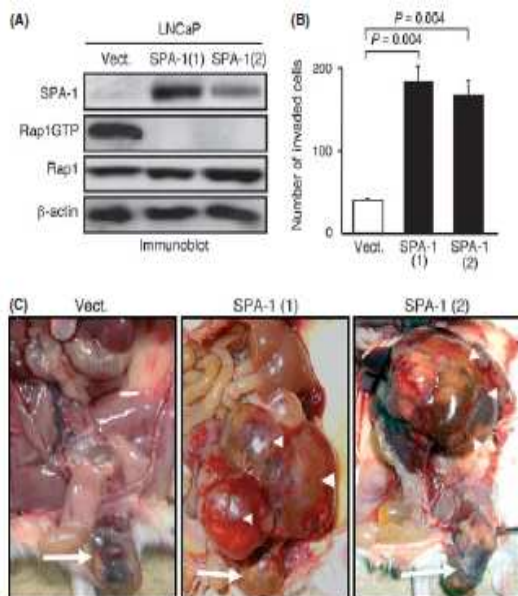
本研究代表者である吉村は、前立腺癌の治療に関する研究を行ってきたが、SPA-1遺伝子が前立腺癌の転移機構を調節している可能性が示唆された上記の知見に基づき、今回SPA-1蛋白のさらなる解析がその転移機構

の解明に繋がると想定し、研究費の交付を希望し申請するに至った。このように SPA-1/Rap1 が前立腺癌の転移機構に関与している可能性が示唆されたが、SPA-1 蛋白発現の制御や SPA-1/Rap1 を介した転移機序に関しては未だ解明されていない点が多かった。

Spa-1 発現抑制による転移抑制



Spa-1 強制発現による転移促進



2. 研究の目的

SPA-1/Rap1 を介したヒト前立腺癌における転移機序の解明を目的とする。具体的には、

- 1) SPA-1 遺伝子発現制御機構の解明
- 2) SPA-1/Rap1 下流シグナル伝達経路の解析
- 3) 前立腺癌患者の末梢血 DNA 遺伝子多型と臨床病期、特に転移との相関性の解析

を目的とする。

3. 研究の方法

1) SPA-1 遺伝子発現制御の機構の解明

SPA-1 蛋白低発現である LNCaP と SPA-1 蛋白高発現 PC3 細胞株における SPA-1 mRNA の発現は後者で約 8 倍の亢進を認めることから転写レベルでの制御を受けている可能性が示唆された。SPA-1 プロモーター領域には転写因子結合 motif が 20 種類以上存在する。両細胞株における各転写因子の発現を RT-PCR 法で解析したところ ETS-1 の発現の亢進を認め、WB 法にても同様の結果が得られた。

ETS-1 はヒト前立腺癌の cDNA マイクロアレイのデータベース (ONCOMINE) においても転移性前立腺癌において発現の亢進を認め、ETS-1 が転写レベルで SPA-1 遺伝子の発現を制御しヒト前立腺癌の転移能に関与する可能性が示唆された。これらのデータをふまえ、以下の実験を予定した。

- ① LNCaP と PC3 細胞株において gel shift assay 及びルシフェラーゼアッセイにて ETS-1 の転写レベルでの SPA-1 遺伝子発現制御機構の解明を行う。
- ② PC3 細胞株においては ETS-1 蛋白の発現を RNA 阻害により発現抑制し SPA-1 蛋白の発現を解析する。さらにはマウス移植モデルで転移能に関して検討を行う。
- ③ ETS-1 蛋白と SPA-1 蛋白の発現の相関を前立腺癌の針生検標本を用いて、免疫組織学的染色により解析する。

2) SPA-1/Rap1 下流シグナル伝達経路の解析

既知の Rap1 下流シグナル分子として、MAPK、細胞接着関連分子及び Rac small GTPase があり、SPA-1 発現がこれらのシグナル分子の発現や活性化状態を制御しているかどうかを、それぞれウェスタンブロッティング法、細胞免疫染色、プルダウンアッセイなどで検討する。

4. 研究成果

1) SPA-1 遺伝子発現制御の機構の解明

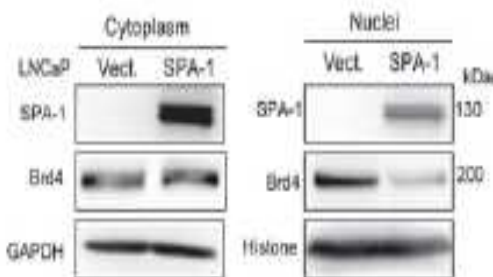
ETS-1 蛋白発現と SPA-1 蛋白発現の相関を前立腺癌の針生検標本を用いた免疫組織学的染色で検討した。その結果 ETS-1 蛋白発現レベルと SPA-1 蛋白発現レベルが相関する傾向を認めた。

そこで、LNCaP と PC3 細胞株において gel shift assay 及びルシフェラーゼアッセイにて ETS-1 の転写レベルでの SPA-1 遺伝子発現制御機構の解明を行ったが、有意な結果を得ることが出来なかった。

また、LNCaP 細胞に対する ETS-1 蛋白の強制発現や、PC3 細胞株における ETS-1 蛋白の発現を RNA 阻害による knock down においても、SPA-1 蛋白の発現の変化は見られず、ETS-1 が SPA-1 遺伝子発現の調節に関与している可能性は低いと考えられた。今後、他の候補遺伝子についてさらに検討を行う予定である。

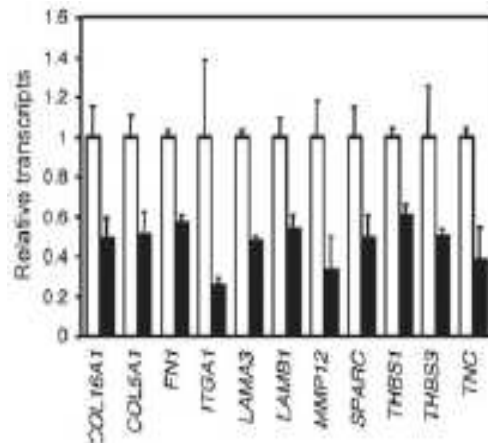
2) SPA-1/ Rap1 下流シグナル伝達経路の解析：

Rap1 下流シグナルのうち Spa-1 発現と細胞-ECM 接着性の変化を見出した。MAPK、細胞-細胞接着、Rac1 活性化については Spa-1 発現による変化を認めなかった。Rap1 を介さない、SPA-1 の下流シグナルとして、染色体結合因子のひとつである Brd4 がある。Brd4 は Spa-1 と結合すると Spa-1 の RapGAP 活性を増強することが知られている。今回、免疫染色の結果から、過剰量の Spa-1 により Brd4 の局在が細胞質に偏ることを認めた(下図)。



また、Brd4 により転移に関係する ECM 関連遺伝子の発現が変化すると報告があったため、ECM 関連遺伝子を対象とした PCRarray を行ったところ、SPA-1 導入により数多くの ECM 関連遺伝子が増加することが確認できた。

(下図)



Spa-1 が Rap1 シグナルの不活化による接着機能低下と Brd4 の局在変化による ECM 遺伝子群の発現変化によって、複合的に metastasis 亢進に寄与しているということが示唆された。

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2件)

(1) Terada N, Nakamura E, Ogawa O, et al.: "Association of genetic polymorphisms at 8q24 with the risk of prostate cancer in a Japanese population." *Prostate* (査読有) 68. 1689-1695 (2008), 1

(2) Yosuke Shimizu, Yoko Hamazaki, Masakazu Hattori, Keiko Doi, Naoki Terada, Takashi Kobayashi, Yoshinobu Toda, Toshinari Yamasaki, Takahiro Inoue, Yoichiro Kajita, Atsushi Maeno, Tomomi Kamba, Yoshiki Mikami, Toshiyuki Kamoto, Tomomi Yamada, Toru Kanno, Kiyotsugu Yoshikawa, Osamu Ogawa, Nagahiro Minato, Ejiro Nakamura.

SPA-1 controls the invasion and metastasis of human prostate cancer.

Cancer Sci (査読有)(102).828-836, 2011

[学会発表] (計2件)

(1) 清水洋祐, 中村英二郎, 小川修, ほか。
ヒト前立腺癌における Rap1 Gap SPA-1 を介した転移機序の解明. 第 48 回日本癌治療学会 (2010 年 10 月 28 日)。京都府京都市

(2) 清水洋祐, 中村英二郎, 小川修, ほか。
Spa-1 (SIP1) CONTROLS THE INVASION AND METASTASIS OF HUMAN PROSTATE CANCERS VIA RAP SIGNAL. 第 26 回日韓泌尿器科会議(2009 年 9 月 19 日)。ソウル(韓国)

(3) 清水洋祐, 中村英二郎, 小川修, ほか: "ヒト前立腺癌における Rap1 GAP SPA-1 を介した転移機序の解明" 第 67 回癌学会学術総会. (2008 年 10 月 28 日). 愛知県名古屋市

(4) 清水洋祐, 中村英二郎, 小川修, ほか: "ヒト前立腺癌における SPA-1 を介した転移機序の解明" 第 96 回日本泌尿器科学会総会. (2008 年 4 月 25 日). 神奈川県横浜市

[その他]

ホームページ等

<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 耕治 (Yoshimura Kouji)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40397542

(2) 研究分担者

小川 修 (Ogawa Osamu)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90260611

中村英二郎 (Nakamura Eijirou)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：90293878

兼松明弘 (Kanematsu Akihiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90437202

(3) 連携研究者

湊長博 (Minato Nagahiro)

京都大学・生命科学研究所・教授

研究者番号：40137716

服部雅一 (Hattori Masakazu)

京都大学・生命科学研究所・准教授

研究者番号：40211479