

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：82704

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670709

研究課題名(和文)細菌、ウイルス感染による細胞極性の破綻と前立腺癌発生、進展機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the association between the collapse of cell polarity and prostate cancer development and progression by the infection.

研究代表者

石黒 斉 (Ishiguro, Hitoshi)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・重点研究室光触媒グループ・研究員

研究者番号：00381666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では前立腺癌の発生や進展に関する細菌やウイルスの同定を試みた。また、感染による細胞極性の破綻と前立腺癌の発生や進展の関係について明らかとすることを目的とした検討を行った。その結果、前立腺癌に特異的に感染する細菌やウイルスの同定には至らなかった。一方、感染と慢性炎症という観点から、脂肪細胞由来のMCP-1が前立腺癌の進展に重要であることを見出した。さらに、炎症性サイトカインの産生や細胞極性にも重要な分子であるatypical protein kinase Cの高発現が正常前立腺細胞を癌化させる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We investigated to identify bacteria or virus associated with prostate cancer development and progression. In addition, we investigated that the association between prostate cancer progression and the collapse of cell polarity by the infection. As the results, we could not find specific bacteria or virus in prostate cancer tissues. On the other hand, we found that MCP-1 derived from adipocytes was an important role for prostate cancer progression. Furthermore, we found that the overexpression of atypical protein kinase C that increases the expression of inflammatory cytokines and cell polarity has the possibility for prostate cancer development.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：前立腺癌

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は高齢者に多い癌であり、本邦における前立腺癌の罹患率は増加傾向にある。そのため、今後の高齢化社会に向けて、大きな社会問題となると考えられる。前立腺癌の発生や進展には遺伝子発現異常や男性ホルモン、増殖因子などの関与が知られている。さらに、慢性的な炎症によって産生されるサイトカインやケモカインも癌の発生や進展に重要である。このような炎症を引き起こす原因として、細菌やウイルス感染があげられる。現在までに、胃癌とピロリ菌、肝臓癌と肝炎ウイルスなど癌の発生に細菌やウイルスの感染が重要であることが明らかとなっている。一方で、前立腺癌の発生や進展の原因となる細菌、ウイルスの同定には至っていない。

我々はこれまでに、細胞極性分子である atypical protein kinase C (aPKC) の発現異常が炎症性サイトカインである Interleukin-6 の発現異常に関与して、前立腺癌の進展に大きくかかわることを報告した。同時に、細胞極性の破綻が癌の発生や進展に大きく関与しているという概念で検討を重ねてきた。そこで、本研究では細菌やウイルスの感染が細胞極性にどのような影響をあたえるか、更に前立腺癌の発生や進展への関わりについて検討した。

2. 研究の目的

癌の発生・進展には慢性的な炎症による細胞内外の様々な異常が深くかかわっており、炎症を起こす大きな原因として細菌やウイルスの感染があげられる。一方で、前立腺癌における細菌やウイルス感染の関与については不明である。また、そこで、本研究では前立腺癌に関与する可能性を持つ細菌やウイルスの同定と感染による細胞極性の破綻の可能性及び感染に関連する炎症性サイトカインによる前立腺癌の発生や進展の関係について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 前立腺組織及び血清サンプルを用いた検討

前立腺癌に関与する細菌やウイルスの同定のために、前立腺組織及び血清サンプルを用いた検討を行った。これらの臨床サンプルについては、研究使用について十分な説明を行い、研究使用の同意を得たものを使用した。前立腺癌組織、正常前立腺組織から total RNA 及び DNA を抽出し、PCR やマイクロアレイ解析を使用して細菌やウイルスの検出を行った。また、細胞株を用いた検討結果をもとに、前立腺組織由来 RNA を用いた発現解析を行った。

血清サンプルを用いた解析では、血清中の B 型肝炎表面抗原 (HBs 抗原)、HCV 抗体の検出を行った。対象として前立腺癌患者以外の血清サンプルについても検討を行った。

(2) 前立腺細胞株を用いた検討

① 前立腺細胞株

前立腺癌細胞株として LNCaP, PC-3, DU145、正常前立腺細胞株として RWPE-1 を用いた。それぞれ適切な培地中にて培養を行い、実験に用いた。脂肪細胞は、前駆脂肪細胞を分化させた後、培養上清を回収して実験に用いた。

aPKC 発現の異常による極性の異常と前立腺癌の発生の関係を検討するために、野生型 aPKC λ 遺伝子または不活性型 aPKC λ 遺伝子を発現するベクターを作製し、正常前立腺細胞 RWPE-1 に遺伝子導入した。その後、抗生剤によって遺伝子導入された細胞を選択し、野生型 aPKC λ、不活性型 aPKC λ を恒常的に発現する細胞を樹立した。コントロール細胞として、aPKC λ 遺伝子の配列を含まないベクターを持つ細胞も同様に樹立し、その後の検討に用いた。

② 脂肪細胞由来の炎症性サイトカイン、ケモカインと前立腺癌の進展に関する検討

脂肪細胞由来の培養上清中に含まれるサイトカインについて、サイトカインメンブレンアレイを用いて探索した。細胞増殖については細胞数の計測もしくは MTT assay を用い、浸潤能については、invasion assay や gelatin zymography によって検討を行った。運動能については wound healing assay によって検討し、細胞内のシグナル伝達については western blot を用いて検討した。また、前立腺組織における遺伝子発現の検討では定量的 PCR を用いた。

③ aPKC λ 発現の異常による極性の異常と前立腺癌の発生の検討

樹立した各細胞を用いて、細胞の癌化について検討を行った。増殖能については細胞数の計測を行い、浸潤能については、invasion assay を用いた。また、足場非依存性増殖については、Soft agar colony assay によって確認した。極性の変化による形態の変化は、3 次元培養を用いたスフェロイドの形成によって確認した。

4. 研究成果

(1) 前立腺組織を用いた細菌及びウイルスの検出

計 24 検体の前立腺がん組織について、マイクロアレイ解析を行った。その結果、1 例でパラインフルエンザウイルスが検出されたのみであり、前立腺癌に関係するようなウイルスを検出することはできなかった。また、PCR を用いて前立腺癌組織 100 例に対して、細菌やウイルスの同定を試みた。その結果、ヒトパピローマウイルス、Bovine leukemia virus はすべての症例で未検出であった。一方、Epstein-Barr virus (EB virus) について感染を検討した結果、前立腺癌組織で 34 例について、EBNA1 遺伝子の発現を認めた。し

かしながら、正常前立腺組織においても EBNA1 の発現を認めていることから、前立腺癌に特異的ではなく、癌との関係性は不明であった。また、EBNA1 の発現と stage や再発までの期間等の関連性についても検討したが、有意な差は認められなかった。EB virus はバーキットリンパ腫や胃癌などに関与することが明らかとなっていることから、今後、EB virus の感染が前立腺細胞にどのような影響を与えるか検討を行う予定である。

(2) 血清サンプルにおける肝炎ウイルスの検討

前立腺癌症例及び対象例について、血清中の HBs 抗原及び HCV 抗体の検出を行った結果、182 例の前立腺癌に対して、HBs 抗原は 1 例のみであった。また、コントロール(30 例)については HBs 抗原を 1 例検出した。HCV 抗体については、前立腺癌症例で 4 例、コントロールで 1 例であった。このことから、今回の検討から前立腺癌の発生や進展に B 型肝炎ウイルス及び C 型肝炎ウイルスは関与しないと考えられた。

(3) 前立腺細胞株を用いた解析

① 脂肪細胞由来の炎症性サイトカイン、ケモカインと前立腺癌の進展に関する検討

肥満による脂肪細胞の増加により、脂肪細胞より産生される様々な因子によって、様々な炎症性サイトカインが増加することが知られている。さらに、肥満と前立腺がんの進展についてもその関連性が指摘されている。そこで、脂肪細胞培養上清を各種前立腺がん細胞株に加えて培養したところ、コントロールに対して有意な細胞数の増加を認めた。さらに、細胞の運動能や浸潤能も増加していることが明らかとなった。そこで、培養脂肪細胞上清に含まれるサイトカイン類を探索したところ、幾つかのサイトカイン、増殖因子が産生されていることが明らかとなった(図 1)。

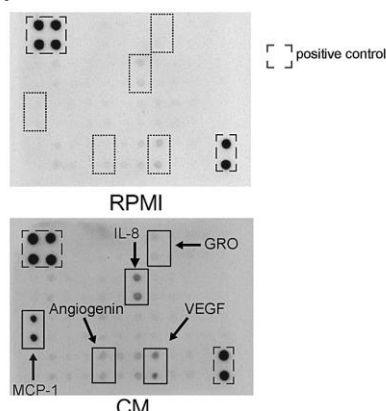


図 1. 脂肪細胞培養上清に含まれる因子

またその結果から、Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) が多く含まれることが明らかとなった。そこで、MCP-1 による前立腺癌細胞株の増殖について検討した結果、

MCP-1 による有意な細胞増殖を認め、その効果は MCP-1 中和抗体によって抑制された(図 2)。さらに、脂肪細胞培養上清を用いて前立腺癌細胞株を培養する際に、MCP-1 中和抗体を加えたところ、その運動能や浸潤能を抑制することが明らかとなった(図 3)。

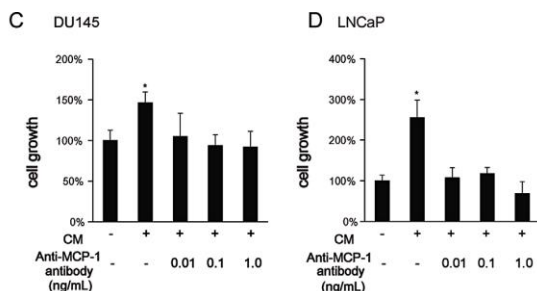


図 2. MCP-1 中和抗体による細胞増殖抑制

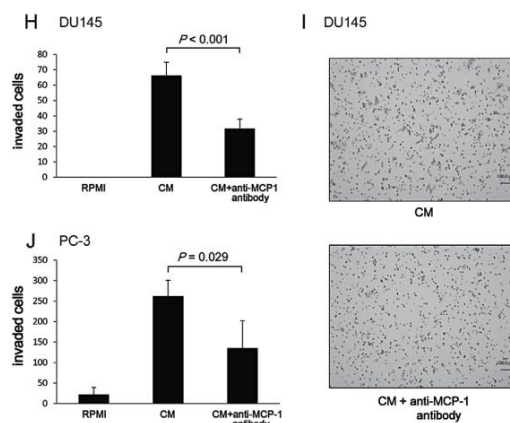


図 3. MCP-1 中和抗体による浸潤能の抑制

また、浸潤に重要な酵素の活性が脂肪細胞培養上清を加えて培養した前立腺癌細胞では増加し、MCP-1 中和抗体によって抑制されることを gelatin zymography によって確認している。さらに、MCP-1 の受容体が前立腺癌組織中の悪性度と創刊していることを明らかとしている。これらの結果より、脂肪細胞由来の MCP-1 が前立腺癌の進展に重要であることを明らかとした。肥満と前立腺癌の関係については、詳細が不明であったが本検討結果より、肥満による前立腺癌の進展機序の一端を明らかにすることが出来た。また、脂肪細胞由来の MCP-1 を抑制することが前立腺癌の治療に効果がある可能性を報告した。

② aPKCλ 発現の異常による極性の異常と前立腺癌の発生の検討

野生型 aPKCλ 遺伝子、不活性型 aPKCλ 遺伝子を発現するベクターを作製し、正常前立腺細胞 RWPE-1 に遺伝子導入した。その後、抗生剤によって、遺伝子導入された細胞を選択した後、野生型 aPKCλ、不活性型 aPKCλ を恒常的に発現する細胞を樹立した。コントロール細胞として、aPKCλ 遺伝子の配列を含まないベクターを持つ細胞も同様に樹立し、

その後の検討に用いた。

初めに、樹立した細胞の増殖能について、細胞数を測定して確認を行った。その結果、野生型 aPKC λ を発現する細胞は、コントロール細胞と比較して有意な細胞増殖を示した。一方で、不活性型 aPKC λ を発現する細胞株はコントロール細胞と比較して有意な細胞増殖能の低下を認めた(図 4)。

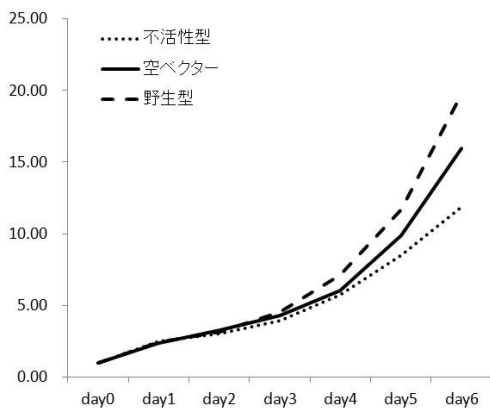


図 4. 細胞増殖の違い

更に、運動能や浸潤能についても野生型 aPKC λ を発現する細胞ではコントロール細胞に対して有意な増加を認めており、不活性型 aPKC λ を発現する細胞ではコントロール細胞と同程度であることを確認した。また、癌細胞特異的な増殖の一つである足場非依存性増殖について検討した結果、コントロール細胞や不活性型 aPKC λ を発現する細胞では増殖は認められない一方で、活性型 aPKC λ を発現する細胞では有意な増殖を認めた(図 5)。

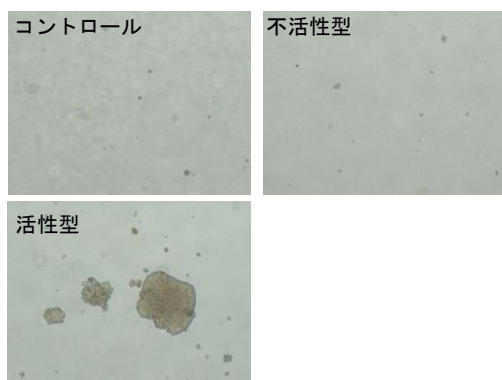


図 5. Soft agar colony assay の結果

これらの結果より、aPKC λ の発現異常は前立腺癌の進展のみならず、前立腺癌の発生にも関与している可能性が考えられた。

更に、3次元培養による形態を確認したところ、コントロール細胞では正常なスフェロイドを作るのに対して、野生型や不活性型 aPKC λ 遺伝子を発現する細胞では異常な状態が認められ、極性異常が癌の発生にも重要な可能性を持つことを明らかとした。

これまでに、前立腺癌の発生に aPKC λ 遺伝子が関与することについて詳細な報告はな

いことから、今後、更に詳細な検討を行い、aPKC λ 遺伝子が前立腺癌の進展のみならず、発生にも関与することを明らかとする予定である。

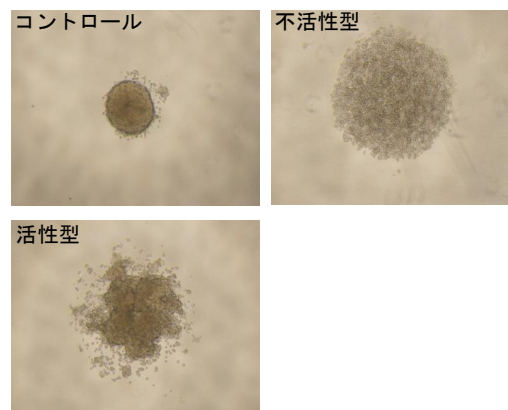


図 6. 3次元培養の結果

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 1 件)

1. Ito Y, Ishiguro H, Kobayashi N, Hasumi H, Watanabe M, Yao M, Uemura H. Adipocyte-derived monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through matrix metalloproteinase (MMP-2) mediated extracellular matrix degradation. Prostate. (査読有) 2015 Jul;75(10):1009-1019. doi: 10.1002/pros.22972.

[学会発表] (計 4 件)

1. Ito Y, Ishiguro H, Kobayashi N, Hasumi H, Watanabe M, Yao M, Uemura H. Adipocyte-derived monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through matrix metalloproteinase (MMP-2) mediated extracellular matrix degradation. AACR annual meeting 2015, 2015 年 4 月, フィラデルフィア(米国).
2. 伊藤悠亮, 石黒 斎, 小林直人, 蓮見壽史, 渡邊昌俊, 矢尾正祐, 上村博司. 脂肪細胞由来 MCP-1 は前立腺癌細胞の増殖・浸潤能を亢進する. 第 103 回日本泌尿器科学会総会. 2015 年 4 月, 金沢都ホテル, 金沢.

[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：
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

石黒 斉 (ISHIGRUO, Hitoshi)
公益財団法人神奈川科学技術アカデミ
ー・重点研究室光触媒グループ・研究員
研究者番号：00381666

(2) 研究分担者

上村 博司 (UEMURA, Hiroji)
横浜市立大学・大学病院・准教授
研究者番号：50244439

(3) 連携研究者

窪田 吉信 (KUBOTA, Yoshinobu)
公益財団法人神奈川科学技術アカデミ
ー・重点研究室光触媒グループ・研究員
研究者番号：10106312