

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861407

研究課題名(和文) Phgae display法を利用した前立腺癌神経周囲浸潤の責任分子の同定

研究課題名(英文) Identification of perineural invasion related molecule in prostate cancer using phage display screening

研究代表者

岡本 亜希子 (Okamoto, Akiko)

弘前大学・医学研究科・研究員

研究者番号：60436037

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)：前立腺癌の進展過程において神経周囲浸潤(PNI)は、重要なメカニズムであるが、その分子機構は不明である。本研究では、PNIに関する前立腺癌細胞側の責任分子としてインテグリン α 6とラミニン結合糖鎖(LNBG)をファージディスプレイスクリーニングと種々の分子生物学的実験を用いて同定した。前立腺癌細胞は、神経周膜細胞が分泌するStromal derived Factor-1により、その遊走能が亢進し、インテグリン α 6を介して神経周膜細胞に接着するがLNBGの発現が亢進した細胞では、浸潤能が低く、前立腺癌細胞上のインテグリン α 6の発現亢進とLNBGの合成減少が神経周囲浸潤に重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Perineural invasion (PNI) is important mechanism for extra-capsular extension of prostate cancer (PC). In this study, we identified integrin α 6 and laminin binding glycan (LNBG) on α -dystroglycan were important molecules for PNI of PC by using phage display screening and several molecular cell biologic analysis.

We found that LNBG expressing PC cells without expression of integrin α 6 inhibited perineural invasion capacity, functioning as a tumor suppressor. Both LNBG depletion and up-regulation of integrin α 6 of PC cells and activation of SDF-1-CXCR4 signaling required by enhancement of perineural invasion capacity of PC cells.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：神経周囲浸潤

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は神経に沿って進展して被膜外浸潤すると考えられており、PNIは前立腺癌の播種に関して一般的で最も重要なメカニズムである。(Villers et al. J Urol. 149:793-8,1993.) また、前立腺癌細胞は神経細胞と接着することによってアポトーシスが抑制され、増殖が促進することが明らかになっている(Alaya GE et al. Cancer Res. 64:6082-90,2004.)。

2. 研究の目的

前立腺癌細胞と神経細胞の接着は前立腺癌進展の gate way と考えられているが、その分子機構は解明されていない。PSAによる前立腺癌のスクリーニングが一般化し、より早期の前立腺癌が発見され、治療の対象になっている現状では、前立腺癌をコントロールする上で局所進展・局所再発の key event である PNI の分子メカニズムを解明することは臨床的にも大きな意義がある。そこで PNI に関与する責任分子を同定し、PNI の分子機構について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まず最初に Phage display 法により前立腺癌細胞、神経細胞におけるリガンドとレセプターの検索を行った。同定されたリガンドあるいは、レセプターの前立腺癌における発現を調査し、責任分子の過剰発現、ノックダウン細胞あるいは、抗体を調製し、前立腺癌細胞の神経周膜細胞が分泌するケモカインに対する遊走能および神経周膜細胞の積層モデルに対する浸潤能の影響を検討する。さらに、前立腺全摘標本を用いた免疫組織化学的検討によって上記責任分子の局在と PNI に関する臨床的意義を明らかにする。

4. 研究成果

Phage display 法により前立腺癌細胞、神経細胞、神経周膜細胞におけるリガンドとレセプターの検索を行った。本実験では、神経周囲の細胞として、ヒト神経周膜細胞 (human perineural cell, HPNC) を用いた。前立腺癌細胞の cDNA ライブラリー導入ファージライブラリーと神経細胞および HPNC 細胞を用いたスクリーニングから、神経細胞および HPNC 細胞に結合する前立腺癌細胞の候補因子としてインテグリン $\alpha 6$ が同定された (図 1)。

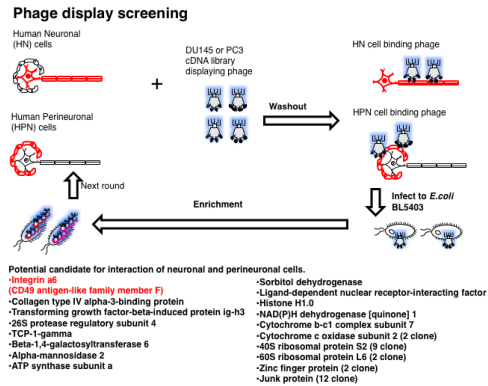


図 1. Phage display 法による前立腺癌細胞と神経細胞あるいは神経周膜細胞接着に関与する分子のスクリーニング

前立腺癌細胞の神経細胞、神経周膜膜への接着候補分子としてインテグリン $\alpha 6$ を始めとして 18 種類のタンパク質をコードする cDNA 配列が同定された。

インテグリン $\alpha 6$ の主要なリガンドは、神経や神経周膜細胞上に豊富に存在するラミニンであるため、インテグリン $\alpha 6$ が HPNC 細胞表面のラミニンと接着していると考えられた。このことから前立腺癌細胞に発現する代表的なラミニンレセプターとしてインテグリン $\alpha 6$ と α -ジストログリカンのラミニン結合糖鎖 (Laminin binding glycan: LNBG) の発現を神経周囲浸潤している前立腺全摘組織 (97 例) の免疫染色 (図 2) によって調べた。

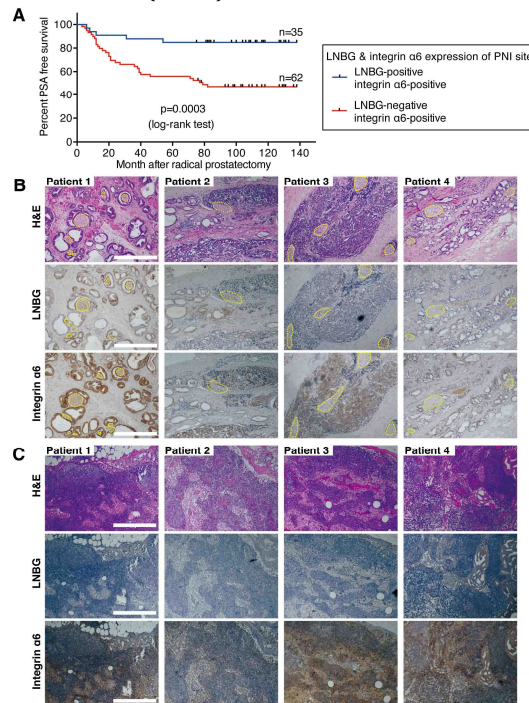


図 2. 神経周囲浸潤部位におけるインテグリン $\alpha 6$ と α -ジストログリカンのラミニン結合糖鎖 (Laminin binding glycan: LNBG) の免疫染色と PSA 再発との関連

A. カプランマイヤー曲線による神経周囲浸潤部位におけるラミニンレセプターの発現と

PSA 再発の関連。B. 神経周囲浸潤部位におけるラミニンレセプターの発現。C. リンパ節部位におけるラミニンレセプターの発現。

その結果、神経周囲浸潤部位における LNBG 陰性かつインテグリン $\alpha 6$ 陽性腫瘍の存在は、前立腺癌の生化学的再発の独立した危険因子であり、リンパ節転移部位の腫瘍も LNBG 陰性かつインテグリン $\alpha 6$ 陽性であった。このことから、神経周囲浸潤やその後の転移には、インテグリン $\alpha 6$ の発現亢進とともに α -ジストログリカン上の LNBG の合成減少が必要である可能性が示唆された。

臨床検体で得られた知見を前立腺癌細胞株で検証するため、低浸潤性細胞(LNCaP および PC3-H)と高浸潤性細胞株(LNCaP-androgen independent: LNCaP-AI および PC3-L)におけるインテグリン $\alpha 6$ と LNBG の発現や LNBG の合成に関連する糖転移酵素の発現を細胞蛍光染色およびウエスタンブロット(図 3)、qPCR(図 4)およびマイクロアレイ(図 5)で調査した。

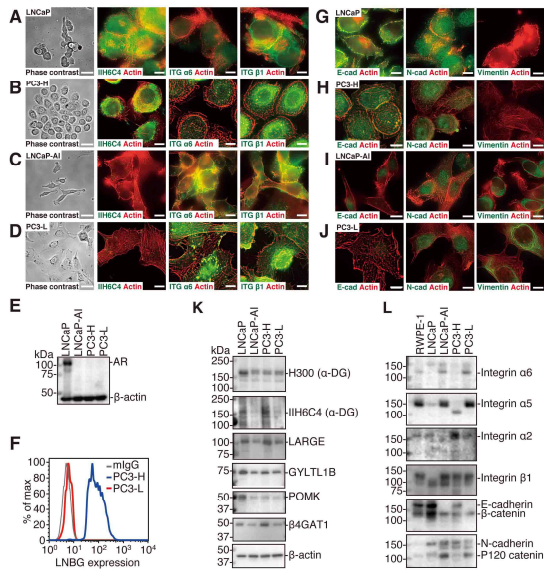


図 3 前立腺癌細胞株のインテグリン $\alpha 6$ と LNBG の細胞蛍光免疫染色、フローサイトメトリーとウエスタンブロット解析

A,B,C,D. 各前立腺癌細胞株におけるラミニンレセプターの発現。ラミニンレセプターは、Alexa488(緑)、アクチンは、Phalloidin(赤)標識 2 次抗体で検出した。G,H,I,J. 各前立腺癌細胞株における EMT 関連分子の発現。E-および N-カドヘリン,ビメンチンは、Alexa488(緑)、アクチンは、Phalloidin(赤)標識 2 次抗体で検出した。E. ウエスタンブロットによる各前立腺癌細胞株におけるアンドロゲンレセプターの発現。F. フローサイトメトリーによる PC3-H および PC3-L 細胞における LNBG の発

現解析。K.L. ウエスタンブロットによる各前立腺癌細胞株におけるインテグリン、ラミニンレセプターおよび LNBG 合成関連糖転移酵素の発現。

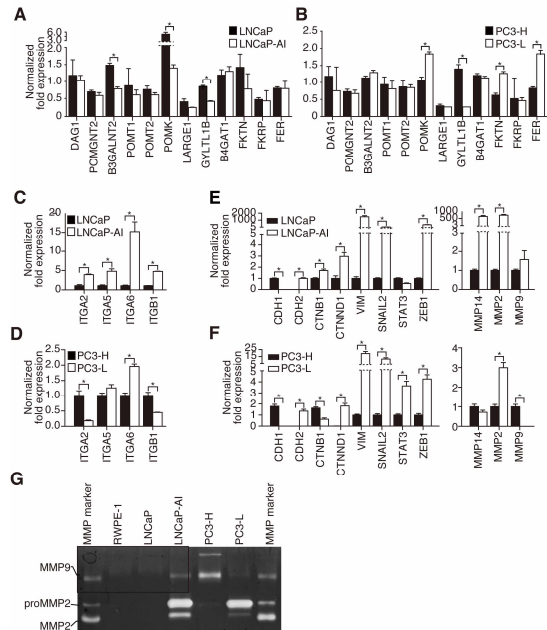


図 4 前立腺癌細胞株のインテグリン $\alpha 6$ と LNBG の qPCR による発現解析

A,B. qPCR による各前立腺癌細胞株における LNBG 合成関連糖転移酵素の発現。C,D. qPCR による各前立腺癌細胞株におけるインテグリンの発現。E,F. qPCR による各前立腺癌細胞株における EMT 関連遺伝子の発現。

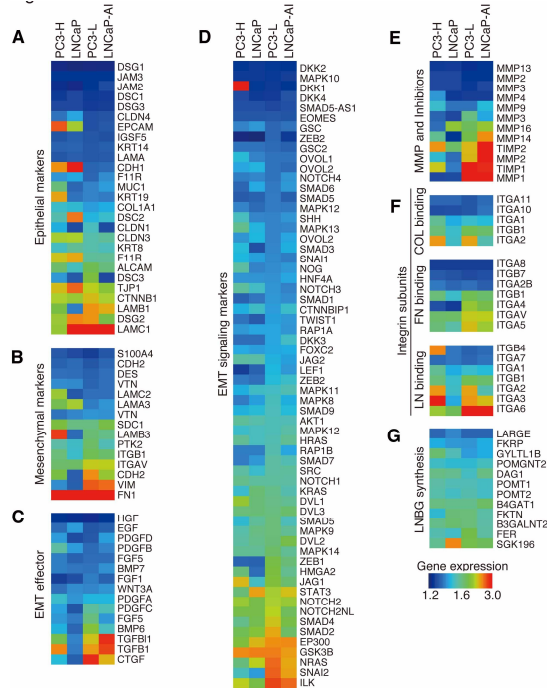


図 5. 前立腺癌細胞株のインテグリンと LNBG 合成関連酵素、EMT 関連遺伝子のマイクロアレイによる発現解析

図 3,4,5 の結果から、高浸潤性を示す前立腺癌細胞ではインテグリン $\alpha 6$ の発現が亢進するが、同じラミニンレセプターである LNBG の

発現は、顕著に減少し、LNBG が減少した細胞では、上皮間葉移行 (EMT) 関連分子の発現が亢進していることが明らかとなった。このことから以降の実験では、ラミニンレセプターの発現が異なり、インテグリン $\alpha 6$ の発現が亢進し、LNBG の発現は顕著に減している高浸潤性の PC3-L および LNCaP-AI 細胞とインテグリン $\alpha 6$ の発現が減少し、LNBG の発現は顕著に亢進している低浸潤性の PC3-H および LNCaP 細胞で検討を進めた。

また前立腺癌細胞が神経周囲へと浸潤する際に神経細胞あるいは、HPNC が分泌するケモカインに誘引されていると考えられたことから、神経細胞および HPNC 細胞が分泌するケモカインの測定を行った (図 6)。

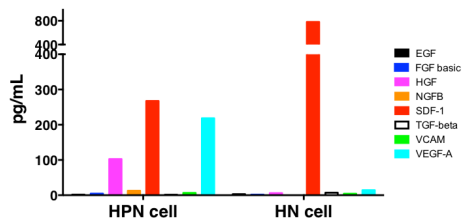


図 6. 神経細胞(HN)および神経周膜細胞(HPNC)が分泌するケモカイン

その結果、神経細胞および HPNC 細胞は、多量の Stromal derived factor-1 (SDF-1)を分泌していることが明らかとなった。さらに SDF-1 のレセプターである C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4)は、前立腺正常上皮および前立腺癌細胞で発現していることが明らかとなった (図 7)。

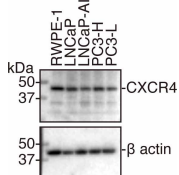


図 7. 前立腺細胞株の CXCR4 の発現

HPNC 細胞が分泌する SDF-1 が前立腺癌細胞の遊走能を亢進するかどうかを調べるために、抗 CXCR4 抗体で処理した前立腺癌細胞と処理していない前立腺癌細胞の HPNC 細胞のコンディショナル medium (HPNC-CM) に対するケモタキシスアッセイを行った。(図 8)

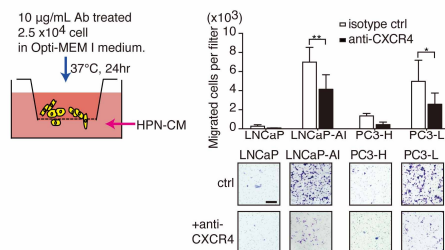


図 8. 各前立腺癌細胞の HPNC 細胞のコンディショナル medium (HPNC-CM) に対するケモタキシスアッセイ

その結果、前立腺癌細胞の HPNC-CM に対する遊走能は、低浸潤性細胞である LNCaP および PC3-H と比較し、高浸潤性細胞である PC3-L および LNCaP-AI 細胞で顕著に高く、抗 CXCR4 抗体によって有意に阻害されることから HPNC 細胞が分泌する SDF-1 が前立腺癌細胞上の CXCR4 と相互作用することにより、細胞遊走シグナルが活性化される可能性が示唆された。このことから次に SDF-1 処理による前立腺癌細胞の ERK および AKT のリン酸化について調べた。(図 9)

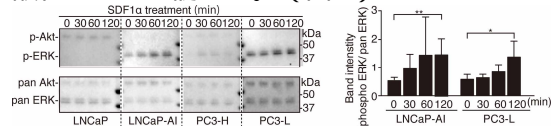


図 9. SDF-1 による ERK、AKT のリン酸化

その結果、SDF-1 により高浸潤性細胞である PC3-L および LNCaP-AI 細胞で ERK のリン酸化が有意に増加し、遊走能が亢進することが明らかとなった。

高浸潤性前立腺癌細胞は、HPNC 細胞が分泌する SDF-1 によって遊走能が亢進することが明らかとなったが、さらに前立腺癌細胞がラミニンリッチな神経周膜細胞へ到達するためには、ラミニンへの親和性が重要と考え、ラミニンを始めとする細胞外基質の刺激による ERK および AKT のリン酸化についても調べた。(図 10)

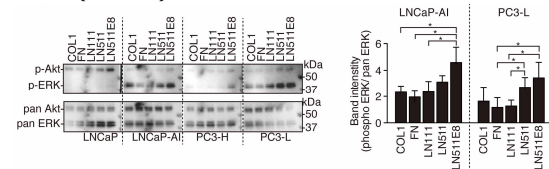


図 10. コラーゲン I (COL I)、フィブロネクチン (FN) およびラミニン (LN) 111, LN511, LN511E8 ドメインによる ERK、AKT のリン酸化

その結果、LNBG を高発現している LNCaP や PC3-H 細胞では、ERK の活性化がほとんど認められなかったのに対し、LNBG の発現が減少し、インテグリン $\alpha 6$ の発現が亢進している高浸潤性前立腺癌細胞は、特に LN511 やインテグリン $\alpha 6$ が結合する LN511E8 ドメイン処理によって有意に ERK のリン酸化が亢進した。このことから、前立腺癌細胞は、コラーゲンやフィブロネクチンよりもよりラミニンに親和性が高いことが示唆された。

さらに前立腺癌細胞の各種細胞外基質に対するハプトタキシスアッセイを行った。(図 11)

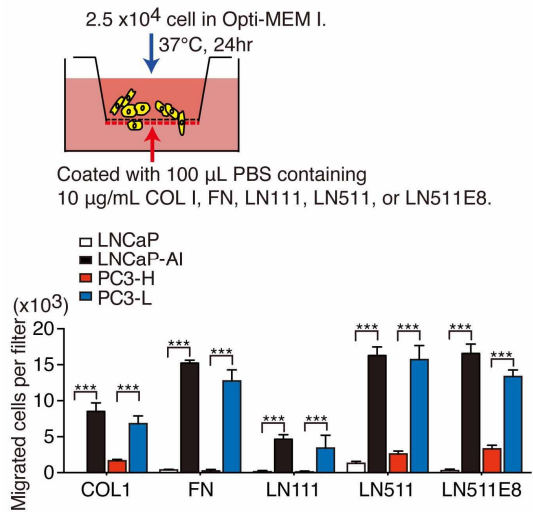


図 11. コラーゲン I(COL I),フィブロネクチン (FN)およびラミニン (LN) 111, LN511, LN511E8 ドメインに対する前立腺癌細胞の遊走能

その結果、ERK のリン酸化と同様に高浸潤性前立腺癌細胞は、特に LN511 やインテグリン $\alpha 6$ が結合する LN511E8 ドメインをコーティングしたフィルターに高い遊走能を示すことが明らかとなった。

最後に神経周膜細胞層に対する浸潤能を調査するために神経周膜細胞積層モデルに対する浸潤アッセイと抗インテグリン $\alpha 6$ 抗体あるいは、抗 CXCR4 抗体による阻害実験を行った。(図 12)。

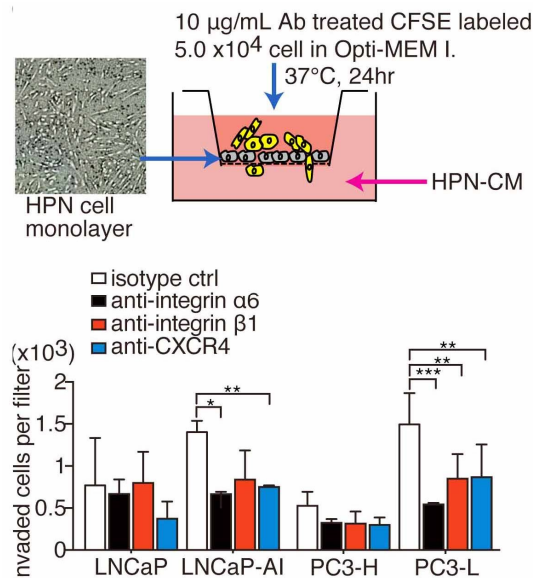


図 12. 神経周膜細胞層モデルに対する各種前立腺癌細胞の浸潤能

その結果、LNBG を高発現している LNCaP や PC3-H 細胞と比較し、LNBG の発現が減少し、インテグリン $\alpha 6$ の発現が亢進している高浸潤性前立腺癌細胞 (LNCaP-AI および PC3-L) は、神経周膜細胞層モデルに対する浸潤能が

有意に高く、これらは、抗インテグリン $\alpha 6$ 抗体あるいは、抗 CXCR4 抗体によって有意に阻害され、LNBG を高発現低浸潤性細胞 (LNCaP や PC3-H) と同程度の浸潤能となった。

これらの結果から前立腺癌細胞の神経周囲浸潤には、HPNC 細胞が分泌する SDF-1 にと前立腺癌細胞上のインテグリン $\alpha 6$ の発現および LNBG の合成減少が重要であると考えられた。(図 13)

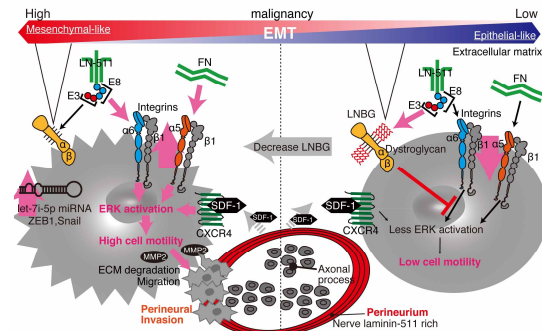


図 13. 本研究で明らかとなった前立腺癌細胞における神経周囲浸潤メカニズム

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 0 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 米山 徹, 藤田 尚紀, 岩村 大径, 岡本 亜希子, 飛澤 悠葵, 山本 勇人, 畠山 真吾, 古家 琢也, 福田 穰, 大山 力: miRNA によって制御されるラミニン結合 O 型糖鎖の前立腺癌神経周囲浸潤、転移における役割: 第 104 回日本泌尿器科学会総会 2017 年 4 月 23-25 日 宮城県仙台市(仙台国際会議場)ポスター
2. Yoneyama T, Fujita N, Iwamura H, Okamoto A, Yamamoto H, Mori K, Hatakeyama S, Hashimoto Y, Koie T, Tobisawa Y, Fukuda M, Ohyama C: Role of anti-metastatic laminin-binding O-glycan on α -dystroglycan regulated by miR-X in prostate cancer.: 31st European association of Urology annual meeting 2016 年 3 月 11-15 日. ドイツ(ミュンヘン)ポスター
3. 米山 徹, 藤田 尚紀, 岩村 大径, 岡本 亜希子, 飛澤 悠葵, 山本 勇人, 畠山 真吾, 古家 琢也, 福田 穰, 大山 力: miRNA によって制御されるラミニン結合 O 型糖鎖の前立腺癌神経

- 周囲浸潤における役割: 第25回泌尿器科分子・細胞研究会 2016年2月26-27日 大阪府大阪市(ハイアットリージェンシー大阪・ATCコンベンションルーム)ポスター
4. Yoneyama T, Fujita N, Iwamura H, Okamoto A, Yamamoto H, Hatakeyama S, Koie T, Tobisawa Y, Fukuda M, Ohyama C.: The role of laminin-binding O-glycan on α -dystroglycan regulated by miRNA for perineural invasion in prostate cancer.: 第88回日本生化学会 2015年12月1-4日 兵庫県神戸市(神戸ポートピアホテル)ポスター
5. 米山 徹, 藤田 尚紀, 岩村 大径, 岡本 亜希子, 飛澤 悠葵, 山本 勇人, 畠山 真吾, 古家 琢也, 福田 穰, 大山 力: The role of laminin-binding O-glycan on α -dystroglycan regulated by miRNA for perineural invasion in prostate cancer.: 第9回東北糖鎖研究会 2015年9月4-5日 宮城県仙台市(東北薬科大学)ポスター
6. Yoneyama T, Fujita N, Tobisawa Y, Hatakeyama S, Koie T, Ohyama C, Fukuda M.: Role of Laminin receptors for perineural invasion in prostate cancer.: 30th European association of Urology annual meeting 2015年3月21日 ス페인(マドリッド)ポスター
7. Yoneyama T, Hatakeyama S, Tobisawa Y, Nonaka M, Ohyama C, Fukuda M.: Laminin binding glycan depletion on α -dystroglycan in prostate cancer cells promotes epithelial-mesenchymal transition and enhance tumor formation.: Annual meeting of society for glycobiology 2014 2014年11月18日 アメリカ(ハワイ)ポスター
8. 米山 徹, 岡本 亜希子, 畠山 真吾, 飛澤 悠葵, 古家 琢也, 福田 穰, 大山 力: ラミニン結合O型糖鎖の発現低下は前立腺癌細胞の上皮間葉移行を促進し、浸潤能を亢進させる.: 第8回東北糖鎖研究会 2014年10月11日 岩手県盛岡市(岩手医科大学)ポスター
9. Okamoto A, Yoneyama T, Yoneyama M-S, Tobisawa Y, Hatakeyama S, T, Koie T, Ohyama C: Integrin $\alpha 6$ is a key molecule for perineural invasion in prostate cancer cells.: Annual meeting of American Urologican Association 2014

2014年5月16日-21日 アメリカ(オランダ)ポスター

10. 岡本 亜希子, 畠山 真吾, 米山 徹, 米山 美穂子, 飛澤 悠葵, 古家 琢也, 大山 力: フェージディスプレイ法による前立腺癌神経周囲浸潤に関与する分子のスクリーニング.: 第102回日本泌尿器科学会総会 2014年4月24-27日 兵庫県神戸市(神戸国際会議場)ポスター

〔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

岡本 亜希子 (Okamoto, Akiko)
弘前大学・医学研究科・研究員
研究者番号: 60436037

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

米山 徹 (Yoneyama, Tohru)
弘前大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50587649