

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430177

研究課題名(和文) 前立腺がん腫瘍源細胞の生存維持と分化抑制の分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of survival and differentiation inhibition 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・主任研究員

研究者番号：30311228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺がんは、我が国において急増し、主要ながんの一つである。前立腺がん細胞集団中には高い腫瘍形成能をもつがん幹細胞が存在し、治療抵抗性の要因となっていることがわかってきた。しかし、がん幹細胞を標的とした薬剤は未だ十分に見出されていない。本研究では、前立腺がん幹細胞の新しい治療標的分子として、TRIB1という生存分子を同定した。また、TRIB1は小胞体のストレス応答因子GRP78の機能を制御する事によって、前立腺がんの増殖を引き起こすことがわかった。さらに、TRIB1の生存シグナルを遮断する候補薬剤を見出した。本研究成果は、前立腺がんの根治に結びつく新たな治療法開発の基盤になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Prostate cancer has been increasing and has become a major cancer in Japan. Prostate cancer contains highly -tumorigenic 'cancer stem cells', which are involved in therapy resistance. So far, however, therapeutic agents targeting the prostate cancer stem cells are not fully identified. In this study, we identified TRIB1 as a novel survival factor for prostate cancer stem cells. TRIB1 supports prostate cancer cell growth via the function of the ER stress protein, GRP78. We also found a candidate compound that suppresses TRIB1-mediated survival signaling. Our findings would be a basis for the development of new therapeutic strategy for complete cure of prostate cancer.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：がん幹細胞 前立腺がん

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、食生活の欧米化などに伴い、我が国において最も急増しているがんである。前立腺がんの増殖はアンドロゲン受容体(AR)からのシグナルに依存している。そこで、その進行がんの治療には内分泌療法などARシグナルを遮断する薬剤が用いられるが、多くの場合、再発(再燃)がおこる。このような治療不応性となった前立腺がんに対しての新たな治療薬の探索や、治療薬の分子標的となる分子の同定が急務である。前立腺がんにおいては、その細胞集団中に、高い腫瘍形成能を有する腫瘍源細胞(がん幹細胞)が存在することが報告されてきた。この分画の細胞はARを発現しておらず、内分泌療法や化学療法に抵抗性であることが明らかにされてきた。このことは、再発した前立腺がんの治療において、ARを標的とするのみではなく、この腫瘍源細胞を標的とした新しいタイプの治療法が必要であることを示唆する。しかし前立腺がん腫瘍源細胞の生存因子に関する研究や知見は乏しかった。

2. 研究の目的

本研究では、前立腺がん腫瘍源細胞の生存維持に関わる分子を同定し、その分子機構を明らかにする。さらに、同定した因子やそのシグナル伝達を阻害することにより、前立腺がんの根治に結びつく新しい治療ストラテジーの開発を目指す。我々は先行研究において、RNAiスクリーニングによって、その候補因子として白血病の発症などに関わるシグナル伝達のアダプター分子であるTRIB1を同定した。そこで本課題では、TRIB1による前立腺がん腫瘍源細胞の生存維持メカニズムの解析とこれを標的とした薬剤の探索に焦点を絞って研究を進める。

3. 研究の方法

(1) がん微小環境下での腫瘍源細胞生存維持へのTRIB1-GRP78の関与の検討

前立腺がん細胞株を3次元培養等のがん特有の増殖環境下で培養させる。これらの増殖環境下等において、腫瘍源細胞(マーカー陽性細胞)およびそれ以外の細胞(マーカー陰性細胞)をFACSセルソーティングにより分離し、両者におけるTRIB1-GRP78の発現を検討する。また、ソーティングにより分離したマーカー陽性細胞および陰性細胞においてTRIB1ノックダウンが与える増殖抑制効果の違い等を見る。TRIB1のノックダウンで形質に差が見られた場合には、RNAi抵抗性TRIB1の過剰発現により形質変化がレスキューされるかを確認する。さらに、*in vivo*での腫瘍形成へのTRIB1やその下流のGRP78の関与の検討を行う。

(2) TRIB1による小胞体ストレス応答機構・分化制御機構の制御メカニズムの解析

TRIB1ノックダウン細胞を用いた遺伝子シグニチャー解析を行い、TRIB1がその下流において小胞体ストレス応答に関わる遺伝子群、特に、前立腺がんのがん化の要因となる小胞体ストレスシャペロンGRP78の発現に与える効果を明確にする。また、TRIB1の細胞内局在を免疫蛍光抗体法により検討を行う。また、TRIB1の過剰発現細胞を樹立し、前立腺がん腫瘍源細胞分画や小胞体ストレス応答制御機構、制御因子の機能等へのTRIB1の役割を合わせて検討する。

一方、TRIB1の発現抑制により、分化様の形質変化が誘導されるか、Dicer1遺伝子や、発生・分化関連遺伝子群にどのような影響があるか等を明らかにする。またDicerの下流において制御されるマイクロRNAの発現が、

TRIB1 発現にどう依存しているかについて、網羅的発現解析等により検討する。

(3) TRIB1 による生存シグナルを抑制する化合物の *in silico* 探索

Connectivity Map や JFCR_LinCAGE などの *in silico* 解析などにより、TRIB1 で変動する遺伝子シグニチャーをベイト(餌)として、TRIB1 阻害時と類似した遺伝子発現変動を誘導する化合物を探索、同定する。これらの化合物は、TRIB1 に制御される前立腺がん腫瘍源細胞の生存シグナル伝達経路に作用する可能性のある候補化合物である。そこで、得られた候補化合物が、実際に TRIB1 を介した生存促進や GRP78 制御経路に作用するかを実験的に検証する。同定された化合物については、腫瘍源細胞を標的として制がん剤の細胞増殖抑制効果を増強しうるか等を検討する。

4. 研究成果

我々は、前立腺がん細胞株や患者由来の初代培養前立腺がん細胞分画中に、高い腫瘍源性をもつ細胞分画(CD151/TRA1-60 陽性分画)を確認した。また、この細胞分画は浮遊細胞塊(スフェア)培養条件で選択的に増殖することを示した。そこでこの性質を利用し、包括的機能遺伝学手法を用いて、スフェア増殖に対して選択毒性を示す RNAi を探索し、腫瘍源細胞の生存因子探索を進めた。その結果、前立腺がん腫瘍源細胞の新たな生存維持因子として TRIB1 を同定した。TRIB1 は、前立腺がんで高頻度に遺伝子増幅したゲノム領域上の遺伝子であり、前立腺がん臨床組織において TRIB1 の顕著な発現亢進を見出した。一方、その発現は正常前立腺組織では低かった。

前立腺がん細胞株において、TRIB1 をノックダウンすると、3次元培養環境下での増殖

が選択的に抑制された。またこの増殖抑制効果は、RNAi 抵抗性 TRIB1 の過剰発現によりレスキューされた。また、TRIB1 ノックダウンは、マーカー陽性細胞に選択的な増殖抑制効果を示した。我々はさらに、cDNA マイクロアレイにより、TRIB1 ノックダウン細胞を用いた遺伝子シグニチャー解析を行い、下流のシグナル経路を調べた。その結果、TRIB1 はその下流において、前立腺がんのがん化の要因となる小胞体ストレスシャペロン GRP78 の発現を正に制御していることを見出した。GRP78 は、マーカー陽性細胞において選択的な発現が認められ、また、免疫蛍光抗体法による細胞内局在の検討の結果、TRIB1 は前立腺がん細胞において小胞体に局在することがわかった。前立腺がん組織において、TRIB1 は GRP78 の発現に相関することも見出した。さらに、TRIB1 による GRP78 の発現制御がそのプロモーター活性制御によることがわかった。さらに、TRIB1 ノックダウンにより、*in vivo* での腫瘍形成が抑制された。以上から、TRIB1-GRP78 経路は前立腺がん腫瘍源細胞の生存維持に重要な役割をもつことが明らかになった。

他方、TRIB1 のノックダウンにより明確な細胞の形態変化が見られ分化様の変化が考えられた。その際、Dicer 遺伝子の発現が顕著に変動した。そこで TRIB1 発現抑制時の形質変化へのマイクロ RNA の関与を見るため、TRIB1 ノックダウン時に変動するマイクロ RNA を同定した。

また TRIB1 自体は酵素でなく、薬剤探索の標的として適さない。そこで、TRIB1 依存的な生存経路を抑制し、前立腺がん幹細胞を選択的に抑制できる薬剤シーズを探索する目的で、TRIB1 の発現抑制時と類似した遺伝子群を変動させる薬剤のスクリーニングを、*in silico* 解析により探索した。その結果、細胞内シグナル分子 X の阻害剤を同定した。実際、X を介したシグナル伝達が TRIB1 の下

流にあることもわかり、さらに、X阻害剤は、その下流のリン酸化シグナルを抑制し、スフェア細胞選択的な増殖抑制を示した。さらにX阻害剤は、前立腺がん腫瘍源性細胞の割合を低下させ、また制がん剤の効果を増強する事も示した。以上より、前立腺がん腫瘍源性細胞の増殖・生存維持に寄与する制御因子TRIB1のシグナル伝達経路、とくにそれに関与する分子Xの抑制が、前立腺がん腫瘍源細胞を抑制し、制がん剤による抗腫瘍効果を増強しうる有用なストラテジーとなる事が示唆された。

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 6 件)

(1) Tanaka N, Mashima T, Mizutani A, Sato A, Aoyama A, Gong B, Yoshida H, Muramatsu Y, Nakata K, Matsuura M, Katayama R, Nagayama S, Fujita N, Sugimoto Y, Seimiya H. APC mutations as a potential biomarker for sensitivity to tankyrase inhibitors in colorectal cancer. Mol Cancer Ther 2017 16:752-762.

(2) Mashima T. Cancer Stem Cells (CSCs) as a Rational Therapeutic Cancer Target, and Screening for CSC-targeting Drugs. Yakugaku Zasshi. 2017, 137, 129-32.

(3) Noguchi K, Mashima T. Pharmaceutical Sciences Advancing Molecular Cancer Therapeutics ~ To Improve Rationale and Effectiveness of Molecularly Targeted Drugs ~. Yakugaku Zasshi. 2017, 137, 127-8.

(4) Suenaga M, Mashima T, Kawata N, Wakatsuki T, Horiike Y, Matsusaka S, Dan S, Shinozaki E, Seimiya H, Mizunuma N,

Yamaguchi K, Yamaguchi T. Serum VEGF-A and CCL5 levels as candidate biomarkers for efficacy and toxicity of regorafenib in patients with metastatic colorectal cancer.

Oncotarget 2016 7:34811-23.

(5) Mashima T, Ushijima M, Matsuura M, Tsukahara S, Kunimasa K, Furuno A, Saito S, Kitamura M, Soma-Nagae T, Seimiya H, Dan S, Yamori T, Tomida A. Comprehensive transcriptomic analysis of molecularly targeted drugs in cancer for target pathway evaluation. Cancer Sci 2015 106:909-20.

(6) Mashima T, Soma-Nagae T, Migita T, Kinoshita R, Iwamoto A, Yuasa T, Yonese J, Ishikawa Y, Seimiya H. TRIB1 supports prostate tumorigenesis and tumor-propagating cell survival by regulation of endoplasmic reticulum chaperone expression. Cancer Res 2014 74:4888-97.

[学会発表](計 8 件)

(1) 馬島哲夫 がん治療標的としてのがん幹細胞と標的薬剤の探索 日本薬学会 第136年会 平成28年3月27日(パシフィコ横浜、神奈川)

(2) Mashima T, Kinoshita R, Okabe S, Seimiya H. Gene signature-based approach identifies mTOR as a downstream molecule of TRIB1 dependent survival pathways in prostate cancer. Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics. 2016.2.18 (Hyatt Regency Maui, Hawaii, USA)

(3) 馬島哲夫 Comprehensive transcri

ptomic database of the molecularly targeted drugs in cancer for evaluation of anticancer compounds. 第 74 回日本癌学会 学術集会 平成 27 年 10 月 8 日(名古屋国際会議場、名古屋)

(4) 馬島哲夫 遺伝子シグネチャーによる薬剤プロファイリングとその活用術 文部科学省新学術領域研究・生命科学系 3 分野 3 領域支援活動合同シンポジウム 平成 27 年 8 月 19 日(学術総合センター、東京)

(5) 馬島哲夫 がん分子標的薬の標的経路の評価と同定のための包括的遺伝子発現データベース構築と解析 第19回日本がん分子標的治療学会学術集会 平成27年6月10日(松山全日空ホテル、愛媛)

(6) 馬島哲夫 TRIB1 supports prostate tumorigenesis and tumor-propagating cell survival via the regulation of endoplasmic reticulum chaperone expression. 第 73 回日本癌学会学術集会 平成 26 年 9 月 25 日(パシフィコ横浜、神奈川)

(7) Mashima T An essential factor for prostate tumorigenesis and tumor-propagating cell survival identified by functional genomics and transcriptome analyses. 第 12 回 日韓がん老化合同シンポジウム 平成 26 年 6 月 19 日(埼玉県立がんセンター、埼玉)

(8) 馬島哲夫 化合物活性予測のための遺伝子発現データベース構築 化学療法基盤支援活動 第3回シンポジウム 平成26年5月12日 (万国津梁館、沖縄)

〔図書〕(計 2 件)

(1) 馬島哲夫, 清宮啓之 メディカルレビュー社 がん分子標的治療 2014, 12:420-424.

(2) 馬島哲夫, 右田敏郎, 清宮啓之 メディカルレビュー社 The Lipid, 2014, 25:352-358.

〔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:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 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・主任研究員 研究者番号:30311228

研究者番号:30311228

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし