

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09409

研究課題名(和文) 新規前立腺癌モデルマウスを用いた細胞老化随伴分泌現象抑制による治療探索的研究

研究課題名(英文) Treatment research by the suppression of secretory phenomenon associated with cellular senescence in mouse prostate cancer model

研究代表者

井手 久満 (Ide, Hisamitsu)

順天堂大学・医学部・特任教授

研究者番号：00301383

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)：DNA脱メチル化酵素UTXを前立腺特異的にノックアウトしたマウスを用いて、脂肪負荷と老化によるSASPが前立腺癌細胞の悪化や去勢抵抗性獲得に関与しているのかを検証した前立腺でUtxを欠失したオスマウスでは、脂肪食によるストレスから前立腺癌の発癌がみられた。前立腺がんは8～9週後に発生し、前立腺癌の悪化度はGleason grade 3～4であった。老化マーカーとして老化関連酸性 β -Galを用いて免疫組織化学染色的に評価したところ、発癌に伴い β -Gal陽性細胞の増加がみられた。これらの研究結果から、Utx欠失マウスにおいて、SASPを介した癌の進展機構が推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モデルとして、前立腺特異的なUtx欠失マウスを作製し、前立腺でUtxを欠失したオスマウスでは、脂肪食によるストレスから前立腺癌の発癌がみられた。ヒストン・クロマチン修飾因子を標的とした前立腺癌モデルマウスはまったく新しい疾患モデルになると考えられ、SASPの解析とともに得られた結果は前立腺癌発症の分子機構に新たな知見をもたらす、新規治療法開発に役立つ可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Using a novel prostate cancer onset model in which the DNA demethylation enzyme UTX was specifically knocked out in the prostate, we investigated whether SASP (senescence-associated secretory phenotype) induced by fat loading and aging contributes to the malignancy and acquisition of castration resistance in prostate cancer cells. As a model, we created prostate-specific Utx-deficient mice. In male mice with prostate-specific Utx deletion, prostate cancer development was observed due to the stress from a high-fat diet. Prostate cancer occurred after 8-9 weeks, with a malignancy graded at Gleason grade 3-4. Using senescence-associated β -galactosidase (SA β -Gal) as an aging marker and evaluating through immunohistochemical staining, an increase in β -Gal positive cells was observed with cancer development. These research results suggest a mechanism of cancer progression mediated by SASP in Utx-deficient mice.

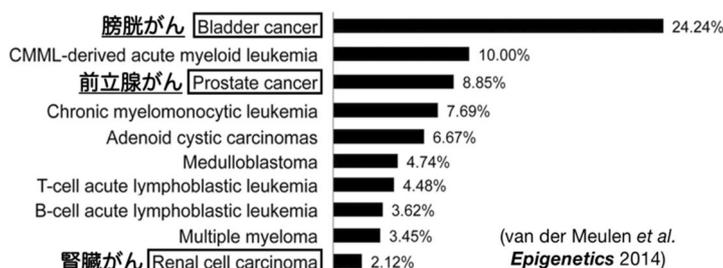
研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌

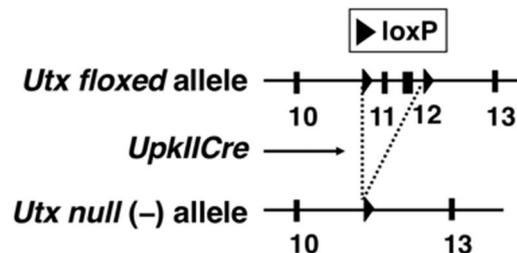
様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体を構成する細胞は加齢と共に「細胞老化」をおこす。細胞が老化する原因はあらゆるストレスであり、細胞老化がおこると細胞の増殖は不可逆的に停止する。がん遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化、酸化ストレスなどの発癌ストレスも細胞老化を引き起こす原因の一つである。また、癌化や老化を引き起こす様々なストレスは、細胞老化随伴分泌現象 (Senescence-associated secretory phenotype : SASP) を引き起こし、老化とともに発癌に関与する。一方、同じ日本人でもアメリカ移住者では前立腺癌の罹患率が高いことから、ライフスタイルと前立腺癌には密接な関係が示唆されており、そのなかで肥満は前立腺癌の強力なリスク因子である。肥満はインスリンや炎症性サイトカインを増加させ、アディポネクチンやテストステロンを減少させる。これらの変化は前立腺細胞の発癌や進展に関与すると考えられる。近年、UTX (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome) は様々なヒト悪性腫瘍で変異を認めることが報告されている (van Haften *et al.* Nat Genet 2009)。



同定された変異は全て機能欠失型変異であり、UTX は癌抑制遺伝子として機能していると考えられる。組織別の変異頻度解析では、UTX は、膀胱癌、前立腺癌、腎臓癌など泌尿器科系腫瘍で高頻度に変異を認めている (van der Meulen *et al.* Epigenetics 2014)。マウス *Utx* 遺伝子の exon 11-12 を loxP で挟んだコンディショナルノックアウト (cKO) マウスが作製されており、膀胱上皮特異的に Cre を発現する *UpkIIICre* マウスと掛け合わせ、膀胱上皮で *Utx* を欠失したマウスが作成されている。このマウスは単独では膀胱癌を発症しなかったが、膀胱癌において UTX と高頻度に変異を合併するがん抑制遺伝子 p53 のノックアウトヘテロマウスと掛け合わせると膀胱上皮内癌を発症し、さらにタバコ由来の変異源である BBN (N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine) の投与により、筋層浸潤癌へと進展することが明らかとなった。コントロールと *Utx* 欠失マウスの膀胱上皮を単離し、NGS を用いた網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、*Utx* 欠失により炎症性サイトカイン・ケモカインである IL-6 と CCL2 の発現が上昇しており、p53 機能不全による細胞周期亢進と BBN による更なる炎症亢進や他の遺伝子変異と協調して、最終的に筋層浸潤癌へと進行すると考えられた (Kobatake *et al.* Clin Cancer Res 2020)。これらの研究結果からは、*Utx* 欠失マウスにおいて、SASP を介した癌の進展機構が推察される。



2. 研究の目的

加齢とともに体内に蓄積した老化細胞は、さまざまな炎症性蛋白質を高発現して周囲に分泌する SASP を引き起こす。老化細胞では、DNA メチル化酵素やヒストンメチル化酵素の発現低下によってエピジェネティックな遺伝子発現抑制機構が破綻し、SASP 遺伝子の発現が誘導される。UTX はヒト悪性腫瘍で変異を認めることが報告されている。同定された変異はすべて機能欠失型変異であり、UTX は癌抑制遺伝子として機能していると考えられる。本研究では、新規前立腺癌発症モデルである DNA 脱メチル化酵素 UTX を前立腺特異的にノックアウトしたマウスを検証し、SASP が前立腺癌細胞の悪性化に関与しているのかを検討する。また、老化細胞の評価から、前立腺癌悪性評価のバイオマーカーとしての意義を検討し、臨床応用への可能性を探索する。

3. 研究の方法

前立腺癌モデルマウスは、*Utx* cKO マウスに、前立腺特異的に Cre を発現する *PbiCre* マウスを掛け合わせるにより作製されている。前立腺特異的な *Utx* 欠失マウスを用いた検体からの標本は、共同研究者である東京女子医科大学実験動物研究所、先端生命医学専攻・疾患モデル研究分野の本田浩章先生から供与された。細胞老化とは、強い DNA 損傷を被った細胞で生体防御機構として作動する不可逆的細胞増殖停止状態である。しかし、細胞老化を起こしても細胞の代謝自体は活発であり、長く生存し続ける場合がある。そのような老化細胞から多くの分泌タンパク

質が産生される現象が発見され、SASP と呼ばれている。老化細胞ではエピジェネティックな遺伝子発現抑制機構が破綻し、さまざまな SASP 遺伝子の発現が誘導される。老化細胞の病勢進行による変化は、老化マーカーとして老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼ (SA β -Gal) を用いて評価した。老化細胞の除去には、前立腺癌組織を構築できるシステムを応用する。この方法の利点は、前立腺癌細胞を移植したマウスにおいて、蛍光顕微鏡下に容易に観察でき、腫瘍の増大、浸潤の有無、ホルモン応答性を客観的に検討できる。具体的には、P16ink4a 発現細胞を除去できる INK ATTAC マウスの胎生 16 日目の胎児から尿生殖原基を採取し、強力な分化誘導能をもつ間葉系細胞を分離・培養する。生後 8 週以降の Utx 欠失マウス前立腺癌細胞を、コラーゲン中で間葉系細胞と混ぜ、SCID マウスの腎皮膜下に移植する。前立腺癌組織は腎皮膜下に再生され、これら前立腺癌細胞は GFP を発現させているために蛍光顕微鏡下に緑色蛍光を発する。移植された前立腺癌のホルモン感受性を検討するため、細胞が一定の増殖をみたうえで、除勢したマウスと除勢しないマウスで腫瘍の増殖・転移能に差を生じるか検討し、去勢抵抗性前立腺癌にいたる過程で発現する遺伝子を分子プロファイリングとアレイを用いて解析する。

4. 研究成果

UTX は、メチル化されたヒストン H3 の 27 番目のリジン残基 (H3K27me) を脱メチル化する酵素として同定された (Hong S et al., PNAS 2007)。マウス Utx 遺伝子の exon 11-12 を loxP で挟んだコンディショナルノックアウト (cKO) マウスが作製されている。本研究では、前立腺特異的な Utx 欠失マウスを作製し、前立腺で Utx を欠失したオスマウス (Utx^{-/-}, Uty⁺) では、脂肪食によるストレスから前立腺癌の発癌がみられた。前立腺がんは 8~9 週後に発生し、前立腺癌の悪性度は Gleason grade 3~4 であった。また、p53KO マウスとの掛け合わせにおいて、より発癌が促進された。老化マーカーとして老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼ (SA β -Gal) を用いて免疫組織化学染色的に評価したところ、発癌に伴い SA β -Gal 陽性細胞の増加がみられた。これらの研究結果から、Utx 欠失マウスにおいて、SASP を介した癌の進展機構が推察された。また、炎症性サイトカインである IL-1、IL-6、IFN-beta、ケモカインである CXCL10、IL8、細胞外マトリックス分解酵素である MMP1、増殖因子である GMCSF、PDGF などがあるが、これらの発現を同マウスの前立腺組織を用いて免疫組織化学染色、Western blotting 法にて評価したところ、それらのいくつかに発現上昇がみられた。ヒストン・クロマチン修飾因子を標的とした前立腺癌モデルマウスはまったく新しい疾患モデルになると考えられ、SASP の解析とともに得られた結果は前立腺癌発症の分子機構に新たな知見をもたらし、新規治療法開発に役立つ可能性が期待される。また、今後、本研究の知見を介して、前立腺発癌に関与する老化細胞の除去薬、senolytic 薬をスクリーニングし、前立腺癌の増殖や浸潤、悪性を抑制する新規治療戦略の立脚を目指す。本研究の試みはこれまで全く報告がなく、独創的であり臨床的意義が高いと考えられた。

文献

- 1) van Haafden G, Dalgliesh GL, Davies H, Chen L, Bignell G, Greenman C, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Teague J, Butler A, Hinton J, Latimer C, Andrews J, Barthorpe S, Beare D, Buck G, Campbell PJ, Cole J, Forbes S, Jia M, Jones D, Kok CY, Leroy C, Lin ML, McBride DJ, Maddison M, Maquire S, McLay K, Menzies A, Mironenko T, Mulderrig L, Mudie L, Pleasance E, Shepherd R, Smith R, Stebbings L, Stephens P, Tang G, Tarpey PS, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Collins VP, Ichimura K, Law S, Wong J, Yuen ST, Leung SY, Tonon G, DePinho RA, Tai YT, Anderson KC, Kahnoski RJ, Massie A, Khoo SK, Teh BT, Stratton MR, Futreal PA. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nature*. 2009;41:521-3.
- 2) Kobatake K, Ikeda KI, Nakata Y, Yamasaki N, Ueda T, Kanai A, Sentani K, Sera Y, Hayashi T, Koizumi M, Miyakawa Y, Inaba T, Sotomaru Y, Kaminuma O, Ichinohe T, Honda ZI, Yasui W, Horie S, Black PC, Matsubara A, Honda H. *Kdm6a* Deficiency Activates Inflammatory Pathways, Promotes M2 Macrophage Polarization, and Causes Bladder Cancer in Cooperation with *p53* Dysfunction. *Clin Cancer Res*. 2020; 26: 2065-79.
- 3) Hong S, Cho YW, Yu LR, Yu H, Veenstra TD, Ge K. Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 18439-44.

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