

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 5月 18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009年～2011年

課題番号：21791510

研究課題名（和文）3次元培養モデルを用いた前立腺発癌機構の解析とバイオマーカーの検索

研究課題名（英文） Analysis of prostate carcinogenesis using in vitro three-dimensional culture assay

研究代表者

猪口 淳一（INOKUCHI JUNICHI）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10403924

研究成果の概要（和文）：前立腺癌の発癌・増殖機構は未だに不明な点が多い。本研究では、より生体に近い実験系として3次元培養法を用いた解析を行い、前立腺発癌機構解析のための新たな解析手法を確立した。同手法により、アネキシンA1抑制によるIL-6を介した前立腺癌への関与を明らかにした。また、前立腺の正常な腺管形成にアンドロゲンレセプター（AR）が重要な役割を果たしていることをみだし、ARの発現制御に関与する分子の機能解析をすることで前立腺癌への寄与を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of prostate carcinogenesis is not elucidated yet. In this study, we established a new experimental procedure for analyzing prostate carcinogenesis using in vitro three dimensional culture (3D) assays. Using this method, we showed a direct role for decreased annexin A1 expression in prostate carcinogenesis via the up-regulation of IL-6. Furthermore, we indicated an important role for androgen receptor (AR) in forming normal acinar structure in 3D culture. We reported several mechanisms of prostate carcinogenesis by regulating AR expression and its activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000円	510,000円	2,210,000円
2010年度	700,000円	210,000円	910,000円
2011年度	700,000円	210,000円	910,000円
年度			
年度			
総計	3,100,000円	930,000円	4,030,000円

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、前立腺癌、発癌、3次元培養

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、欧米諸国においては男性の癌罹患率の第一位、死亡率の第二位を占めており社会的関心は極めて高い。本邦においても前立腺癌検診の普及などによる診断率の向上を背景に前立腺癌患者数は急速な増加傾向を示しており、高齢者人口のますますの増

加に伴い前立腺癌は最も憂慮すべき悪性腫瘍の1つになると考えられる。その中で、前立腺癌の予防は重要な前立腺癌対策の柱と考えられが、発癌に関する分子機構については不明な点が多い。

これまで前立腺癌の発癌に関する研究において、その分子機構の多くは培養細胞を用

いた2次元培養環境にて得られてきた。しかし、一般的な二次元培養環境では高次構造に必要な接着因子の発現や受容体発現パターンの違いなどが反映されず、一方マウスなどを使った *in vivo* 解析は細胞内シグナリングの解析には適さない。その中で、細胞外マトリックスを用いた *in vitro* 3次元培養はより *in vivo* に近い培養系として近年注目されている。これまで乳腺正常細胞や乳癌細胞を用いた3次元培養による発現分子のプロファイルや細胞内シグナリングの解析などにより、多くの新しい知見が得られ報告されてきた。一方、前立腺癌研究の領域では、3次元培養を用いた研究は我々を含めて数施設から報告があるのみで、未だ十分に解析されていない。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、前立腺正常細胞株である RWPE-1 細胞を使い、細胞外マトリックスとして Matrigel™ を用いた3次元培養法を確立し報告してきた。本研究ではこの3次元培養モデルを用いて、前立腺発癌解析モデルを樹立し、前立腺癌発癌に関する分子機構を説明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 前立腺発癌機構解析ツールとしての3次元培養法の確立

これまでに、3次元培養法を用いることにより前立腺の腺腔様構造を形成することに成功したが、前立腺癌を同モデルにより作成することで、発癌機構解析の有用なツールになると考えられた。そこで、前立腺癌において高率に発現の欠失がみられ、その機能解析が進んでいる PTEN 遺伝子のノックダウン細胞株を樹立して、同細胞株を使用して発癌モデルを作成することとした。

① *In vitro* 発癌モデルとしての PTEN 遺伝子ノックダウン細胞の構築

3次元培養での形態変化を比較確認するため、RWPE-1 細胞を親株として、PTEN 遺伝子の発現抑制細胞株を樹立する。

② PTEN ノックダウン細胞を用いた3次元培養による形態変化、蛋白発現の変化の解析

上記により作成された PTEN ノックダウン

細胞株を用いて3次元培養を行い、その形態、シグナリングの変化を解析する。このことにより、3次元培養環境における発癌の形態変化を確認し解析法を確立する。

(2) 3次元培養モデルを用いたアネキシンA1 (AnxA1) の機能解析

上記により確立された3次元培養解析法を用いて、前立腺癌でその発現が抑制されているものの、その機能について不明な点が多い AnxA1 の機能解析を行い、前立腺癌の関与について解析を行う。同解析により、遺伝子発現の制御による、*In vitro* での発癌機能解析法を確立する。

(3) 様々な薬剤やサプリメントなどの発癌抑制効果の解析

近年、前立腺癌発症の予防や癌増殖抑制に大豆イソフラボンやクルクミンが有効であるとの報告がなされている。また、疫学研究などから、様々な薬剤が前立腺癌の発癌を抑制する可能性が報告されてきた。中でも高コレステロール血症治療薬であるスタチン (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A 還元酵素阻害剤) は前立腺癌のリスクを減少させることが報告されている。そこで、その発癌抑制機構の解析を行うこととした。

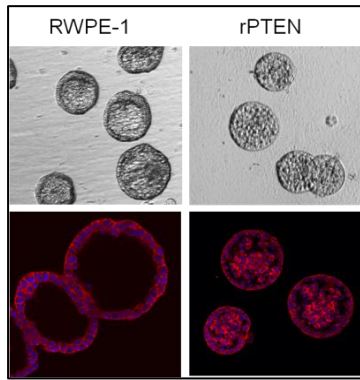
(4) cDNA マイクロアレイ法を用いた発癌に関与する新規バイオマーカーの検索

cDNA マイクロアレイ法を用いて前立腺の腺管構造の形成に重要な分子を同定して、その機能解析を行うことで、発癌機構の解析を行う。このことにより、発癌に関与するバイオマーカーを探究する。

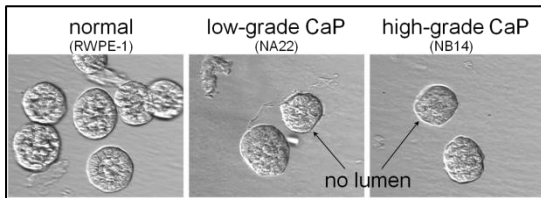
4. 研究成果

(1) 前立腺発癌機構解析ツールとしての3次元培養法の確立

前立腺正常細胞株である RWPE-1 細胞を親株として、PTEN 遺伝子の発現抑制細胞株 (rPTEN) を樹立した。続いて rPTEN 細胞を用いた3次元培養を行い、形態変化、蛋白発現変化の解析を行った。3次元培養環境では、親株である RWPE-1 細胞株は培養開始より7日目頃より明らかな腺腔形成がみられるのに対して、rPTEN 細胞では腺腔形成遅延がみられた。

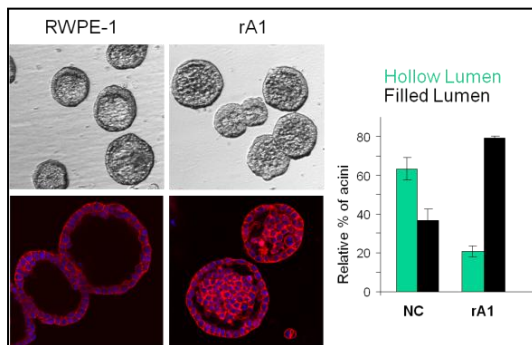
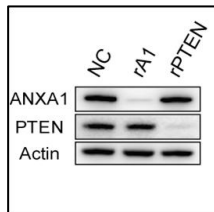


この Phenotype が癌化を表していることを確認するため、RWPE-1 細胞由来で薬剤により癌化させた細胞株 NA22、NB14 を用いて 3 次元培養環境下での形態を確認し、同様の腺腔形成異常があることを確認した。

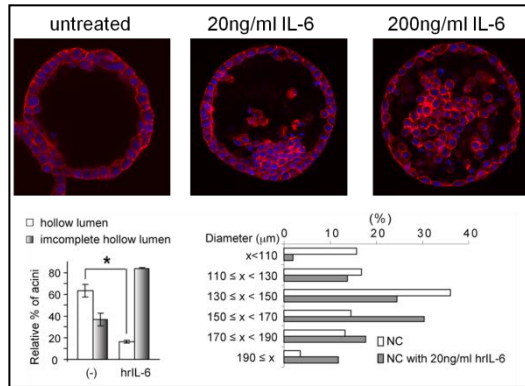


(2) 3 次元培養モデルを用いた AnxA1 の機能解析

PTEN ノックダウン細胞を樹立したのと同様の方法にて AnxA1 の発現を抑制した細胞株 (rA1) を作成した。reverse-phase protein array (RPPA) 解析では AnxA1 の発現抑制により Akt、NF- κ B p65 のリン酸化が亢進しており、同経路の活性化が示唆された。rA1 細胞ではコントロールと比較して、NF- κ B 経路の標的の一つである IL-6 の発現分泌が亢進していた。3 次元培養モデルを用いてその腺管様構造の形成能を比較したところ、AnxA1 発現抑制により 3 次元構造内部のアポトーシスの遅延がみられ、腺腔様構造の形成が遅延した。

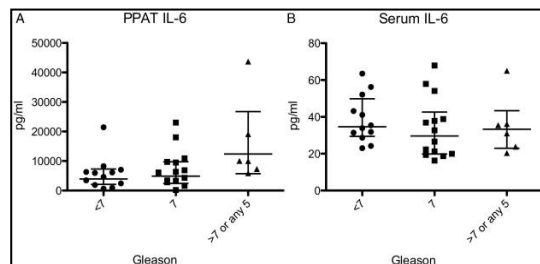


腺腔様構造の形成遅延はコントロール細胞の培地に組換え IL-6 を添加することでも観察され、さらに rA1 細胞の培地に IL-6 の中和抗体を添加すると同現象が抑制されることから、この腺腔様構造の形成遅延は IL-6 の分泌を介するものであることが示唆された。



これらより AnxA1 の発現抑制は、Akt の活性化、IL-6 の分泌を介して前立腺癌の発がん・増殖に関与することが示唆された。当該研究は、前立腺癌における NF- κ B の関与を示すとともに、前立腺細胞の 2 次元培養と 3 次元培養環境下での差を示した点で非常に有意義な報告であったと考える。同時に、*In vitro* での前立腺癌解析モデルとしての有用性を示した報告として評価された。

また、IL-6 の分泌による前立腺癌の発癌・増殖に注目し、臨床サンプルを用いて前立腺周囲脂肪から分泌される IL-6 と前立腺癌の組織学的悪性度との相関を検討した。その結果、血清 IL-6 と悪性度に相関は認めなかったが、前立腺周囲脂肪組織 (PPAT) から分泌される IL-6 と Gleason の高い前立腺癌には有意な相関を認めた。以上から、IL-6 が前立腺癌の発癌・増殖における重要なメディエーターであることが示唆された。



(3) スタチンによる前立腺癌のアンドロゲン受容体発現低下と増殖抑制効果

Western blotting にて、mevastatin と simvastatin の両者とも AR と PSA 蛋白を減少させた。しかし、スタチンは PSA mRNA を減少させるものの、AR の mRNA 発現には影

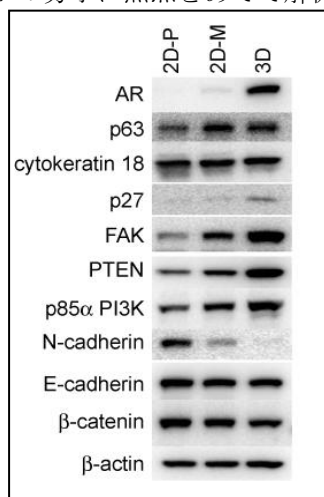
響を与えなかった。プロテアーゼ阻害剤 MG132 を添加すると、スタチンによる AR の蛋白低下は抑制されるため、スタチンによる AR 低下は蛋白分解促進によることが示唆された。さらに、スタチンは AR 蛋白量を低下させることで、細胞増殖を抑制し、dihydrotestosterone (DHT) の感度を低下させることが明らかとなった。

これらの結果よりスタチンによる AR の蛋白発現低下作用は、転写ではなく蛋白分解亢進によるもので、AR の蛋白低下により細胞増殖抑制とアンドロゲン感受性の低下を生じた。これは、疫学的に明らかになっているスタチンによる前立腺癌予防効果を説明する一機序と考えられた。

(4) 3次元培養環境下での AR の発現亢進と発癌、癌増殖における機能解析

2次元及び3次元培養環境での遺伝子発現の違いを、cDNA マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析を行い、一部の遺伝子についてはその蛋白発現も確認した。

RWPE-1細胞では2次元培養環境下では発現していない AR が3次元培養にて発現誘導されることを確認した。AR の異常な活性化はホルモン不応性前立腺癌の原因の一つであり、その活性化の調節機構は不明な点が多い。そこで、AR の制御を介した前立腺癌への影響をいくつかの分子に焦点をあてて解析した。



RWPE-1 cells were cultured in 2D on plastic (2D-P) or matrigel (2D-M) or under 3D conditions.

① Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator -1 α (PGC-1 α)

AR と結合する分子 PGC-1 α の前立腺癌における機能解析を行った。PGC-1 α は AR の共因子として AR の機能制御をしていると考えられ、PGC-1 α の発現抑制により前立腺癌細胞

の発育が抑制された。このことより、PGC-1 α は前立腺癌治療の標的になりうると考えられた。

② Tip60

ヒストンのアセチル化に関与する分子 Tip60 の過剰発現により、AR による転写がアンドロゲン非依存性に活性化された。逆に、Tip60 の発現抑制により、前立腺癌細胞の増殖抑制がみられたことより、治療の標的となりうる可能性が示唆された。

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6件)

① Kashiwagi E, Shiota M, Yokomizo A, Itsumi M, Inokuchi J, Uchiumi T, Naito S. Downregulation of phosphodiesterase 4B (PDE4B) activates protein kinase A and contributes to the progression of prostate cancer. *Prostate*. 72(7):741-51. 2012年 査読有

② Yokomizo A, Shiota M, Kashiwagi E, Kuroiwa K, Tatsugami K, Inokuchi J, Takeuchi A, Naito S. Statins reduce the androgen sensitivity and cell proliferation by decreasing the androgen receptor protein in prostate cancer cells. *Prostate*. 71(3):298-304. 2011年 査読有

③ Shiota M, Yokomizo A, Masubuchi D, Tada Y, Inokuchi J, Eto M, Uchiumi T, Fujimoto N, Naito S. Tip60 promotes prostate cancer cell proliferation by translocation of androgen receptor into the nucleus. *Prostate*. 70(5):540-54. 2010年 査読有

④ Shiota M, Yokomizo A, Tada Y, Inokuchi J, Tatsugami K, Kuroiwa K, Uchiumi T, Fujimoto N, Seki N, Naito S. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha interacts with the androgen receptor (AR) and promotes prostate cancer cell growth by activating the AR. *Mol Endocrinol*. 24(1):114-27. 2010年 査読有

⑤Finley DS, Calvert VS, Inokuchi J, Lau A, Narula N, Petricoin EF, Zaldivar F, Santos R, Tyson DR, Ornstein DK. Periprostatic adipose tissue as a modulator of prostate cancer aggressiveness. J Urol. 182(4):1621-7. 2009年 査読有

⑥Inokuchi J, Lau A, Tyson DR, Ornstein DK. Loss of annexin A1 disrupts normal prostate glandular structure by inducing autocrine IL-6 signaling. Carcinogenesis. 30(7):1082-8. 2009年 査読有

〔学会発表〕(計6件)

①柏木英志 ほか、PDE4B の低下は PKA pathway を活性化させ前立腺癌の進展に寄与する。第70回日本癌学会学術総会、2011年10月04日、名古屋国際会議場

② Kashiwagi E, et al. Prostaglandin receptor EP3 mediates growth inhibitory effect of aspirin through androgen receptor downregulation. 28th Korea-Japan Urological Congress, 2011.09.16, Suwon, Korea

③ Yokomizo A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 interacts with the androgen receptor (AR) and promotes prostate cancer cell growth by activating the AR. 106th Annual Meeting of the American Urological Association (AUA), 2011.05.15, Washington DC, USA

④Yokomizo A, et al. Statins reduce the androgen sensitivity and cell proliferation by decreasing the androgen receptor protein in prostate cancer cells. 26th Annual Congress of the European Association of Urology (EAU), 2011.03.21, Vienna, Austria

⑤猪口 淳一、内藤 誠二、前立腺がんとサイトカイン、第99回日本泌尿器科学会総会、2011年04月22日、名古屋国際会議場

⑥猪口 淳一、内藤 誠二、Loss of annexin A1 disrupts normal prostate glandular structure by inducing autocrine IL-6 signaling. 第3回 前立腺生物学シンポジウム 伊勢志摩2010、2010年6月18日、鳥羽国際ホテル

6. 研究組織

(1)研究代表者

猪口 淳一 (INOKUCHI JUNICHI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：1040392

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：