

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07611

研究課題名(和文) RBによるコレステロール代謝制御と前立腺がんの去勢抵抗性

研究課題名(英文) RB inactivation in prostate cells increase self-renewal and hormone therapy refractoriness through activation of mevalonate pathway

研究代表者

友杉 充宏 (TOMOSUGI, Mitsuhiro)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：60533429

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)：RB機能の喪失がSREBP-2の発現上昇、コレステロールを出発点とするアンドロゲンの生合成を亢進させる可能性がある。本研究から以下の結果が明らかになった。・ホルモン除去培地におけるRb1 K.O. LNCaP細胞増殖。・Rb1 K.O. LNCaP細胞、核画分におけるAR, E2F1, SREBP-2のタンパク質発現増加。・Rb1 K.O. LNCaP細胞スフェア形成が亢進。・Rb1 K.O. LNCaP細胞増殖抑制に対してスタチンが有効。これらの結果から新規RB代謝制御機構が明らかになる事が期待され、さらには進行前立腺がんの新規治療方法開発やスタチンの適用外使用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺がんの治療後、多くの場合は数年で耐性を獲得し去勢抵抗性前立腺がんへと移行する。去勢抵抗性前立腺がんの70%においてRBがん抑制遺伝子産物の機能が喪失し、そのことが患者の予後不良とよく相関することが報告されている(Schrecengost R., Knudsen KE., Seminars Oncology, 2013)。また、多くのがん腫において、RBの機能喪失は悪性進展を促進することが知られている。本研究結果から新規RB代謝制御機構も解明が期待される。またスタチンの有効性が期待されることから、適用外使用を含む進行前立腺がんの新規治療方法開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that RB increased SREBP-2 (sterol regulatory element-binding protein-2) activity which is a master regulator of the cholesterol synthesis pathway (Shamma A. et al., Cancer Cell, 2009). All steroid hormones are biosynthesized from cholesterol. These findings suggest that loss of function of RB may cause the acquisition of castration resistance in prostate cancer. The following results were obtained from this study. 1. Increased proliferation of Rb1 K.O. LNCaP cells in 10% Charcoal Dextran Treated FBS. 2. In Rb1 K.O. LNCaP cells, protein expression of AR, E2F1, and SREBP-2 is increased in the nuclear fraction. 3. Increased sphere formation in Rb1 K.O. LNCaP cells. 4. Suppression of Rb1 K.O. LNCaP cells growth by statins. These results are expected to clarify a novel regulatory mechanism of RB in prostate cancer. Furthermore, there is possibility that off-label use of statins is effective as a new treatment method for advanced prostate cancer.

研究分野：cancer

キーワード：RB コレステロール 前立腺がん SREBP-2 去勢抵抗性

1. 研究開始当初の背景

前立腺がんの治療には、手術、放射線と並んで、ホルモン療法が広く用いられているが、しかし多くの場合、前立腺がん細胞は数年で耐性を獲得し、去勢抵抗性前立腺がんへと移行する。去勢抵抗性前立腺がんの70%においてRBがん抑制遺伝子産物の機能が喪失し、そのことが患者の予後不良とよく相関することが報告されている (Schrecengost R., Knudsen KE., *Seminars Oncology*, 2013)。前立腺がんばかりでなく、多くのがんにおいて、RBの機能喪失は悪性進展を促進する。全前立腺がんの約25%において観察されるRBがん抑制遺伝子の機能喪失が、去勢抵抗性前立腺がんにおいては70%以上の頻度で観察されることから、RB機能の喪失と去勢抵抗性獲得には機能的な関連があると考えられてきた。実際に、アンドロゲン感受性前立腺がん細胞においてRBの発現を抑制すると、アンドロゲン除去培地における増殖能を獲得することが報告されている。

2. 研究の目的

高橋智聡研究室では、RBがコレステロール合成経路のマスターレギュレーターであるSREBP-2 (sterol regulatory element-binding protein-2) 転写因子の機能を制御することを見出している。全てのステロイドホルモンはコレステロールを元に生合成される。RB機能の喪失によって、SREBP-2の活性が上昇し、コレステロールを出発点とするアンドロゲンの生合成が亢進する可能性がある。これは、RB不活性化による前立腺がん去勢抵抗性獲得の機構をうまく説明するかもしれない。本計画は、RB機能喪失によって生じる前立腺がんの去勢抵抗性獲得機序を解明し、進行前立腺がんの新規治療方法を提案することを目指す。

3. 研究の方法

代表者は、RB機能喪失によるSREBP-2の活性上昇が、コレステロール合成経路関連遺伝子の活性化を促すことで、コレステロール合成が促進すると考えた (Figure 1, 2)。ホルモン除去培地条件下における前立腺がん細胞の増殖促進はWST-8アッセイを用いた。スタチンによる細胞増殖に対する影響も同様の方法を用いた。またタンパク質の発現は核と細胞質を分画しウエスタンブロット分析によって調べた。

4. 研究成果

(1) コレステロール合成経路の関与

去勢抵抗性前立腺がんは有効な治療方法が存在せず、現在においても新規治療方法の探索が行われている。本研究課題では、以下の研究成果に基づき、去勢抵抗性獲得にRBの制御機構が存在する可能性について検討することとした。研究代表者が所属する研究室は、RB欠失マウス甲状腺腫瘍に対して、RBを発現させることによって変化する遺伝子をマイクロアレイ法によって明らかにした (Shamma A. et al., *Cancer Cell*, 2009)。さらに、このデータを詳細に解析したところ、RBがコレステロール合成経路関連遺伝子の発現を調節している可能性が予想され、その中のいくつかの遺伝子は、実際にRB機能喪失前立腺がん細胞における発現上昇が確認された (Figure 1)。そこで Figure 2 に示した仮説をたてた。またアンドロゲン応答性前立腺癌細胞 LNCaP を用い、RBノックアウト前立腺がん細胞株を樹立した (Figure 3)。

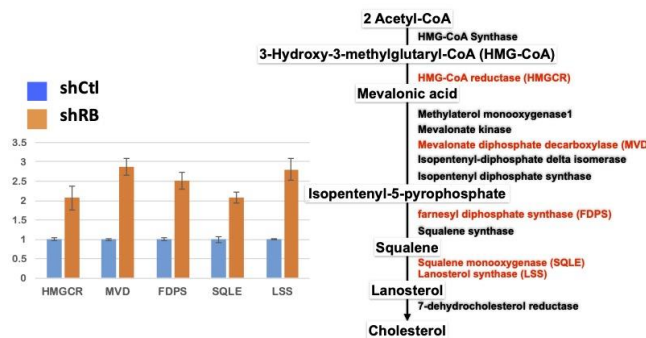


Figure 1. Cholesterol biosynthesis pathway

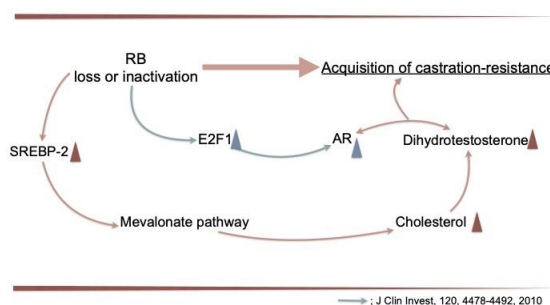


Figure 2. Hypothesis

(2) Rb1 K. O. 細胞株の増殖

Rb1 K. O. LNCaP 細胞を種々の培地を用い増殖能を調べた。その結果、10% C/Dt FBS (Charcoal Dextran Treated Fetal Bovine Serum) において Rb1 K. O. LNCaP 細胞の増殖がコントロールと比較して高いことがわかった (Figure 4)。

そこでこの条件における分子の挙動をウェスタンブロット分析によって調べた (Figure 5, 左)。またタンパク質の回収は細胞質及び、核それぞれの画分を採取した。Figure 2の仮説に従い種々の分子の発現を調べた結果、まずは既報と同様 E2F1 の発現が核画分で上昇していることが確認された。さらには、仮説通りに AR, SREBP-2 の発現上昇が核画分で観察された。また、AR に関しては核への移行を蛍光顕微鏡によって確認した (Figure 5, 右)。

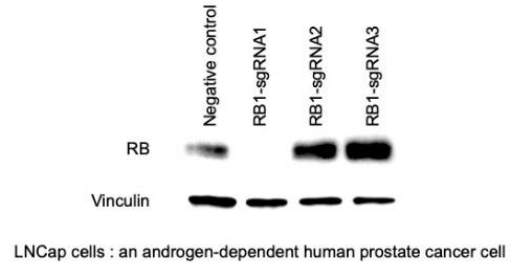


Figure 3. RB knock-out LNCap cells

(3) デヒドロテストステロン (DHT)、コレステロールによる細胞増殖効果

これまでの結果から、仮説 (Figure 2) に示した分子の挙動がホルモン除去培地における細胞増殖効果に参与している可能性が高いと考えられる。そこで、細胞増殖に参与している可能性が高い DHT やコレステロール添加による細胞増殖への効果を調べた (Figure 6)。しかしながら、添加による細胞増殖促進は確認されなかった。

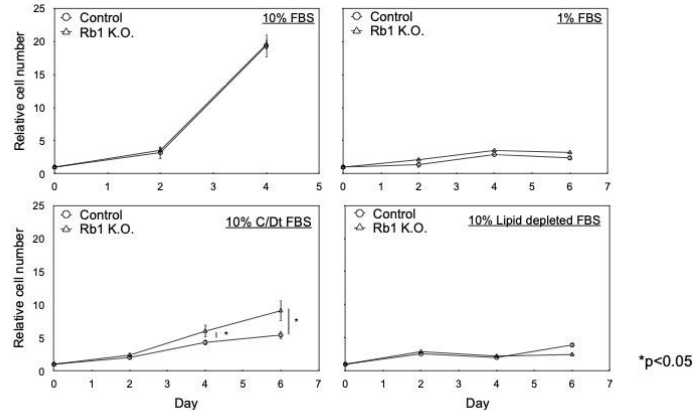


Figure 4. RB knock-out LNCap cells can proliferate at androgen-depleted medium

(4) RB 機能喪失による腫瘍形成能

がん幹細胞とは幹細胞と同様に自己複製能と未分化性の維持能力を有するがん細胞であり、腫瘍組織の増殖、薬剤耐性、転移に寄与すると考えられている (Ishiguro T. et al., Cancer Sci, 2019)。そこで、RB の機能喪失によって、がん幹細胞の特性である腫瘍形成能を調べた (Figure 7)。その結果、RB

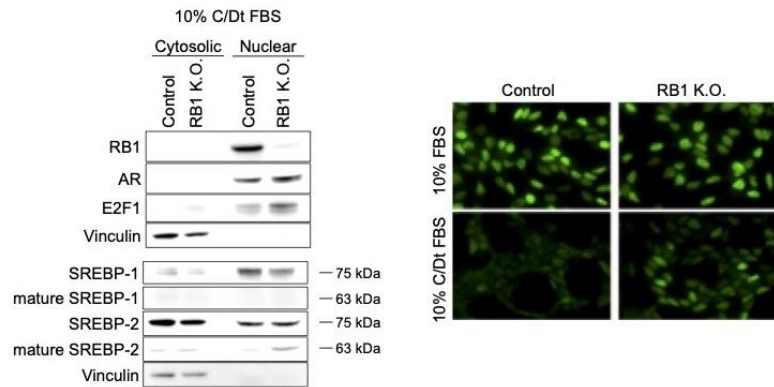


Figure 5. Expression of AR increase at RB knock-out LNCap cells at androgen-depleted medium

機能が喪失した前立腺がん細胞において、スフェア形成能が亢進することを見出した。さらには、コレステロール添加のみでもスフェア形成が促進することが明らかとなった (Figure 8)。これらのことから、RB 機能喪失前立腺がん細胞におけるコレステロール生合成経路の亢進は、アンドロゲン除去培地における細胞増殖だけではなくスフェア形成能に大きく寄与している可能性が示唆された。 今後は細胞増殖抑制効果のあるスタチンについて、スフェア形成能に対する阻害、メカニズムについて追及する。

本研究計画はRB機能喪失によるコレステロール生合成経路の活性化に

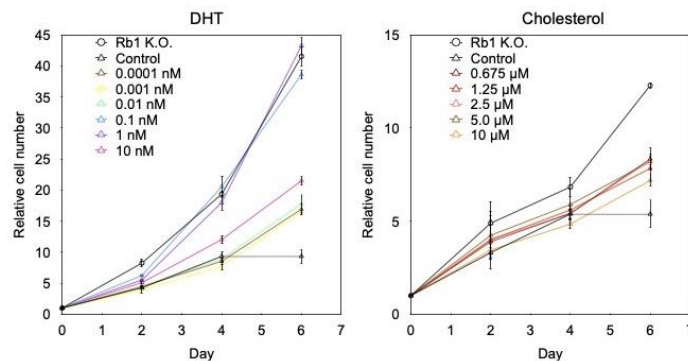


Figure 6. Addition of DHT or Cholesterol increase proliferation at androgen-depleted medium?

焦点を当て、幹細胞性獲得の関与からRB機能喪失によって生じる前立腺がんの去勢抵抗性獲得機序解明につながることを示唆された。本提案の達成によって、新規RB代謝制御機構が明らかになる事が期待されるとともに、これまでにない進行前立腺がんの新規治療方法、スタチンの適用外使用あるいはドラッグリポジショニングを提案できると考えている。

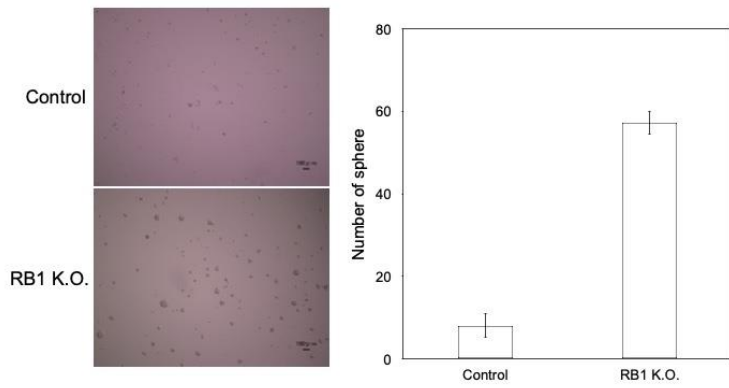


Figure 7. Sphere formation

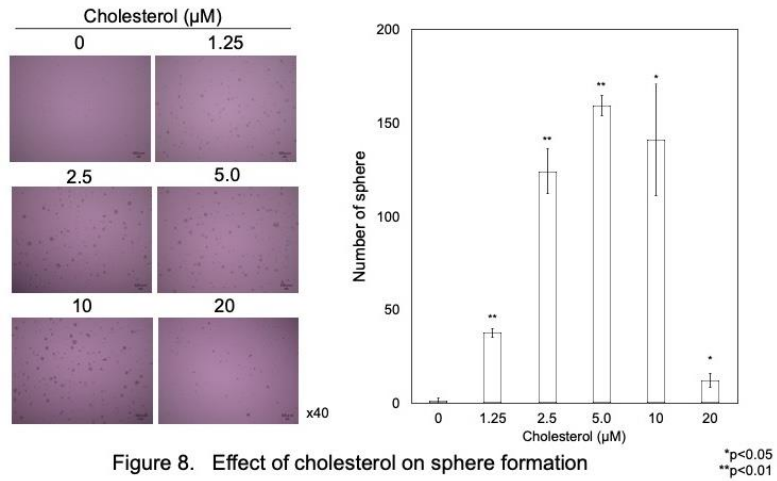


Figure 8. Effect of cholesterol on sphere formation

\*p<0.05  
\*\*p<0.01

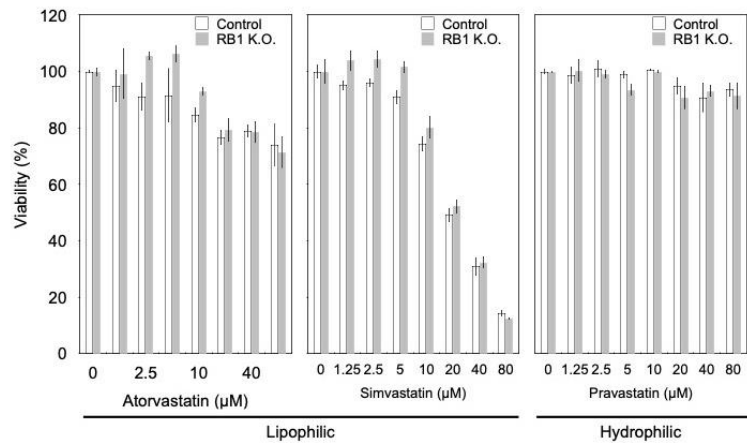


Figure 9. Effect of statin on 2D culture

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------