

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11127

研究課題名(和文) 新規末梢血癌細胞検出法を応用した泌尿器癌転移に関するバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of novel biomarker in metastasis of urological cancer using a novel circulating tumor cell detector system

研究代表者

北川 育秀 (KITAGAWA, Yasuhide)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：00452102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：患者への侵襲が少なく、繰り返し経時的に評価できるリキッドバイオプシーによる新規泌尿器癌転移バイオマーカーの開発を試みた。hTERTプロモーターとGFPを組み込んだ新規adenovirusベクターを用いたシステムを使用して、血液中に混注した癌細胞を同定することが可能であった。しかし、検出するためには血液1ml中に100-1000個の癌細胞が必要であり、精度は低いものであった。一方、ヒト前立腺癌細胞株を使用したexosomeに内包されたmicro RNAの解析では、複数の候補の中からmiR124が転移性去勢抵抗性前立腺癌の増悪に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

泌尿器癌においては、CTC検出の実用化にはまだ大きなハードルが存在するものの、去勢抵抗性前立腺癌では本研究で得られたexosomeに内包されたmicro RNAのプロファイルをもとに、新規バイオマーカーを開発できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tried to find out a novel metastatic biomarkers of urological cancers using liquid biopsy as a repeatable and less invasive method. Adenovirus vector with GFP and hTERT promotor could detect cancer cells mixed in human blood samples; however, it needed more than 100 cells/ml to detect them, indicating low performance for clinical use as it was. Micro RNA analysis in exosome from supernatant of prostate cancer cells revealed that miR124 might contribute to metastasis of castration-resistant prostate cancer.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：エクソソーム 泌尿器癌 去勢抵抗性前立腺癌

1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い、日本人の癌罹患率、死亡率ともに増加している。ここ十年の間に癌の治療は飛躍的に進歩したと言われているが、遠隔転移を有するような、所謂、進行癌に関してはそれほど大きな生存率の改善は認められていない。転移を有する病態に対する、より効果的な治療法の開発が急務である。転移が成立するためには、癌細胞が原発巣から正常基底膜を破壊、組織内浸潤し、血管内を浮遊・漂流したのちに転移臓器の血管壁・間質へ浸潤、定着し増殖する、という各段階が必要である。ここ数年注目されているのが、末梢血癌細胞(circulating tumor cell: CTC)や末梢血中 DNA/RNA、exosome といった血中に微量に存在する物質から癌情報を取得するリキッドバイオプシーである。リキッドバイオプシーは検体採取の際、患者への侵襲が少ない上に、繰り返し経時的に評価できることから、単なる予後予測のみならず、画像診断と同様に治療効果判定にも応用しうるものである。

CTC の検出は、乳癌・大腸癌・前立腺癌などにおいて、予後予測マーカーや治療効果指標として有用であるとの報告がなされている。現状では、主にヒト上皮抗原である EpCAM や cytokeratin 8/18/19 などの細胞表面の上皮マーカーを用いて CTC を区別し検出している。しかし、正常細胞でも上皮抗原が発現していることから、癌細胞と正常上皮細胞の区別が難しく、また、生存している細胞と機能喪失している細胞との区別も困難であることが大きな問題である。さらに、癌細胞が原発巣から血管へ移動する際に上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition: EMT)を生じることから、上皮マーカーの発現が低下してしまうことや、抗癌剤等の治療によって癌細胞の上皮マーカーの発現量が低下することも、CTC を検出する上で問題となっている。

以前の研究でクローニングした human telomerase reverse transcription (hTERT) プロモーターを 5 型 adenovirus の E1A・E1B 遺伝子の上流に組み込むことで、hTERT プロモーターが活性化された telomerase 陽性細胞でのみ増殖するように改変された telomerase-specific replication-selective adenovirus を開発した。これにさらに GFP 遺伝子を組み込むことで、生存している癌細胞に特異的、かつ上皮抗原の発現状況に依存しない CTC の検出が理論上可能となった(TRAD システム)。hTERT に依存していることから正常細胞とのコンタミネーションの懸念も少ない。

また、exosome は CTC などの癌細胞をはじめ、様々な細胞から分泌される多様な分子を含んだ小胞で、組織間質や血中で分泌された細胞とは別の細胞に取り込まれることによって細胞間シグナル伝達が行われる。詳細な exosome の分析により、癌細胞の性質や状態を捉えることも可能である。さらに、癌の進展においても極めて重要な役割を果たしていることが近年明らかになった。分泌された exosome は micro RNA をも内包することができることが知られている。泌尿器癌における細胞間シグナル伝達を介した癌進展機構においては、exosome に内包された micro RNA (exmiR) は、合理的かつシンプルな物理的伝達システムであり、その発現状況や変化を捉えることによって予後や治療効果の予測や、薬剤耐性機構をも解明しうる可能性もあると考えられる。

泌尿器癌においては、進行腎細胞癌と去勢抵抗性前立腺癌に関しては生物学的なバイオマーカーが存在せず、治療経過を予測することが非常に困難である。特に去勢抵抗性前立腺癌については前立腺特異抗原(prostate-specific antigen: PSA)の絶対値はもはやバイオマーカーとしての意味を持たなくなっている。また新規治療の台頭によりアンドロゲン受容体シグナルの高度な抑制が可能となり、PSA の動的変化でさえもバイオマーカーとしての信頼性が揺らいでいる。そのため、癌細胞の活性をパラレルに評価しうる新規バイオマーカーの確立が急務である。加えて、リキッドバイオプシーから得られる様々な情報を統合・整理し、病態を推測・解明することで、新規治療の開発につながる新しい標的経路・分子などが見つかる可能性が大いにあると考えられる。

2. 研究の目的

泌尿器癌の中で、特に進行腎細胞癌と去勢抵抗性前立腺癌においては、有用な生物学的なバイオマーカーが存在せず、予後ならびに治療経過を予測することが非常に困難である。検体採取の際、患者への侵襲が少ない上に、繰り返し経時的に評価できるリキッドバイオプシーによる新規バイオマーカーの開発は、患者への負担のみならず、簡便さや経済性からもメリットが大きいと考えられる。

CTC 検出においては、これまでに存在していた信頼性を落とすいくつかの技術的問題点を理論上克服した新しい手法を取得できたことから、本手法の技術的精度を評価した上で、改善が必要であればさらに改良を加える。ヒト前立腺癌細胞株や腎癌細胞株を用い、試験管レベルで十分技術的精度を確保できることを確認することがまず必要である。その後泌尿器癌患者における末梢血 CTC の同定を行い、回収して原発巣の癌細胞との遺伝子発現の比較を行い、血行性転移に関わる分子生物学的機序を解明する。

また試験管レベルでの exosome 検出についてはすでに研究室で技術を確立している。内包される遺伝子発現制御物質としての micro RNA に焦点を当て、発現解析を行い、予後予測因子と

なりうる exmiR の同定、さらにそれらを用いて、ヒト泌尿器癌細胞株における作用を明らかにする。これらリキッドバイオプシーの結果を統合的に解釈し新規バイオマーカーの確立を目指す。

3. 研究の方法

- (1) ヒト泌尿器科癌細胞株を用いた予備実験：ヒト腎癌細胞株 ACHN、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3、DU145、LNCaP の血液混注サンプルの作成（CTC モデル）および TRAD システムによる細胞の同定。
- (2) 泌尿器癌（腎癌、腎盂尿管膀胱を含めた尿路上皮癌、前立腺癌、精巣癌）患者の血液サンプルを使用した CTC の検出・採取。
- (3) ヒト前立腺癌細胞株におけるアンドロゲン受容体のノックダウン法を採用した去勢抵抗性前立腺癌細胞モデルの作成。
- (4) ヒト前立腺癌細胞株における exosome の採取。
- (5) miScript PCR array を用いた半網羅的 exmiR 解析による去勢感受性細胞との exmiR の比較。
- (6) 去勢抵抗性獲得における標的 exmiR の同定。
- (7) 標的 exmiR の機能解析。

4. 研究成果

ヒト泌尿器科癌細胞株を用いた予備実験においては、最初に、細胞数を調整した腎癌細胞株 ACHN、前立腺癌細胞株 PC-3、DU145、LNCaP をそれぞれ 20ml の健康成人血液中に混注し、研究サンプルを作成した。hTERT プロモーターと GFP を組み込んだ新規 adenovirus ベクターを用いた TRAD システムを使用して、血液中の癌細胞を同定することが可能であった。しかしながら、検出するためには血液 1ml 中に 100-1000 個の癌細胞が必要であり、精度は相当に低いものであった。

臨床研究として金沢大学医学倫理審査委員会承認のもと、泌尿器癌（腎細胞癌、腎盂尿管膀胱癌を含めた尿路上皮癌、前立腺癌、精巣癌）患者の血液サンプルを使用できる状況を整えたが検出力精度の点で実験系が未熟であり、結果を得るに至らなかった。検体を採取した泌尿器科癌患者は早期癌患者が多数含まれており、さらなる評価には進行癌患者のリクルートを行い、癌の進行度による相違について検討することが必要と考えられた。ベクターの改良による精度の向上も必要である。

前立腺癌の遠隔転移に関わる exosome を介した分子生物学的機序について解明するため、転移性の前立腺癌を想定し、まずヒト前立腺癌細胞株 LNCaP を用いて実験を行った。去勢抵抗性に関して検討する目的で、LNCaP のアンドロゲン受容体（androgen receptor: AR）を small interference RNA を用いてノックダウン（siAR）し、コントロールの LNCaP（NC-LNCaP）と siAR-LNCaP とを比較することとした。

それぞれの培養上清中の exosome 抽出を行った。1mL あたり $60\text{-}70 \times 10^8$ の exosome が存在すると考えられる状態において、exosome のマーカー蛋白である TAPA-1（CD81）と CD63 をウェスタンブロットで確認したところ、siAR-LNCaP では NC-LNCaP と比較しやや発現が低下していたものの、発現はしっかりと確認できた。さらに exosome の定量を ELISA によって行ったところ、siAR-LNCaP と NC-LNCaP とともに、細胞 10000 個につき約 40000 個の exosome が確認された。次に、exosome 内に含まれる micro RNA、exmiR を分析するため、それぞれについて miScript PCR array を行った。AR の抑制（siAR）によって発現量が低下した micro RNA として miR126-5p などが、逆に発現が上昇したのものとして miR19b-3p などが明らかとなった。これらが前立腺癌においてアンドロゲン除去療法を行っている際に転移を誘導する原因となる可能性が示唆された。

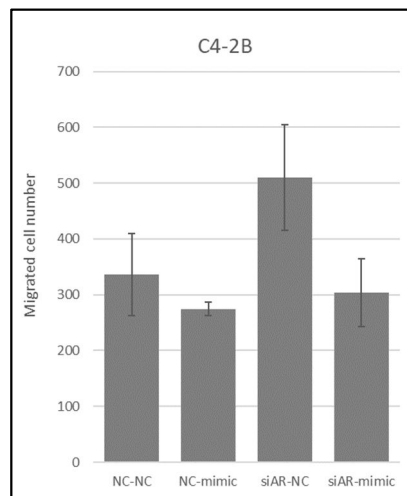
さらに、去勢マウスゼノグラフトで増殖が認められるヒト前立腺癌細胞株 C4-2B（オリジナルの細胞株は LNCaP）についても siAR を作成し、NC-C4-2B と siAR-C4-2B を比較した。これら二つのヒト前立腺癌細胞株、LNCaP 系統と C4-2B 系統の exmiR において、siAR によって共通して発現が抑制または亢進した exmiR は残念ながら存在しなかった。LNCaP では前記の miR126-5p のほか miR31-5p、C4-2B では miR449a が抑制されていた。特に、強い去勢抵抗性状態での exmiR の挙動を重視し、C4-2B 系統で得られた結果である miR449a をターゲットに絞り、その役割を検討することとした。

NC-C4-2B と siAR-C4-2B それぞれに miR449a を添加し増殖能を調べたが、どちらもほとんど変化を示さなかった。また、自己分泌作用で遊走能亢進を誘導する、前立腺癌細胞の去勢抵抗性にとって重要な分泌蛋白であるケモカイン CCL2 の発現についても、大きな変化を示さなかった。以上から、miR449a が前立腺癌細胞の表現型に大きく作用している可能性は少ないと考えられた。

そこで、新たに別の exmiR を含む miScript PCR array を前立腺癌細胞で行い、siAR で発現が抑制される exmiR の中からターゲットとして miR124 を見出した。miR124 は前立腺癌細胞

における最も強力なリガンドである dihydrotestosterone を添加すると誘導がかかるが、miR124 の阻害剤を用いても増殖には影響を与えないことが分かった。一方、siAR-C4-2B において miR124 発現が抑制されている状態で miR124 mimic を投与すると、遊走能が低下した(図)。本研究から AR に制御されている exmiR が前立腺癌においてアンドロゲン除去療法を行っている際(去勢抵抗性を獲得する孤高として) 転移を誘導する原因である可能性があることが明らかとなった。

泌尿器癌においては、TRAD システムを使用した CTC 検出の実用化にはまだ大きなハードルが存在するものの、去勢抵抗性前立腺癌では本研究で得られた exmiR のプロファイルをもとに、新規バイオマーカーを開発できる可能性が示唆された。



<引用文献>

- Kanaya T, Kyo S, Takakura M, Ito H, Namiki M, Inoue M. hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1998 Nov 23;78(5):539-43.
- Ito H, Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Inoue M, Namiki M. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer. *Clin Cancer Res*. 1998 Jul;4(7):1603-8.
- Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Hirano H, Takeda J, Yutsudo M, Inoue M. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res*. 1999 Feb 1;59(3):551-7.
- Kitagawa Y, Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Koshida K, Namiki M, Inoue M. Demethylating reagent 5-azacytidine inhibits telomerase activity in human prostate cancer cells through transcriptional repression of hTERT. *Clin Cancer Res*. 2000 Jul;6(7):2868-75.
- Takakura M, Kyo S, Nakamura M, Maida Y, Mizumoto Y, Bono Y, Zhang X, Hashimoto Y, Urata Y, Fujiwara T, Inoue M. Circulating tumour cells detected by a novel adenovirus-mediated system may be a potent therapeutic marker in gynaecological cancers. *Br J Cancer*. 2012 Jul 24;107(3):448-54.
- Izumi K, Fang LY, Mizokami A, Namiki M, Li L, Lin WJ, Chang C. Targeting the androgen receptor with siRNA promotes prostate cancer metastasis through enhanced macrophage recruitment via CCL2/CCR2-induced STAT3 activation. *EMBO Mol Med*. 2013 Sep;5(9):1383-401.
- Maida Y, Takakura M, Nishiuchi T, Yoshimoto T, Kyo S. Exosomal transfer of functional small RNAs mediates cancer-stroma communication in human endometrium. *Cancer Med*. 2016 Feb;5(2):304-14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高倉 正博 (TAKAKURA Masahiro) (20313661)	金沢医科大学・医学部・准教授 (33303)	
研究分担者	小中 弘之 (KONAKA Hiroyuki) (40334768)	金沢大学・医学系・協力研究員 (13301)	