

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07061

研究課題名(和文) アポトーシス誘導遺伝子PYCARDの前立腺腫瘍形成における役割の解明

研究課題名(英文) Role of PYCARD, an apoptosis-inducing gene, in prostatic tumorigenesis

研究代表者

福重 真一 (Fukushige, Shinichi)

東北大学・医学系研究科・特任教授

研究者番号：90192723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌モデルマウスを用い、ヒト前立腺癌において高頻度メチル化異常を示すPYCARD遺伝子の前立腺癌の発生・進展における役割を明らかにすることを目的とした。個体数が少ないため、結論を得るにはさらなる解析が必要であるが、前立腺特異的Ptenノックアウトマウスでは、Pycard遺伝子型が前立腺癌の前癌病変、腫瘍サイズに影響を及ぼす可能性がある。一方、ヒト前立腺癌組織を用いた解析結果よりPYCARDの不活化は、前癌病変ですでに生じている可能性があること、PYCARDの異常なDNAメチル化は、グリソンスコア7以上の前立腺癌の際立った特徴であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりジェネティックな異常だけでなくエピジェネティックな異常が前立腺癌の発生・進展に重要な役割を果たし、PYCARDプロモーター領域の高メチル化、PYCARD不活化によるアポトーシス阻害が前立腺癌の前癌病変、腫瘍形成を促進する可能性が示された。PYCARDは、前立腺癌の診断、治療のターゲットになる可能性もあることからさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Using mouse model of prostate cancer, we aimed to clarify the role of PYCARD gene, which shows promoter hypermethylation and inactivation in human prostate cancer. Although further analysis is needed to draw conclusions due to the small number of individuals, the genotype of Pycard may influence precancerous lesions and tumor size in prostate cancer in prostate-specific Pten knockout mice. On the other hand, analysis of human prostate cancer tissue suggested that inactivation of PYCARD may already occur in precancerous lesions and that aberrant DNA methylation of PYCARD is a distinctive feature of prostate cancers with Gleason score ≥ 7 .

研究分野：実験病理学

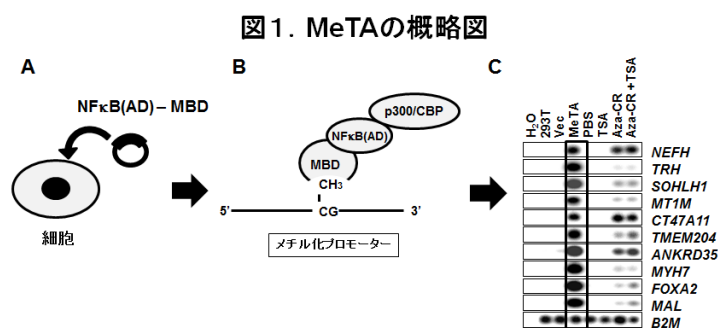
キーワード：癌 ゲノム 遺伝子 前立腺癌 PYCARD DNAメチル化 モデルマウス アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

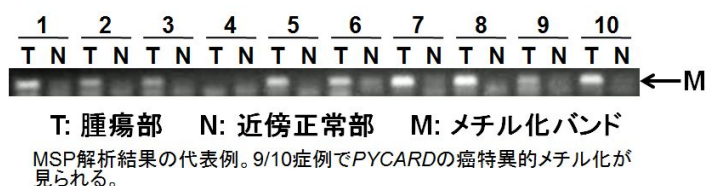
癌の発生・進展には複数のドライバー遺伝子(癌遺伝子、癌抑制遺伝子)異常の蓄積が必要とされる。遺伝子異常はジェネティックな異常、エピジェネティックな異常の2つに大別される。近年、次世代シーケンサーにより多くの癌で腫瘍 DNA を用いた塩基配列決定がなされ、ジェネティックな異常に関して多くの情報が得られた。前立腺癌でも *PTEN*、*TP53*、*NKX3.1*、*AR* 遺伝子異常が癌のドライバーとして同定されている (Robinson D et al, Cell 161: 1215-1228, 2015, Fraser M et al, Nature 541: 359-364, 2017)。一方、DNA メチル化、ヒストン修飾を始めとするエピジェネティックな異常もジェネティックな異常同様、癌の発生・進展に重要な役割を果たしているが、未だ、その全体像は掴めていない。エピジェネティックな異常の中でも DNA メチル化は遺伝子の転写抑制と密接に関連し、癌抑制遺伝子や DNA 修復遺伝子など正常な細胞機能を維持する上で重要な遺伝子を標的とする。前立腺癌では解毒作用に関与する *GSTP1* 遺伝子の高メチル化が良く知られるが、前立腺癌細胞株 LNCaP における *GSTP1* 発現回復は細胞増殖に影響を与えないなどドライバー遺伝子の可能性は低いと考えられている (Lin X et al, Am J Pathol 159: 1815-1826, 2001)。また、他の癌関連遺伝子のメチル化についても解析が進んでいるが、未だ腫瘍形成に密接に関連するメチル化遺伝子は見つかっていない (Chiam K et al, Cancer Lett 342: 248-256, 2014)。

我々は、癌における DNA メチル化異常を解析し、ドライバー遺伝子の同定、その癌化における役割を明らかにすることを目的とし、まず、癌細胞における DNA メチル化遺伝子探索法、MeTA (methyl-CpG targeted transcriptional activation) を開発した (図 1)。MeTA では、転写因子 NF- κ B の転写活性化ドメイン (AD) とメチル CpG 結合ドメイン (MBD) を繋いだ DNA コンストラクトを細胞にトランスフェクションする (図 1A) ことによって、メチル化プロモーター



細胞へのNF κ B(AD)-MBDコンストラクトの導入(A)は、p300/CBPのリクルートを介して(B)さまざまなメチル化遺伝子の転写再活性化を引き起こす(C)。

図 2. 前立腺癌における *PYCARD* プロモーターのメチル化



PYCARD は Pyrin ドメインと CARD (Caspase recruitment ドメイン) を含む蛋白でアポトーシス、炎症において重要な役割を果たしている。ASC、TMS1 と呼ばれ、乳癌、肺癌、大腸癌を始め多くの癌種でプロモーター領域の高メチル化が知られる。前立腺癌でも *PYCARD* プロモーター領域の高メチル化が 60% 以上の癌で生じるという報告があるが、その後の詳細な解析はおこなわれていない。本研究ではジェネティックな異常だけでなくエピジェネティックな異常が前立腺癌の発生・進展に重要な役割を果たすのかどうか、また、*PYCARD* 不活化によるアポトーシス阻害が前立腺腫瘍形成を促進するのかどうかマウス個体を用いて明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、前立腺癌において高頻度メチル化異常を示す *PYCARD* の役割を明らかにすることを目的として、前立腺癌モデルマウスと *Pycard* ノックアウトマウスを掛け合わせ、前立腺癌の発生・進展における影響を調べる。また、ヒト前立腺癌組織の免疫染色を用い、*PYCARD* 不活化の発生時期、臨床病理学的因子との関連を詳細に調べる。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌モデルマウスを用いた *Pycard* 発現低下の腫瘍形成における影響

前立腺癌モデルマウスの作製をおこなうため、*Pten*^{flox/flox} マウス凍結精子を理化学研究所バイオリソース研究センターより、前立腺特異的 Cre 発現マウス (*Pb-Cre4*) 凍結受精卵を

アメリカ NCI マウスレポジトリより入手した。また、*Pycard*^{+/-} マウスをがん研究会がん研究所より入手した。前立腺特異的な *Pten* ノックアウトマウスは生後 9 週で前癌病変 HGPIN (High-grade prostatic intraepithelial neoplasia) 17~26 週で浸潤性前立腺癌を形成するが、130 週まで死亡することはない。一方、*Pycard* ノックアウトマウスは、リポ多糖類などに対するカスパーゼ-1 を介した IL-1、IL-18 の分泌減少など免疫系の異常の他には際立った表現型を示さない。また、*Pb* プロモーターの特性から Cre リコンビナーゼは精子から供給された時にのみ前立腺特異的に発現し、*lox site* 間の組換えを引き起こす。まず、*Pten*^{flx/flx} マウス、*Pycard*^{+/-} マウス、*Pb-Cre4* マウスの掛け合わせによって *Pb-Cre4*; *Pycard*^{+/-}; *Pten*^{flx/flx} 雄マウス、*Pycard*^{+/-}; *Pten*^{flx/flx} 雌マウスを作製した。次に、これらを交配させることによって *Pb-Cre4*; *Pycard*^{+/-}; *Pten*^{flx/flx}、*Pb-Cre4*; *Pycard*^{+/-}; *Pten*^{flx/flx}、*Pb-Cre4*; *Pycard*^{+/-}; *Pten*^{flx/flx} 雄マウスを作製し、10 週、15 週、30 週で前立腺、肝臓、肺の各組織を回収後、HGPIN や浸潤性前立腺癌の発生時期や組織、腫瘍径、肝臓・肺への転移などを解析した。

(2) PYCARD 蛋白発現、DNA メチル化状態と臨床病理学的因子との関係

2008~2011 年に東北大学病院で根治的前立腺全摘除術を施行したヒト前立腺癌 50 症例を解析対象とした。どの症例も術前放射線療法、化学療法、アンドロゲン抑制療法を行っていない。組織標本は、ホルマリン固定後、パラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色によって評価し、病理医により組織病理学的診断とステージ分類を実施した。*PYCARD* の DNA メチル化解析のため、10 μm の組織切片を調製し、腫瘍部、近傍正常部の前立腺細胞 (~15 mm²) をライカ LMD7000 (Leica Microsystems GmbH) でマイクロダイセクションした。各マイクロダイセクションサンプルからの DNA は、直接、EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (Qiagen) でバイサルファイト処理した。*PYCARD* のメチル化特異的 PCR (MSP) の産物は、4%アガロースゲル電気泳動し、メチル化、非メチル化のバンド強度を ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) で定量化した。近傍正常部に比べ腫瘍部でメチル化と非メチル化の比が 2 倍以上の場合、腫瘍特異的メチル化があると定義した。一方、免疫染色のため、4 μm の組織切片を調製し、キシレンで脱パラフィン、エタノールで脱水した。免疫染色にはウサギ抗ヒト TMS1 (*PYCARD*) 抗体 (1000 倍希釈) を用いた。免疫反応性は 2 人の病理医によって評価し、核あるいは細胞質の染色された細胞が 10%未満の場合を陰性、10~50%の場合を弱陽性、50%以上の場合を強陽性とした。*PYCARD* の DNA メチル化あるいは免疫染色と臨床病理学的因子との関係は、フィッシャーの正確確率検定を用いて解析した。*PYCARD* の DNA メチル化あるいは免疫染色と生化学的再発との関係は、スチューデントの両側 t 検定を用いた。いずれも P 値 0.05 未満を有意とした。

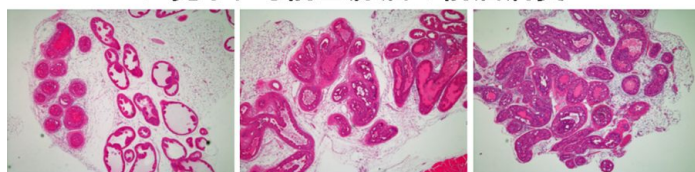
4. 研究成果

(1) 前立腺癌モデルマウスを用いた *Pycard* 発現低下の腫瘍形成における影響

まず、*Pb-Cre4* を保持する *Pten*^{flx/flx}; *Pycard*^{+/-}、*Pten*^{flx/flx}; *Pycard*^{+/-}、*Pten*^{flx/flx}; *Pycard*^{-/-} の雄マウスを作製し、生後 10 週、15 週、30 週で前立腺、肝臓、肺を採取し、*Pycard* の遺伝子型の違いによる前立腺癌の発生、進展における影響を解析した。それぞれの時期において以下の 3 点を見出した。

生後 10 週で前立腺に前癌病変が見られ、*Pycard*^{+/-} (n=1) では、前癌病変の過形成の割合が高く Carcinoma in situ (CIS) の割合は低かった。一方、*Pycard*^{+/-} (n=3)、*Pycard*^{-/-} (n=2) では、過形成病変よりも CIS の割合が増加していた (図 3)。

図 3. *Pycard* 遺伝子型の異なる 10 週齢マウスに見られる前立腺癌の前癌病変



Pycard^{+/+} *Pycard*^{+/-} *Pycard*^{-/-}
生後 10 週齢の *Pb-Cre4*; *Pten*^{flx/flx} マウス前立腺組織の HE 染色像 x40

生後 15 週では 10 週に比べ前癌病変のさらなる進行が見られた。*Pycard*^{+/-} のマウスは得られず、*Pycard*^{+/-} (n=2) と *Pycard*^{-/-} (n=4) では、過形成、CIS に組織的な違いは見いだせなかった。

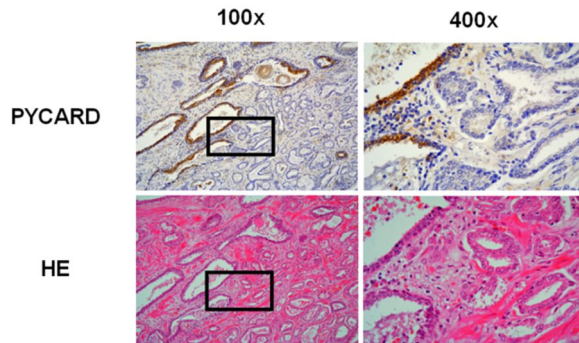
生後 30 週で一部に浸潤性前立腺癌が見られた。*Pycard*^{+/-} のマウスは得られず、*Pycard*^{+/-} (n=5)、*Pycard*^{-/-} (n=2) では、浸潤性前立腺癌に組織的な違いは見いだせなかったが、*Pycard*^{-/-} の方が *Pycard*^{+/-} に比べ腫瘍サイズが大きい傾向が見られた。

また、肝臓、肺への転移はいずれの *Pycard* 遺伝子型でも観察されなかった。マウス個体数、特に *Pycard* 野生型 (*Pycard*^{+/-}) の個体数が少ないため、今後さらに個体数を増やし検討し結論を得ることが必要である。

(2) PYCARD 蛋白発現、DNA メチル化状態と臨床病理学的因子との関係

ヒト前立腺癌 50 症例を用い、MSP 法による *PCYCARD* プロモーター領域のメチル化状態と免疫染色法による *PCYCARD* 蛋白発現を詳細に解析した後、臨床病理学的因子との関係を検討し、*PCYCARD* プロモーター領域の DNA メチル化がグリソンスコア ($P = 0.0063$) およびグレードグループ ($P = 0.002$) と関連することを明らかにした；腫瘍特異的な *PCYCARD* プロモーターの DNA メチル化はグリソンスコア 7 以上の症例では 96% (44/46) であったが、グリソンスコア 6 の症例では 25% (1/4) であった。一方、免疫染色の結果は、大部分の前立腺癌 (72%, 36/50) で *PCYCARD* 蛋白は正常上皮あるいは基底細胞で発現していたが、腫瘍細胞では発現は見られなかった (図 4)。DNA メチル化の結果から *PCYCARD* 免疫染色の結果を完全に説明することは出来なかったが、腫瘍部ではわずかに 8% (4/50) が *PCYCARD* 陽性を示したのに対し、正常な上皮細胞あるいは基底細胞では 80% (40/50) が陽性を示した (表 1)。 *PCYCARD* の免疫染色とグリソンスコア、グレードグループの間には相関は見られなかった。また、前癌病変 HGPIN が見られる標本が 5 症例あったが、すべて *PCYCARD* は陰性であった。これらの結果は、 *PCYCARD* の発現制御には DNA メチル化以外の機構が存在すること、 *PCYCARD* の不活化は、前癌病変ですでに生じている可能性があること、 *PCYCARD* の異常な DNA メチル化は、グリソンスコア 7 以上の前立腺癌の際立った特徴であり、前立腺腫瘍形成におけるアポトーシス回避において重要な役割を果たすことが示唆された。

図 4. *PCYCARD* の免疫染色と HE 染色



PCYCARD 免疫染色の代表例。*PCYCARD* 蛋白は、正常前立腺上皮あるいは基底細胞で発現し、腫瘍細胞で発現していない。下は HE 染色像。

表 1. 免疫染色の結果

		腫瘍部	
		<i>PCYCARD</i> (-)	<i>PCYCARD</i> (+)
近傍 正常部	<i>PCYCARD</i> (-)	10	0
	<i>PCYCARD</i> (+)	36	4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toshiya Miyauchi, Masahiro Takahashi, Koji Mitsuzuka, Yuri Saiki, Teppei Okubo, Paula M. Vertino, Akiteru Goto, Yoichi Arai, Akira Horii, and Shinichi Fukushima	4. 巻 2021
2. 論文標題 Aberrant hypermethylation-mediated suppression of PYCARD is extremely frequent in prostate cancer with Gleason score ≥ 7	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Disease Markers	6. 最初と最後の頁 8858905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/8858905	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮内隼弥、高橋正博、大久保鉄平、齋木由利子、三塚浩二、荒井陽一、堀井明、福重真一
2. 発表標題 アポトーシス誘導遺伝子PYCARDは前立腺癌でDNA高度メチル化により発現抑制される
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋正博、三塚浩二、伊藤明宏、堀井明、福重真一
2. 発表標題 IRX1の異常メチル化は前立腺癌に高頻度で発生し、増殖を活性化する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福重真一、宮内隼弥、高橋正博、齋木由利子、大久保鉄平、三塚浩二、荒井陽一、堀井明
2. 発表標題 PYCARDは前立腺癌において異常にメチル化し、発現低下している
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋正博、三塚浩二、齋木由利子、堀井明、荒井陽一、福重真一
2. 発表標題 ZNF750 gene promoter is aberrantly methylated in prostate cancer
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of Rochester		