

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670687

研究課題名(和文) MRTF分子による細胞骨格制御シグナルを標的とした前立腺癌転移抑制法の探求

研究課題名(英文) The investigation of the prostate cancer metastases inhibition method which targets the MRTF mediated signal pathway to cytoskeletal dynamics

研究代表者

三木 恒治 (MIKI, Tsuneharu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10243239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： MRTF-A分子はアクチン細胞骨格を束ねる分子の発現を上昇させることで、癌細胞の運動を抑制する働きをもつ。前立腺癌細胞株でMRTF-AのプロモーターアッセイならびにsiRNAで検討したところ、MRTF-A分子と癌抑制遺伝子p53の関連が示唆された。

アデノ・レトロ両ウイルスベクターを構築し、前立腺癌細胞株にMRTF-Aを強制発現させたところ有意に癌細胞の浸潤は抑制された。このベクターを用いてマウス生体内での癌転移抑制効果について現在検証中である。

研究成果の概要(英文)： We identified that MRTF-A inhibits cancer cell motility by upregulating the various kinds of actin binding proteins in vitro. It was indicated that MRTF-A might be related with tumor-suppressor gene p53 according to the data of MRTF-A promoter assay and knockdown of p53 gene using siRNA in prostate cancer cells. We made adenovirus and retrovirus vectors which overexpress MRTF-A towards prostate cancer cells. Overexpression of MRTF-A in prostate cancer cells reduced cancer cell invasion in culture. Analysis of the effect for tumor cell metastasis in vivo in a mouse model of prostate cancer using these vectors is currently in progress.

研究分野：臨床腫瘍学、癌転移

キーワード：MRTF-A分子 前立腺癌治療 細胞骨格 癌転移抑制

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は近年もっとも増加している癌の一つである。患者死亡の原因の多くは癌の転移によるものであるが、現在の抗がん剤のほとんどは癌の増殖抑制をターゲットとしており、転移そのものを積極的に抑制するような治療薬は未だ開発されておらず、癌転移の分子機構の解明とそれを標的とした治療法の開発が強く求められている。

我々は MRTF 分子がアクチン細胞骨格を束ねる Caldesmon(CaD)や Tropomyosin (TM)の発現を上昇させ、細胞運動を低下させることを研究していた実績と、MRTF の抗体を自ら作成し、免疫組織染色を世界に先駆け成功させた実績を学術的背景とし、前立腺癌細胞株においても MRTF が細胞骨格制御と細胞運動に重要な因子として働いていることを発見した。そこで前立腺癌において、MRTF の転写を制御するシグナル経路の解明と、実際に生体内で MRTF 分子が癌浸潤、転移抑制効果を発揮することを明らかにするため、この研究を立ち上げた。MRTF のタンパク量や活性を上昇させるような技術の開発は、前立腺癌転移を防ぎ、死亡率を著しく低下させるような画期的治療法につながるものと期待される。

2. 研究の目的

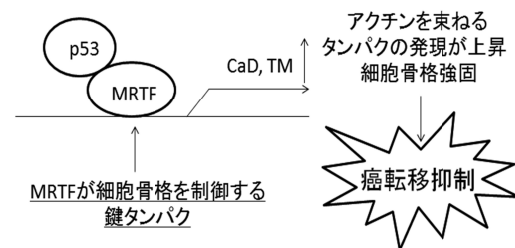
前立腺癌における MRTF 分子を介する細胞骨格制御シグナル経路の解明と、マウスを用いた MRTF 分子の癌浸潤・転移抑制効果の検討を基礎研究として、将来的に MRTF を分子標的とした新しい癌転移抑制治療法の開発に結び付けることが研究の目的である。

3. 研究の方法

以下の模式図が想定される MRTF を介した前立腺癌転移抑制の分子機構である。癌抑制遺伝子である p53 が MRTF 分子の上流に

位置する制御タンパクの一つで、MRTF の転写活性は上昇すると、その下流の CaD や TM などのアクチンを束ねるタンパクの発現が上昇し、細胞骨格が強固となり、細胞運動、浸潤、転移が抑制されるという概念である。我々は MRTF ファミリーの中でも特に培養細胞の運動能を低下させる効果がみられた MRTF-A 分子に注目した。

想定される前立腺癌転移抑制の分子機構



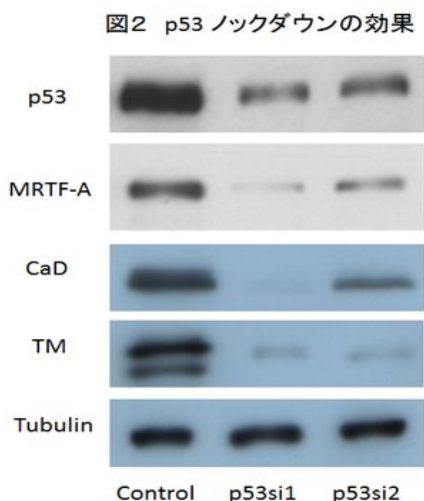
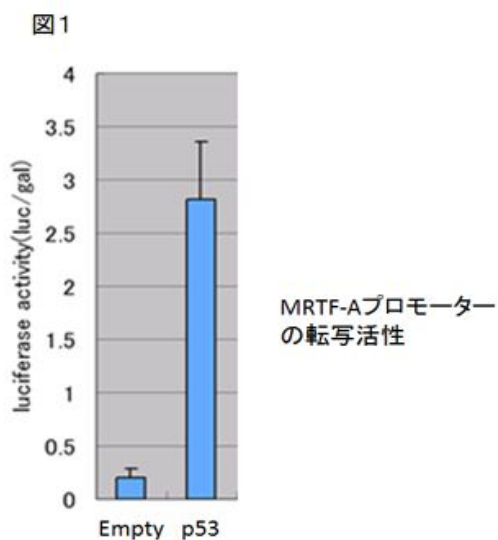
具体的な方法として以下の実験を行った。

- (1) 前立腺癌細胞株 LNCaP において MRTF-A の p53 によるプロモーターアッセイを行い、p53 が MRTF-A の転写活性を上昇させることを証明する。p53 を過剰発現させた時と siRNA で発現低下させた時で MRTF-A の発現上昇・低下とその下流の CaD、TM の発現上昇・低下をそれぞれ確認する。
- (2) 癌浸潤抑制効果の検証と、マウスを用いた生体内における癌転移抑制効果確認実験のため、MRTF-A 分子を運ぶアデノ・レトロの各ベクターを構築する。
- (3) LNCaP, DU145, PC-3 の 3 種の前立腺癌細胞株に MRTF-A と空ベクターを強制発現させ、癌細胞の浸潤能の差を比較する。
- (4) MRTF-A を発現するレトロウイルスベクターをマウスの心腔内に投与し、転移巣の形成の差を比較する。

4. 研究成果

- (1) MRTF-A の p53 によるプロモーターアッセイの実験では p53 による MRTF-A の転写活性の上昇がみられた(図 1)。p53 をア

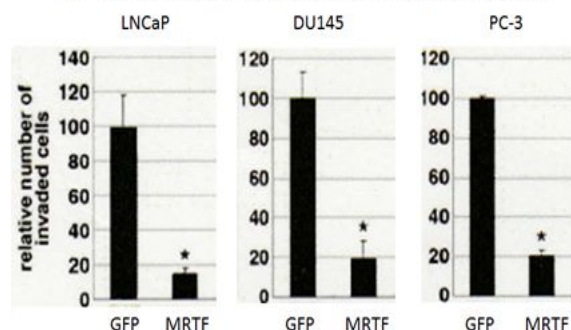
デノウイルスを用いて前立腺癌細胞株 LNCaP に過剰発現させたところ、ウエスタンブロット法で MRTF-A 蛋白と CaD, TM 蛋白の上昇がみられた。逆に p53 の siRNA を用いて p53 をノックダウンさせたところ、MRTF-A 蛋白と CaD, TM 蛋白の発現低下がみられた(図2)。これらの結果は p53 分子が MRTF-A 分子の上流に位置する制御分子の一つではないかということを示唆した。



(2) 次に MRTF-A 分子を運ぶレトロウイルスベクターの構築を行った。初期に作成したレトロウイルスベクターは感染効率が悪く、CaD、TM の発現上昇が十分に得られず、

浸潤を抑制させる効果が得られにくかった。そこで感染効率を重視し、まずはアデノウイルスベクターを構築し、MRTF-A を強制発現し、浸潤能を比較したところ、CaD, TM もしっかりと発現上昇し、浸潤を抑制するデータが得られた(図3)。この基礎データを元に、もう一度レトロウイルスベクターを再構築し直したところ、満足する発現効率が得られる状況となった。マウスの心腔内へのベクター投与の準備が整い、現在生体内での転移抑制効果を検討できる段階となったところである。

図3 前立腺癌細胞株に対するMRTF-A分子の癌浸潤抑制効果



5. 主な発表論文等

当研究の研究成果は現在データ蓄積中のため論文、学会発表はまだ行っていない。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

特記すべきことなし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 恒治 (MIKI Tsuneharu)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：10243239

(2) 研究分担者

木村 泰典 (KIMURA Yasunori)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：平成 25 年 6 月 退職により
資格喪失

鴨井 和実 (KAMOI Kazumi)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：40295663

上田 崇 (UEDA Takashi)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：50601598

(3) 連携研究者

該当無し