

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501319

研究課題名(和文) 前立腺がん腫瘍源細胞の形質維持における癌遺伝子相互作用の解明

研究課題名(英文) Role of oncogenic factors and their cooperations in survival of prostate tumor-propagating cells

研究代表者

馬島 哲夫 (Mashima, Tetsuo)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子生物治療研究部・研究員

研究者番号：30311228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺がんでは高い腫瘍形成能を有するがん幹細胞/腫瘍源細胞が存在し、再発や治療抵抗性に関与することが示唆されている。しかし腫瘍源細胞の生存維持機構の詳細は明らかでない。我々は遺伝子発現解析および機能スクリーニングによる統合的解析を進め、前立腺がん幹細胞生存因子PCSC-1(仮称)を見出した。PCSC-1の発現抑制は腫瘍源細胞を減少させ、腫瘍形成を著しく抑制した。臨床がんでの発現をみると、PCSC-1は前立腺がんで発現亢進していた。以上よりPCSC-1は前立腺がんのがん化と密接に関わり、腫瘍源細胞の生存に関与することがわかった。この新しい生存因子は、治療薬創製のための標的分子となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Prostate cancers could contain a subpopulation of cells, called cancer stem cells or tumor-propagating cells, which preferentially form a tumor and are involved in the disease recurrence or resistance to therapy. However, the molecular pathways required for survival of the tumor-propagating cells are not clear. Our gene expression profiling and functional RNAi screening identified PCSC1 (prostate cancer stem cell factor 1) as a survival factor of the tumor-propagating cells. PCSC1 knockdown preferentially eliminated the tumor-propagating cells, and suppressed in vivo tumor formation. In clinical samples, PCSC1 was overexpressed in prostate cancer. These data indicate that PCSC1 is closely related with prostate tumorigenesis and is involved in the tumor-propagating cell survival. The newly-identified survival factor could be a rational therapeutic target of prostate cancer.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：前立腺がん がん幹細胞 RNAiスクリーニング がん分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

前立腺がんは、欧米で男性のがんの主要な要因であるが、近年、日本でもその発生が急増しており、治療法の確立が急務である。前立腺がんに対する薬物療法としては、アンドロゲン受容体(AR)に依存した増殖経路を阻害する内分泌療法が中心となる。しかし治療にしがたい耐性がんが出現し、その後の治療は困難であるのが現状である。他方、がんの組織において、その細胞集団の中に、著しく高い腫瘍形成能を有する「腫瘍源細胞(がん幹細胞)」が存在することが近年明らかにされてきた。前立腺がんでも、そのような細胞の存在を示す報告が多数されており、これらの細胞ががんの再発に関わることも示唆されている。前立腺がんを形成する根源となる分画であるこの腫瘍源細胞は、がん抑制のための重要な標的であると考えられる。しかし、前立腺がん腫瘍源細胞の生存維持機構の詳細については明確でなかった。

2. 研究の目的

本研究では、前立腺がん腫瘍源細胞(がん幹細胞)の生存維持の分子機構を明らかにする。まず、癌化関連遺伝子や、腫瘍源細胞選択的な増殖抑制作用を示すシグナル伝達阻害化合物/RNAiを探索する。そのメカニズムの詳細を研究することにより、腫瘍源細胞の生存維持機構とこれに関与する新しい因子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 前立腺がん腫瘍源細胞分画の分離と性状解析

前立腺がん細胞株を用いて、前立腺がん細胞集団より腫瘍源細胞分離を試みた。前立腺がん腫瘍源細胞の分離手法として、マーカー

(CD44、CD133、CD151、CD166、TRA-1-60など)による選択や、非接着培養条件で細胞塊(sphere)を形成させる方法(sphere培養)による選択を試みた。得られた細胞について自己複製能や免疫不全マウスでの少数細胞からの造腫瘍性など腫瘍源細胞としての要件の検定をおこない、最もよい細胞分離法の検討を進めた。前立腺がん臨床サンプルについては、安定培養可能ながん細胞の取得をめざし、得られた細胞から腫瘍源細胞分画を選択することが可能かを検討した。

得られた前立腺がん腫瘍源細胞分画については、遺伝子発現解析を行い、前立腺がん腫瘍源細胞に特徴的な遺伝子発現を調べた。

(2) 前立腺がん腫瘍源細胞生存維持における癌関連遺伝子の発現の検討

遺伝子発現解析で得られたデータから、前立腺がん腫瘍源細胞に選択的に発現する遺伝子を抽出した。また臨床前立腺がんの発現解析データを分析し、がん選択的に発現亢進の見られる遺伝子群を同定した。これらにより、前立腺がんやとくにその中で腫瘍源細胞に選択的に発現する因子の絞り込みを行った。

(3) 前立腺腫瘍源細胞に選択的な増殖抑制を示す化合物、RNAiのスクリーニング

化合物ライブラリーおよびRNAiライブラリーを用いて、腫瘍源細胞選択的に細胞増殖抑制作用を示す薬剤、RNAiを探索した。具体的には、大部分が腫瘍源細胞以外であると考えられる前立腺がん細胞集団(通常培養系)および腫瘍源細胞分画(sphere培養系)の両者において、各種化合物ないしRNAiを添加し、腫瘍源細胞に選択的細胞増殖抑制を示すものをまず1次スクリーニングした。ついで、得られた陽性ヒットについては、腫瘍源細胞と考えられるマーカー陽性細胞の割合が、化合物やRNAi処理により低下するかを検討した。

(4) がん関連因子による前立腺腫瘍源細胞の生存維持の分子機構の解析

ここまでの解析から得られた結果をもとに、腫瘍源細胞の生存維持にとくに重要と考えられる因子にフォーカスを絞った。とくに、新規の因子やdruggableな因子(がんの治療標的として薬剤開発可能な因子)について解析を継続した。その因子が、腫瘍源細胞生存、維持および腫瘍源細胞からの腫瘍形成にどのようなメカニズムで関わっているかを検討した。またその因子の抑制が腫瘍増殖抑制を引き起こすかをnude mouseを用いた動物実験により調べた。さらに同因子の臨床がんにおける発現を検討した。

4. 研究成果

まず、前立腺がん細胞株を用いて、前立腺がん細胞集団より腫瘍源細胞の分離を試みた。前立腺がん幹細胞マーカーとして知られるCD44、CD133、CD151、CD166、TRA1-60等の発現をフローサイトメーターにより検討し、PC3、DU145細胞等で陽性分画があることを確認した。さらにセルソーティングにより陽性および陰性分画を分離し、陽性分画において、自己複製能の指標であるスフェア増殖能や免疫不全マウスでの少数細胞からの造腫瘍性を確認した。その結果、報告されている上記の細胞表面マーカーを指標に細胞分離するとマーカー陽性分画で、スフェア増殖能や腫瘍形成能が高いことが確認できた。中でも、CD151/CD166/TRA1-60陽性分画は陰性分画に比べて腫瘍形成能が顕著であり、またスフェア培養での陽性細胞の濃縮も明確であった。これらより、既報の論文に示す通り、CD151/CD166/TRA1-60陽性分画は、腫瘍源細胞分画と考えられた。また前立腺がん臨床サンプル4例について、安定培養可能ながん細胞の取得をめざした。しかし、得られた細胞は、3ヶ月ていどの継続培養が可能であったが、免疫不全マウスでの腫瘍形成能は確認できなかった。一方、前立腺がん臨床サンプルの初代培養細胞について、がん幹細胞マーカー発現を検討したところ、数%のCD151/CD166/TRA1-60陽性

分画があることがわかった。この割合は細胞株と同様であった。

腫瘍源細胞が濃縮されているスフェア培養細胞、および、非がん幹細胞が大部分を占めると考えられるもとのがん細胞の両者よりRNAを抽出し、遺伝子発現解析をおこない、両細胞集団間での遺伝子発現の差異を検討した。得られたデータから、前立腺がん腫瘍源細胞に選択的に発現する遺伝子を抽出した。また臨床前立腺がんの発現解析データを分析し、がん選択的に発現亢進の見られる遺伝子群を同定した。これらにより、前立腺がんやとくにその中で腫瘍源細胞に選択的に発現する因子の絞り込みを完了した。さらに、腫瘍源細胞の生存維持機構やこれに関与する因子を明らかにするため、スフェア細胞への選択毒性とマーカー陽性細胞率の低下の2つを指標として、ケミカルスクリーニングおよび包括的RNAiスクリーニングを実施した。この両解析によりヒット化合物およびRNAiを複数得た。

これらの遺伝子発現解析および機能スクリーニングの結果を用いた統合的解析を進め、前立腺がんのがん化に深く関わり、かつ、機能的に前立腺がんの3次元増殖および腫瘍源細胞の生存維持に関わる因子の抽出を進めた。これにより我々は、前立腺がん幹細胞生存因子PCSC-1(prostate cancer stem cell factor 1と仮称)を見出した。PCSC-1は、腫瘍源細胞マーカー陽性細胞で選択的に発現が高く、shRNAを用いたその発現抑制はマーカー陽性細胞を選択的に減少させた。またPCSC-1の発現を抑制すると、スフェア増殖が選択的に抑制され、ゼノグラフトでの腫瘍形成能を著しく低下した。臨床前立腺がんでの発現を組織マイクロアレイや、Oncomine databaseなどでみると、PCSC-1は特に前立腺がんで選択的発現を示し、正常組織と比べて比べても発現の顕著な亢進が認められた。以上より、PCSC-1は前立腺がんのがん化と密接に関わり、とくに、腫瘍源細胞の生存維持に関わることがわかった。我々はさらに、PCSC-1によ

る生存シグナルを明らかにするため、遺伝子発現解析とGene Ontology解析をすすめ、PCSC-1の機能と関連するトランスクリプトームを明らかにした。本研究で見出された前立腺がんの新しい生存因子は、治療薬創製のための新しい標的分子となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) Ushijima M*, Mashima T*, Tomida A*, Dan S, Saito S, Furuno A, Tsukahara S, Seimiya H, Yamori T, Matsuura M. Development of a gene expression database and related analysis programs for evaluation of anticancer compounds. *Cancer Sci* 104:360-8 (2013) (*Equal first authors) 査読あり

(2) Mashima T, Seimiya H. Role of acyl-CoA synthetases in glioma cell survival and its therapeutic implication. *Tumors of the Central Nervous System* 1: 337-340 (2011) 査読なし

(3) Mashima T, Okabe S, Seimiya H. Molecular pharmacological approach reveals potential new strategies to suppress androgen receptor signaling in prostate cancer. *Mol Cell Pharmacol* 3: 7-12 (2011) 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

(1) 馬島哲夫 遺伝子発現解析とRNAi探索による前立腺がん腫瘍源細胞生存因子の同定 第72回日本癌学会学術集会 平成25年10月3日 横浜

(2) 馬島哲夫 RNAiスクリーニングおよび遺伝子発現データを用いた統合的解析による前立腺がん幹細胞選択的生存因子の同定 第17回日本がん分子標的治療学会学術集会 平成25年6月12日 京都

(3) 馬島哲夫 前立腺がん幹細胞を標的とする化合物のスクリーニング 第71回日本癌学会学術集会 平成24年9月19日 札幌

(4) 馬島哲夫 前立腺がん幹細胞を標的とする薬剤の探索系構築と化合物スクリーニング 第16回日本がん分子標的治療学会学術集会 平成24年6月28日 北九州

(5) 馬島哲夫 前立腺がんの癌化および生存におけるTMPRSS2-ERG融合遺伝子の役割 第70回日本癌学会学術集会 平成23年10月3日 名古屋

(6) 馬島哲夫 前立腺がんの癌化および生存におけるTMPRSS2-ERG融合遺伝子産物の役割 第15回日本がん分子標的治療学会 平成23年6月22日 東京

〔図書〕(計1件)

右田敏郎、馬島哲夫、清宮啓之
がんと脂質代謝 実験医学 30: 2415-20 (2012)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究代表者 馬島 哲夫(MASHIMA, Tetsuo)
(公財)がん研 がん化療セ 分子生物治療
研究者番号: 30311228

(2)連携研究者 清宮 啓之(SEIMIYA, Hiroyuki)
(公財)がん研 がん化療セ 分子生物治療
研究者番号: 50280623

(3)連携研究者 湯浅 健(YUASA, Tateshi)
(公財)がん研 有明病院 泌尿器科
研究者番号: 00314162

(4)連携研究者 右田 敏郎(MIGITA, Toshiro)
(公財)がん研 がん化療セ 分子生物治療
研究者番号: 20462236