

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390443

研究課題名（和文）前立腺がん再燃を方向づける細胞極性制御分子のプロテオミクス解析と診断治療への応用

研究課題名（英文）Analysis of the molecules of cell polarity in associated with hormone refractory prostate cancer

研究代表者

窪田 吉信（KUBOTA YOSHINOBU）

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：10106312

研究成果の概要（和文）：

前立腺がんの再燃機序を解明するため、細胞の極性に重要である aPKC $\lambda/\iota$  に注目し、その発現と意義について検討を行った。その結果、前立腺がん組織では aPKC $\lambda/\iota$  が高発現していること、aPKC $\lambda/\iota$  が高発現した前立腺がんでは早期に生化学的再発を起こしていることが明らかとなった。更に、aPKC $\lambda/\iota$  は IL-6 の発現量を増加させ、前立腺がんを増殖させていることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

The mechanisms of developing hormone refractory prostate cancer (CRPC) remains unclear. We have provided the evidence that aPKC $\lambda/\iota$  expression correlates with prostate cancer recurrence. Experiments in vitro and in vivo revealed aPKC $\lambda/\iota$  to be involved in prostate cancer cell growth through secretion of IL-6. And we further demonstrated a correlation between biochemical recurrence after prostatectomy and the expression of these two factors. These results support our hypothesis that aPKC $\lambda/\iota$  play an important role in prostate cancer progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

進行前立腺がんの治療成績の向上には、男性ホルモンを低下させる、あるいは男性ホルモン作用をブロックする療法である内分泌療法中に癌細胞が再び増殖をはじめるとする再燃現象（現在、去勢抵抗性前立腺がん Castration Resistant Prostate Cancer :

CRPC と呼ばれる）の本態を探り、それに基づく適切な治療法や診断法の開発により適切な対策をすることである。従来、再燃性前立腺がんの問題は、男性ホルモンレセプター、癌遺伝子、癌抑制遺伝子、増殖因子遺伝子などの遺伝子やタンパク質を中心に分析され、我々も、これらの遺伝子の構造異常や発現の

異常などの観点から分析を行ってきた。そして大きくは男性ホルモンレセプターを中心に説明ができるようになってきた。しかし、まだCRPCの一部を説明できるに過ぎず、CRPCの成立やそのメカニズムについては、まだ不十分であるのが現状であり、新しい視点での分析が必要である。

我々は細胞の上下左右の方向性と他細胞との相互関係を“細胞極性”として、それらを調節する分子や遺伝子の存在と役割に注目している（平成15年～19年文部科学省21世紀COEプログラム「細胞極性システム研究に基づく未来医療創成」）。これらの分子の機能とその異常の関係より、癌は一種の「細胞極性病」という新しい考え方に立っている。

ホルモン依存性を失った再燃前立腺がん（CRPC）の細胞および組織では、特徴として再燃前に見られた腺上皮や腺管構造が喪失している。これは細胞極性の観点からすると、前立腺上皮細胞の極性の乱れそのものと考えられる。前立腺がんの組織構築の乱れは、現象としてはよく知られているものの、その分子機構やそれを決定する因子については全くわかっておらず、遺伝子とタンパクネットワークの変化や、またそれらを制御調節する分子の情報が必要であった。

我々はそこで、平成17年～19年文部科学省科学研究費補助金・基盤研究(B)では、その成果として、細胞極性の成立に重要な役割をもつと考えられる aPKC $\lambda$  と呼ばれる分子が前立腺がん細胞のホルモン依存性などの性質や臨床像に関係する可能性を明らかにした。しかし、その明細と aPKC など極性分子の役割と増殖促進や組織構築に及ぼすメカニズムはいまだ不明でまた極性分子の異常が臨床的なバイオマーカーにつながるかなどの検討すべき課題があった。

## 2. 研究の目的

これらの前段階の研究成果と抽出された課題をふまえ、本研究では、細胞の上下左右の方向性と他細胞との相互関係を調節する一連の既知の細胞極性制御分子と未知の極性関連分子に注目し、前立腺がん細胞や前立腺がん組織で主に分子細胞生物学手法やプロテオミクス解析と局在分析などを行う。また、臨床像との詳しい対比の分析を行い、前立腺がんの進行のターニングポイントとなる分子異常とその病態との関係の解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するため、下記の様々な方法でのアプローチを行った。

### (1)－① 前立腺細胞における aPKC の発現について

正常前立腺細胞 (PrEC) に対して活性型の

aPKC や不活性型の aPKC を発現するプラスミドベクターを遺伝子導入し、aPKC 遺伝子が安定発現している細胞株を作製した。得られた細胞株を用いて、その増殖能への関与について検討した。

また、その細胞株よりタンパクを抽出し、リン酸化ペプチドを特異的に検出するプロテオミクス解析を行うことにより、活性型 aPKC が発現している場合や不活性型 aPKC が発現している場合に変動しているタンパクのリン酸化状態について検討した。

### (1)－② 前立腺がん細胞における aPKC の発現と si-RNA による増殖・造腫瘍性の変化

ヒト前立腺がん細胞における aPKC 発現をウエスタンブロット等により検討した。また aPKC の si-RNA を導入することによる細胞増殖の変化を in vitro と、ヌードマウスを用いた造腫瘍性を検討した。

### (2)－① 前立腺がんにおける極性制御分子 aPKC m-RNA 発現について

ヒト前立腺がん組織における極性制御分子の aPKC の発現状況を明らかにするために、正常前立腺組織や前立腺がん組織より m-RNA を抽出し、real time 定量的 PCR 法を用いて、各組織における aPKC $\lambda/\iota$  の発現量を測定した。また、その発現量と臨床像との関係を分析した。

### (3)－① 前立腺がん細胞における aPKC 発現とサイトカイン分泌との関係

ヒト前立腺がんにおける aPKC のパラクラインやオートクラインサイトカイン分泌への影響を検討するため、ヒト前立腺がん由来 DU145 細胞を培養し、aPKC の si-RNA を前述 (I-2) での実験と同様に DU145 細胞に導入し、その培養液中への IL-6 などサイトカインの分泌量をサイトカインメンブレインアレイパネルと RT-PCR 法により検討した。

### (3)－② aPKC $\lambda/\iota$ による前立腺がん細胞における IL-6 分泌・発現の検討

どのような分子が aPKC $\lambda/\iota$  によって制御を受けているかを、特に、増殖因子及びサイトカイン注目して検討を行った。

実際に aPKC $\lambda/\iota$  による IL-6 の制御が前立腺がん細胞の増殖に関与しているかについては、siRNA 導入細胞及びコントロール細胞間での STAT3 のリン酸化状態及び siRNA 導入細胞に IL-6 を添加することで比較した。

### (3)－③ aPKC $\lambda/\iota$ による IL-6 m-RNA 発現制御のメカニズムの検討

aPKC $\lambda/\iota$  による IL-6 の発現は転写レベルで制御されている可能性が高いことから、IL-6 プロモーターを用いたルシフェラーゼ

アッセイにより、転写活性の変化について検討を行った。

さらにゲルシフトアッセイを用いて NF- $\kappa$ B 及び AP-1 の DNA 結合能を検討した。

### (3)–④ ヒト前立腺がんの IL-6 と aPKC $\lambda$ / $\iota$ の発現と臨床像の関係

ヒト前立腺がん組織を用い aPKC  $\lambda$ / $\iota$  と IL-6 タンパクについて免疫組織化学染色で分析を行い、臨床像との相関を統計学的に解析を行った。

### (4)–① aPKC 遺伝子とアンドロゲンシグナルとの関係について

aPKC 遺伝子 (分子) と前立腺がんの増殖を特徴づけるアンドロゲンシグナルとの関係を分析するために、aPKC 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、アンドロゲン刺激によって aPKC プロモーターの転写活性が変動するカルシフェラーゼアッセイ法を用いて検討した。また、アンドロゲンレセプターを発現している正常前立腺細胞株である RWPE-1 細胞に活性型 aPKC や不活性型 aPKC を発現させることにより起こる増殖能の変化やリン酸化されるタンパクについてプロテオミクス解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)–① 前立腺細胞における aPKC の発現について

正常前立腺細胞株 (PrEC) に活性型の aPKC を強制発現させると、コントロールの細胞株と比較して増殖能が高くなった。一方で、不活性型の aPKC を強制発現させた細胞株では増殖能がコントロールと比較して低くなった。

また、これらの細胞の発現タンパクのプロテオミクス解析からは活性型 aPKC 遺伝子の導入により多くのタンパクの発現変動及びリン酸化状態の変化が見られた。すなわち、活性型 aPKC は前立腺がん細胞において、増殖に関わる指令的な役割を持つ Key となる 1 つの重要分子であることが示唆された。

### (1)–② 前立腺がん細胞における aPKC の発現と si-RNA による増殖・造腫瘍性の変化

各ヒト前立腺がん細胞株 (LNCaP、PC-3、DU145) における aPKC  $\lambda$ / $\iota$  の発現は正常前立腺細胞株 (PrEC) と比較して、高い発現を認めた。ヒト前立腺がん細胞株 DU145 に対して、aPKC  $\lambda$ / $\iota$  に対する si-RNA を導入し、コントロール細胞との増殖能の違いについて検討したところ、si-RNA 導入細胞はコントロールと比較して増殖能が低下した。また、これらの細胞をヌードマウス皮下に移植すると、ヌードマウスへの造腫瘍能も si-RNA 導入細胞で明らかに低下した。

### (2)–① 前立腺がんにおける極性制御分子 aPKC m-RNA 発現について

ヒト前立腺組織において aPKC  $\lambda$ / $\iota$  は正常前立腺や前立腺肥大症の群に比べて、前立腺がん組織で有意に高く発現することが分かった。

また、再燃前立腺がん (CRPC) 組成の aPKC  $\lambda$ / $\iota$  の発現を未治療前立腺がん組織と比較したところ、再燃前立腺がん組織では aPKC  $\lambda$ / $\iota$  発現の高い症例が多かった。

### (3)–① 前立腺がん細胞における aPKC 発現とサイトカイン分泌との関係

ヒト前立腺がん細胞 DU145 細胞と DU145 細胞に aPKC の si-RNA を導入した細胞のサイトカインの比較では、培養液中への IL-6 の分泌は、メンブレインアレイ法と PCR 法を用いて分析した結果、IL-6 分泌が抑制されることが明らかとなった。このことは、ヒト前立腺がん細胞において、aPKC は IL-6 の発現を介して前立腺がんの増殖促進に働くことが示唆された。

### (3)–② aPKC $\lambda$ / $\iota$ による前立腺がん細胞における IL-6 分泌・発現の検討

siRNA 導入細胞では、IL-6 の培地中への分泌量が有意に減少していることが明らかとなった。また、ELISA を用いて IL-6 分泌量を定量的に検討したところ、同様の結果を得た。更に、IL-6 mRNA の発現量を確認したところ、タンパク同様に IL-6 mRNA の減少が認められていた。また、IL-6 mRNA の減少は他の前立腺がん細胞株である PC-3 に siRNA 発現プラスミドベクターを遺伝子導入したことによっても得られることを確認している。このことから、IL-6 の減少は mRNA の転写レベルで起きていると推測された。

また、siRNA 導入細胞では STAT3 のリン酸化が抑制されていた (図 1)。また、IL-6 を培地中に添加することで、siRNA 導入細胞の増殖が回復し、コントロール細胞と同等の増殖能を示した (図 2)。

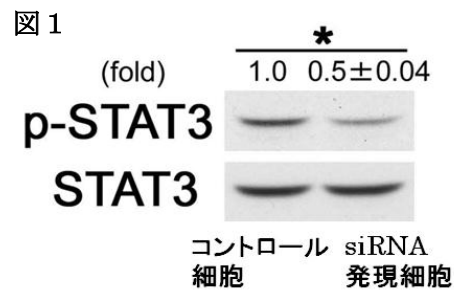
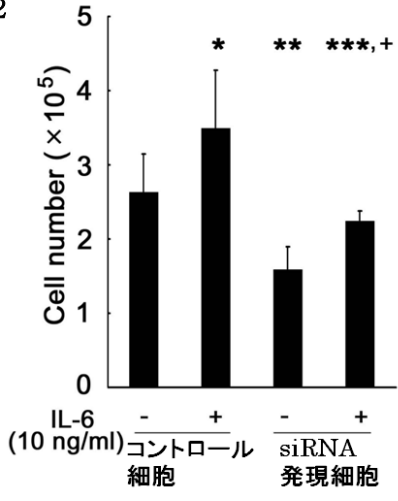
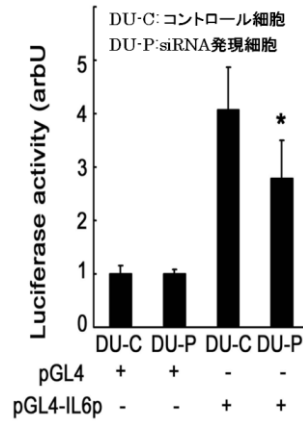


図 2



b)



(3) - ③ aPKCλ/ιによる IL-6 mRNA 発現制御のメカニズムの検討

DU145 細胞に aPKCλ/ι の発現ベクターを遺伝子導入した場合には IL-6 プロモーターの転写が上昇し、逆に siRNA 発現細胞では IL-6 プロモーターの転写活性は減少していた (図 3a, b)。IL-6 の発現には幾つかの転写因子の関与、特に NFκB 及び AP-1 が重要であることが明らかとなっている (図 3a)。

強い結合能が認められた一方で、siRNA 発現細胞とコントロール細胞を比較した場合、siRNA 発現細胞でこれら二つの転写因子の DNA 結合能が低下していた (図 3c)。

c)

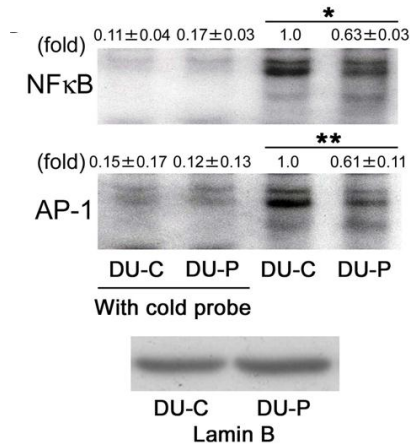


図 3

a)

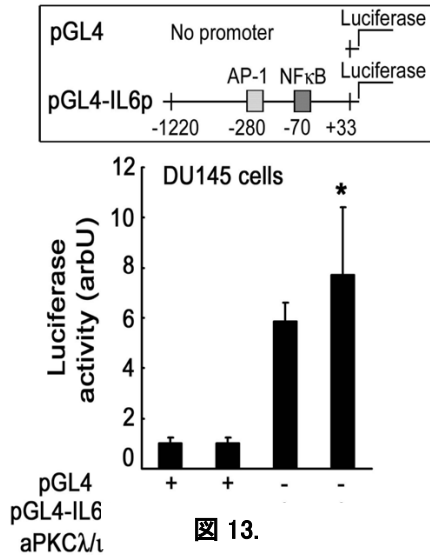
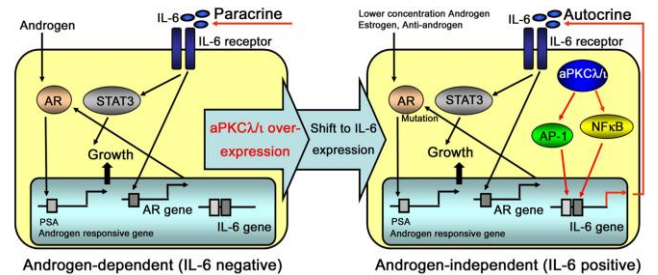


図 13.

これらのことより aPKC の発現は IL-6 遺伝子の転写調節に直接関わり、結果として IL-6 のオートクラインの分泌が亢進し細胞増殖を促進することが明らかとなった (図 4)

図 4



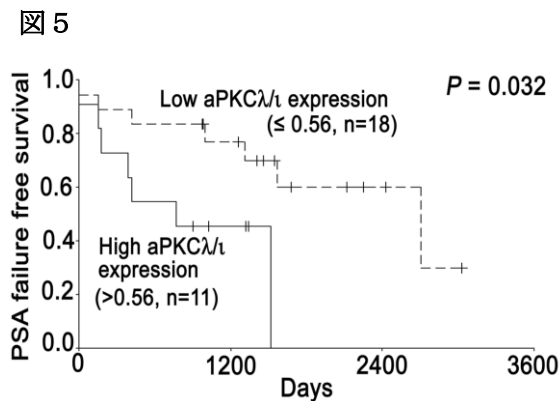
(3)－④ ヒト前立腺がんの IL-6 と aPKC $\lambda/\iota$  の発現と臨床像の関係

ヒト前立腺がん組織では aPKC $\lambda/\iota$  の発現と IL-6 の発現には下記の結果が得られた。

1) 前立腺がん組織での aPKC $\lambda/\iota$  の発現と IL-6 の発現は正の相関がある。

2) aPKC $\lambda/\iota$  の異常発現は前立腺がんのグリーソンスコアの高さと相関し、また、前立腺全摘術後の PSA 再発（生化学的再発）と有意に相関した。すなわち aPKC $\lambda/\iota$  の発現が高まると PSA 再発が多くなることがわかった。

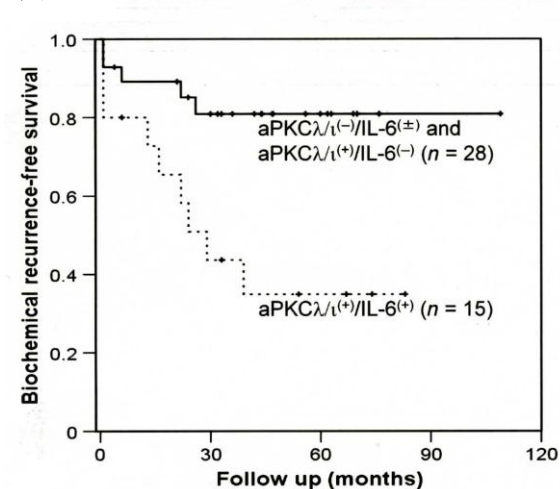
(図 5)



3) aPKC $\lambda/\iota$  の発現の亢進と、IL-6 の発現の亢進が両方とも見られる例では、PSA 再発が有意に高かった (図 6)。

これらより、aPKC $\lambda/\iota$  と IL-6 の発現は、前立腺がんの発病後の再発を予測する有用なバイオマーカーとなることが明らかとなった。

図 6



(4)－① aPKC 遺伝子とアンドロゲンシグナルとの関係について

現在分析の結果を解析中であるが、

1) アンドロゲン－アンドロゲンレセプターシグナルと aPKC を主体とする細胞極性シグナルの関係は、相互作用が示唆される。

2) aPKC による増殖促進とがん化への関与の機構とホルモンによる増殖調整を行う系での Key となるタンパクについて同定が必要である。

などの興味深い結果が得られている。さらなる詳細な検討によりこの重要なポイントを確定することが今後の課題である。

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 12 件)

① Ishiguro H, Akimoto K, Nagashima Y, Kagawa E, Sasaki T, Sano JY, Takagawa R, Fujinami K, Sasaki K, Aoki I, Ohno S, Kubota Y, Uemura H: The co-expression of aPKC $\lambda/\iota$  and IL-6 in prostate cancer tissue correlates with biochemical recurrence. *Cancer Science*, 102(8):1576-81, 2011-08.

② Endoh K, Nishi M, Ishiguro H, Uemura H, Miyagi Y, Aoki I, Hirano H, Kubota Y, Ryo A: Identification of phosphorylated proteins involved in the oncogenesis of prostate cancer via Pin1-proteomic analysis. *The Prostate*, [Epub ahead of print] 2011-08.

③ Hoshino K, Ishiguro H, Teranishi JI, Yoshida SI, Umemura S, Kubota Y, Uemura H: Regulation of androgen receptor expression through angiotensin II type 1 receptor in prostate cancer cells. *The Prostate*, 71(9):964-75, 2011-07.

④ Uemura H, Hoshino K, Kubota Y: Engagement of renin-angiotensin system in prostate cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 11(4):442-450, 2011-05.

⑤ Sano F, Terao H, Kawahara T, Miyoshi Y, Sasaki T, Noguchi K, Kubota Y, Uemura H: Contrast-enhanced ultrasonography of the prostate: various imaging findings that indicate prostate cancer. *BJU International*, 107(9):1404-10. 2011-05

⑥ Minamimoto R, Uemura H, Sano F, Terao H, Nagashima Y, Yamanaka S, Shizukuishi K, Tateishi U, Kubota Y, Inoue T: The potential of FDG-PET/CT for detecting prostate cancer in patients with an elevated serum PSA level. *Annals of Nuclear Medicine*, 25(1):21-27. 2011-01.

- ⑦ Kawahara T, Ishiguro H, Hoshino K, Teranishi J, Miyoshi Y, Kubota Y, Uemura H: Analysis of NSAID-activated gene 1 expression in prostate cancer. *Urologia Internationalis*, 84(2):198-202, 2010-06
- ⑧ Takagawa R, Akimoto K, Ichikawa Y, Akiyama H, Kojima Y, Ishiguro H, Inayama Y, Aoki I, Kunisaki C, Endo I, Nagashima Y, Ohno S: High expression of atypical protein kinase C  $\lambda$ /I in gastric cancer as a prognostic factor for recurrence. *Annals of Surgical Oncology* 17(1): 81-88, 2010.
- ⑨ Ishiguro H, Akimoto K, Nagashima Y, Kojima Y, Sasaki Y, Ishiguro-Imagawa Y, Nakaigawa N, Ohno S, Kubota Y, Uemura H: aPKC  $\lambda$ /I promotes growth of prostate cancer cells in an autocrine manner through transcriptional activation of interleukin-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 106(38):16369-16374, 2009-09.
- ⑩ Minamimoto R, Tateishi U, Uemura H, Yamanaka S, Kubota Y, Inoue T: Avid F-18 FDG uptake in prostatic sarcoma. *Clinical Nuclear Medicine*, 34(6):388-389, 2009-06.
- ⑪ Sugiyama Y, Akimoto K, Robinson M. L, Ohno S, Quinlan R. A: A cell polarity protein aPKC $\lambda$  is required for eye lens formation and growth. *Dev Biol*, 336(2): 246-256, 2009
- ⑫ Hirose T, Satoh D, Kurihara H, Kusaka C, Hirose H, Akimoto K, Matsusaka T, Ichikawa I, Noda T, Ohno S: An essential role of the universal polarity protein, aPKC $\lambda$ , on the maintenance of podocyte slit diaphragms. *PLoS ONE*, 4(1): e4194, 2009.
- [学会発表] (計 5 件)
- ① Ichikawa Y, Ishikawa T, Shimizu D, Goto A, Shimamura T, Suwa H, Tatsumi K, Watanabe K, Ota M, Fujii S, Kawamata M, Akimoto K, Nagashima Y, Takahashi H, Nakajima A, Ohno S, Endo I: In laterally spreading type tumors (LSTs) of the colon or the rectum, expression of the atypical protein kinase C  $\lambda$ /iota is correlated to expression of beta-catenin and type IV collagen. The 102<sup>nd</sup> Annual Meeting of American Association for Cancer Research, (Orland, FL), 2011. 4. 2-6
- ② Iwasaki M, Uemura H, Nakaigawa N, Hayashi N, Ueno D, Makiyama K, Sano F, Sakata R, Noguchi G, Kawakami S, Hata M,

Omura M, Inoue T, Kubota Y: Salvage radiotherapy for rising PSA after radical prostatectomy. The 20th Taiwan Urology Association Annual Meeting, Taipei, Taiwan, 2010. 11. 13.

- ③ Akimoto K, Zheng Y-W, Nagashima Y, Ishiguro H, Asai-Sato M, Kojima Y, Li B, Sasaki K, Kagawa E, Kim M, Taniguchi H, Noda T, and Ohno S: Atypical protein kinase C  $\lambda$ /I regulates mouse mammary progenitor cell propagation. 6th International Symposium on Hormonal Oncogenesis, Tokyo, 2010. 9. 12-16
- ④ Uemura H, Takahashi S, Hoshino K, Ishiguro H, Kubota Y: Role of Renin-Angiotensin System in Prostate Cancer. Symposium "Angiotensin", 14th International Congress on Hormone Steroids and Hormones & Cancer, Edinburgh, England. 2010. 9. 22
- ⑤ Miyoshi Y, Umemoto S, Uemura H, Shibata Y, Arai S, Suzuki K, Honma S, Kubota Y: Determination of Androgens concentrations in prostate tissue taken by needle biopsy by LC/MS/MS - Preliminary study for diagnosis of malignancy from androgen level in prostate tissue - American Urological Association 104<sup>th</sup> Annual Meeting, Chicago, USA, 2009. 4. 25-30

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

窪田 吉信 (KUBOTA YOSHINOBU)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：10106312

### (2) 研究分担者

上村 博司 (UEMURA HIROJI)  
横浜市立大学・附属病院・准教授  
研究者番号：50244439

長嶋 洋治 (NAGASHIMA YOUJI)  
横浜市立大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：10217995

秋本 和憲 (AKIMOTO KAZUNORI)  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号：70285104