

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592397

研究課題名(和文) Vav3 遺伝子を治療標的としたホルモン抵抗性前立腺癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutics targeting the Vav3 oncogene for castration-resistant prostate cancer

研究代表者

野村 威雄 (NOMURA, TAKEO)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40347034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素培養前立腺癌に対する低酸素誘導遺伝子Vav3ノックダウンによるドセタキセル(DTX)作用増強効果を解析した。siRNAによるVav3ノックダウンによりAkt、ERKリン酸化抑制を認め、さらにARリン酸化抑制によってDTX誘導アポトーシス効果は増強した。DTXによるBcl2リン酸化亢進に加えVav3ノックダウンによるBad脱リン酸化がアポトーシス誘導効果を増強した。動物モデルにおいてもDTX投与による抗腫瘍効果はsi-Vav3/アテロコラーゲン複合体を腫瘍内注入により増強された。以上の結果からVav3遺伝子は去勢抵抗性前立腺癌の治療標的となりDTX治療効果を増強する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined Vav3 siRNA effects on cell proliferation and apoptosis in docetaxel-treated LNCaP cells under chronic hypoxia (LNCaPH). Interrupting Vav3 signaling using siRNA enhanced docetaxel-induced cell growth suppression compared with that induced by docetaxel alone by inhibition of Akt and ERK phosphorylation, resulting in AR phosphorylation inhibition. In addition to increased Bcl-2 phosphorylation through JNK signaling in response to docetaxel, si-Vav3 enhanced docetaxel-induced apoptosis through Bad dephosphorylation. Xenograft tumor growth was inhibited by si-Vav3/atelocollagen complex injection and combined use of si-Vav3 and docetaxel produced a greater effect than docetaxel alone.

Interrupting Vav3 signaling enhances docetaxel-induced apoptosis in LNCaP cells under chronic hypoxia by inhibiting the PI3K/Akt, ERK, and AR signaling pathways. Therapy targeting Vav3 in combination with docetaxel may have practical implications for managing castration-resistant prostate cancer.

研究分野：前立腺癌治療

キーワード：去勢抵抗性 低酸素 Vav3 アポトーシス アンドロゲン受容体

1. 研究開始当初の背景

アンドロゲン依存性前立腺癌は、アンドロゲン除去により制御されうるが、その奏功期間は病期や細胞分化度により不定である。転移性前立腺癌をはじめとする進行性前立腺癌ではアンドロゲン除去による制癌期間は短期であり、再燃して去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer; CRPC) となり、予後不良である。TAX327 試験および SWOG99-16 試験においてドセタキセルによる CRPC 症例における有意な生存期間の延長が示されたが、その後他の薬剤とのドセタキセル併用療法などが基礎及び臨床応用されているにもかかわらず、これまでの報告を上回る結果は報告されていない。最近の基礎研究の結果から、CRPC においてもアンドロゲン受容体 (AR) を介した細胞増殖が認められ、AR シグナルを抑制することによる治療戦略が追求されている。また前立腺癌をはじめとする固形癌では腫瘍内部で低酸素環境が発生することで、アポトーシスが誘導されるが、一方で低酸素環境が長期間持続することによって種々の癌遺伝子が誘導され、前立腺癌においてはホルモン抵抗性獲得の一因とも考えられている。

われわれはこれまでに6ヶ月間以上低酸素環境下で継代培養した長期低酸素培養前立腺癌細胞 (LNCaP/CH) を樹立し、LNCaP/CH 細胞がホルモン抵抗性を獲得することを報告した。さらに同細胞における cDNA マイクロアレイにより、高発現 (2 倍以上) する遺伝子を網羅的に解析し、候補遺伝子群を遊走・浸潤、抗癌剤抵抗性、ホルモン抵抗性、低酸素環境に関連する遺伝子に限定し pathway 解析したところ、Vav3 遺伝子が候補遺伝子として同定された。Vav3 遺伝子は Vav ファミリー (Vav1、Vav2、Vav3) に属し、低分子量 G 蛋白質 Rho 変換因子として機能する (Mol Cell Biol, 26: 4830-42, 2006)。Rho は細胞の細胞外基質や血管内皮への接着を制御する分子で、癌細胞が組織内を遊走し、細胞間隙を通過する際に活性化型 (GTP 結合型) に変化するとされている。LNCaP/CH 細胞はホルモン抵抗性を獲得することに加えて、LNCaP 細胞と比較して、細胞増殖能、遊走・浸潤能が亢進しており、同時に Vav3 発現が約 6 倍増加していた。Vav3 はホルモン抵抗性前立腺癌細胞において過剰発現していることが培養

細胞および前立腺癌組織標本において報告されているが (Cancer Res, 68: 6396-406, 2008)、AR 活性化との関連性や細胞内シグナル伝達系は十分に解明されていない。われわれはすでに Vav3 発現ベクターを作成し、LNCaP 細胞に恒常的に遺伝子導入した Vav3 安定高発現細胞株 (LNCaP/Vav3) を樹立したところ、LNCaP/CH 細胞と同様にホルモン抵抗性を獲得し、さらには細胞増殖能および遊走・浸潤能が亢進することを見出した。また siRNA を用いて Vav3 発現をノックダウンさせたところホルモン感受性の回復、細胞増殖能および遊走・浸潤能の低下、さらにはアポトーシスによる細胞死を認め、Vav3 遺伝子がホルモン感受性や悪性形質を制御しており、新たな治療標的になる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究においては、CRPC モデルのひとつである長期低酸素培養前立腺癌細胞 (LNCaP/CH) における Vav3 遺伝子の機能解析および悪性化 (増殖・浸潤能) 獲得の分子細胞学的メカニズムを AR 活性化に関与する PI3K/Akt および MAPK シグナル伝達系とクロストークすると考えられる上皮間葉系変化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) を中心に解析し、動物モデルにおいてその転移能および致死性を評価する。また Vav3 遺伝子を治療標的とした CRPC 治療法を確立するために、Vav3 遺伝子ノックダウンによる治療効果について検討する。さらには現在広く使用されているドセタキセルとの併用効果についても検討したい。

3. 研究の方法

(1) われわれはすでに6ヶ月間以上低酸素環境下で継代培養した長期低酸素培養前立腺癌細胞 (LNCaP/CH) を樹立し、Vav3 遺伝子高発現が誘導され、ホルモン抵抗性を獲得するとともに細胞増殖能、遊走・浸潤能が亢進することを報告した。さらに Vav3 cDNA を遺伝子導入した Vav3 安定高発現前立腺癌細胞株 (LNCaP/Vav3) を樹立したところ、LNCaP/CH 細胞と同様にホルモン抵抗性を獲得することに加え、細胞増殖能、遊走・浸潤能が亢進することから、Vav3 遺伝子が上述した悪性形質獲得に影響することが示唆された。LNCaP/CH 細胞の高遊走・浸潤能は

EMT に由来する可能性があり、まず EMT 関連分子のうち E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 遺伝子を real-time PCR 法あるいは Northern blot 法、さらに蛋白発現量を免疫プロット法にて解析し定量する。次に EMT 関連分子の転写因子として知られる Snail の発現を遺伝子および蛋白レベルで解析する。Snail はシャトル蛋白であり、LNCaP 細胞と LNCaP/CH 細胞での細胞内局在の変化について蛍光標識 2 次抗体を用いた免疫染色法で評価する。最近、胚細胞において Snail 活性化に Stat3-LIV1 シグナル伝達系の関与が報告されており(Nature, 429: 298-302, 2004)、前立腺癌細胞で認められる EMT にも同様のシグナル伝達系が存在する可能性がある。そこで、LNCaP/CH 細胞における Stat3 活性化状態についてリン酸化 Stat3 抗体を用いた免疫プロット法で解析する。同時に LIV1 発現を解析するが、現在のところ特異性の高い抗 LIV1 抗体は知られておらず、本研究では遺伝子レベルの発現を real-time PCR 法にて解析する。LNCaP/CH 細胞での Stat3-LIV1-Snail 系活性化を JAK 阻害剤 (AG490)および dominant negative Stat3(dnStat3)強制発現系を用いて解析したのち、さらに Vav3 が Stat3-LIV1-Snail シグナル伝達系の上流でシグナル伝達を制御していることを解析するために、LNCaP 細胞において Vav3 遺伝子を siRNA によりノックダウンし、Vav3-Stat3-LIV1-Snail 系の活性化状態をそれぞれ遺伝子および蛋白発現量さらにリン酸化抗体を用いた免疫プロット法にて解析する。また Stat3 は PI3K/Akt および MAPK シグナルを活性化し、さらには AR 活性化を促進する可能性があり、LNCaP 細胞および LNCaP/CH 細胞での PI3K/Akt および MAPK シグナル活性化についてリン酸化抗体を用いて検討し、PI3K/Akt および MAPK 阻害剤を使用することで、いずれのシグナル伝達系が細胞増殖に関係するか解析する。同時に Vav3 ノックダウンによって Stat3- PI3K/Akt,MAPK-AR が Vav3 遺伝子による制御を受けているか解析する。(2)in vitro において高増殖・高遊走-浸潤能を有することが証明された LNCaP/CH 細胞の転移能および致死性を in vivo にて検討する。すでに樹立した Luciferase cDNA を遺伝子導入した LNCaP -Luc 細胞あるいは

LNCaP/CH -Luc 細胞をヌードマウスにそれぞれ 5×10^5 個心臓内注入し、経時的に全身転移巣の出現および生存率を検討する。全身転移巣の検出は CCD カメラで real-time bioluminescence image として経時的に解析定量する。骨転移巣は X 線にて評価し、死亡した時点で解剖し多臓器転移巣を評価する。切除した転移組織を用いて EMT 関連分子 (E-cadherin、N-cadherin、Vimentin) および Snail を免疫染色し、その発現様式を投与した培養細胞と比較する。

次に CRPC に対する新たな治療法を確立するために、LNCaP/CH 細胞のドセタキセル感受性およびアポトーシス誘導効果が、Vav3 siRNA 処理した際に増強されるか分子細胞学的に解析する。LNCaP 細胞に対する Vav3 siRNA 処理はアポトーシス誘導効果があるため、Vav3 高発現している LNCaP/CH 細胞においても同様にアポトーシスを誘導する可能性がある。しかし LNCaP/CH 細胞では Vav3 発現が亢進しているため、ノックダウン効率によってはアポトーシス誘導効果が低下する可能性がある。そこで臨床応用を考慮して CRPC の標準治療薬であるドセタキセルとの併用効果について検討する。LNCaP/CH 細胞に Vav3 siRNA を遺伝子導入した 24 時間後にドセタキセル投与開始し、併用効果についてドセタキセル濃度および経時的に WST-1 法による細胞増殖速度、さらには FACS による sub G1 細胞数によるアポトーシス細胞定量化を行う。アポトーシスに関しては Caspase 活性に加え、caspase-3,8,9、PARP について免疫プロット法にて解析し、ドセタキセル+Vav3 ノックダウンによるアポトーシス誘導効果がミトコンドリア系あるいは death receptor 系の活性化に由来するものか検討する。ドセタキセルは Bcl-2 リン酸化を促進しアポトーシスを誘導することが知られているが、Bcl-2 リン酸化を制御する JNK 活性化についてもリン酸化抗体を使用した免疫プロット法にて解析する。さらにドセタキセル+Vav3 ノックダウンによる Vav3-PI3K/Akt,MAPK-AR シグナル伝達系と Vav3-Stat3-LIV1-Snail シグナル伝達系の活性化状態をリン酸化抗体を使用した免疫プロット法にて解析する。LNCaP/CH 細胞における AR 活性は PSA-Luc reporter プラスミドを遺伝子導入し luciferase 活性を測定

する。

(3) LNCaP/CH 細胞に対する Vav3 ノックダウンによるドセタキセル作用増強効果を動物モデルにおいて解析する。LNCaP/CH-Luc 細胞をヌードマウスに皮下移植し、移植後 14 日後からドセタキセル 10mg/kg、1 回/週、経腹腔投与および Vav3 siRNA-アテロコラーゲン複合体 1 回/週、腫瘍内投与(ドセタキセル+siRNA 治療群)し、腫瘍径および luciferase 発光強度の変化を in vivo イメージングシステム (IVIS Imaging System, Xenogen 社)で計量し、ドセタキセル単独投与群、Vav3 siRNA 単独治療群と比較する。同時に体重変化も測定し、有害事象の発生を監視する。移植後 60 日目に腫瘍を採取し、TUNEL 法に加え Ki67、Bcl-2、pAR による免疫染色を施行し、腫瘍増殖およびアポトーシスを定量する。さらには EMT 関連分子による免疫染色により上皮間葉系変化についても評価する。

4. 研究成果

(1) LNCaP/CH 細胞の高遊走-浸潤能は EMT に由来する可能性があるため、まず EMT 関連分子のうち E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 遺伝子を real-time PCR 法さらに蛋白発現量を免疫プロット法にて解析し定量した。LNCaP/CH 細胞において遺伝子および蛋白レベルでの E-cadherin 発現低下、N-cadherin および Vimentin 発現亢進を認めた。次に EMT 関連分子の転写因子として知られる Snail の発現を遺伝子および蛋白レベルで解析した。Snail 発現は LNCaP 細胞および LNCaP/CH 細胞とも同程度であったが、細胞質分画と核分画における発現量を定量する必要がある。Snail は転写因子として作用するシャトル蛋白であり、細胞内局在を免疫染色法で評価した。LNCaP/CH 細胞において Snail の核移行が著明であり、EMT に関与する可能性が示唆された。LNCaP/CH 細胞において Stat3 リン酸化の亢進を認め、前立腺癌細胞において Stat3-LIV1-Snail シグナル伝達系活性化が EMT に関与する可能性が示唆された。LIV1 遺伝子発現も LNCaP/CH 細胞において亢進しており、Stat3-LIV1-Snail シグナル伝達系活性化を支持する結果が得られた。

(2) 高増殖・高遊走-浸潤能を有する

LNCaP/CH 細胞の転移能および致死性を in vivo にて検討した。Luciferase cDNA を遺伝子導入した LNCaP -Luc 細胞あるいは LNCaP/CH -Luc 細胞をヌードマウスにそれぞれ 5×10^5 個心臓内注入し、経時的に全身転移巣の出現および生存率を検討した。全身転移巣の検出は CCD カメラで経時的に解析定量し、また骨転移巣は X 線にて評価し、死亡した時点で解剖し多臓器転移巣を検索した。さらに切除した転移組織における EMT 関連分子(E-cadherin、N-cadherin、Vimentin) および Snail を免疫染色し、その発現様式を投与した培養細胞と比較した。

LNCaP/CH -Luc 細胞群ではコントロール群と比較して骨転移巣出現率が高く、また有意な生存率の低下を認めた。X 線解析では骨転移巣は両群とも造骨性変化が強く、Vav3 高発現による影響は認めなかった。剖検結果は、LNCaP/CH -Luc 細胞群においてコントロール群と比較して多臓器転移(肝臓、肺、皮下)を有意に多く認めた。骨転移巣における免疫染色の結果は LNCaP/CH -Luc 細胞群において E-cadherin 発現低下、N-cadherin 発現亢進、Vimentin 発現亢進および Snail 発現亢進を認め、その発現様式は培養細胞に類似していた。しかしコントロール群においても同様の傾向があり、さらなる検討が必要である。

次に LNCaP/CH 細胞のドセタキセル感受性およびアポトーシス誘導効果が、Vav3 siRNA 処理した際に増強されるか解析した。LNCaP/CH 細胞に Vav3 siRNA を遺伝子導入した 24 時間後にドセタキセル投与開始し、併用効果についてドセタキセル濃度および経時的に細胞増殖速度、さらには Facs によるアポトーシス細胞定量化を行った。さらに Caspase 活性に加え、Caspase-3,8,9、PARP について免疫プロット法にて解析した。

LNCaP/CH 細胞では Vav3 siRNA による Vav3 ノックダウンによりドセタキセル感受性亢進を認め、さらにはアポトーシス誘導効果(sub G1 数、TUNEL 染色および Caspase 活性、Caspase3,9 分断化、PARP 分断化)の増強を認めた。一方、Caspase-8 の変化は認めなかった。

(3) LNCaP/CH 細胞に対する低酸素誘導腫瘍遺伝子 Vav3 ノックダウンによるドセタキセル(DTX)作用増強効果を動物モデルにお

いて解析した。LNCaP/CH-Luc 細胞をヌードマウスに皮下移植し、移植後 21 日後から DTX10mg/kg、1 回/週、経腹腔投与および Vav3 siRNA-アテロコラーゲン複合体 1 回/週、腫瘍内投与した。腫瘍径および luciferase 発光強度の変化を in vivo イメージングシステムで計量し、無治療コントロール群、Vav3 siRNA 単独治療群、DTX 単独治療群、DTX+siRNA 治療群において比較した。同時に体重変化を測定し、有害事象の発生を検討した。まず予備実験により Vav3 siRNA-アテロコラーゲン複合体の投与量を 2.5 μ g に決定した。Vav3 siRNA 単独治療群は無治療群と比較して有意に腫瘍増大速度の低下を認められたが腫瘍縮小効果はなかった。DTX 単独治療群および DTX+siRNA 治療群では移植後 42 日目から腫瘍縮小効果が現れ、また DTX+siRNA 治療群において DTX 単独治療群と比較して有意に腫瘍径の縮小を認めた。luciferase 発光強度に関しても概ね腫瘍径の変化と同様であったが、腫瘍内部壊死による発光強度の減弱を認めた。移植後 70 日目に腫瘍を採取し、TUNEL 法に加え Ki67、Bcl-2、pAR、Vav3 による免疫染色を施行し、腫瘍増殖およびアポトーシスを定量化した。siRNA 治療群では pAR 発現量が低下しており、DTX 治療によるアポトーシス誘導効果 (TUNEL 陽性増加、Bcl-2 発現低下、Ki-67 index 増加) に加え AR を不活化することによる細胞死の誘導を認めた。

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 件)

Hirai K, Nomura T, Yamasaki M, Inoue T, Narimastu T, Nakada C, Tsukamoto Y, Matsuura K, Sato F, Moriyama M, Mimata H. The Vav3 oncogene enhances the malignant potential of prostate cancer cells under chronic hypoxia.

Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations : 査読有

32, 2014, 101-109

DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2012.09.05>

Nomura T, Yamasaki M, Hirai K, Inoue T,

Sato R, Matsuura K, Moriyama M, Sato F, Mimata H. Targeting the Vav3 oncogene enhances docetaxel-induced apoptosis through the inhibition of androgen receptor phosphorylation in LNCaP prostate cancer cells under chronic hypoxia. Mol Cancer : 査読の有, Apr 8;12(1), 2013, 27DOI:10.1186/1476-4598-12-27

野村威雄、山崎六志、三股浩光。

長期低酸素環境下前立腺癌細胞増殖機構解明と新治療法

日本臨床：査読なし

72 巻, 2014, 2136-2140

掲載論文の DOI(デジタルオブジェクト識別子): なし

[学会発表](計 1 件)

Nomura T, Yamasaki M, Hirai K, Inoue T, Sato R, Sato F, Mimata H

Targeting the Vav3 oncogene enhances docetaxel-induced apoptosis through the inhibition of androgen receptor phosphorylation in LNCaP prostate cancer cells under chronic hypoxia in vitro and in vivo

アメリカ泌尿器科学会総会

2014 年 5 月 16 日~21 日

Orlando, アメリカ合衆国

Orange County Convention Center

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

野村 威雄 (NOMURA, Takeo)
大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40347034

(2)研究分担者

三股 浩光 (MIMATA, Hiromitsu)
大分大学・医学部・教授

研究者番号：60219714

(3)連携研究者

()

研究者番号：