

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592043

研究課題名（和文） 核マトリックス蛋白質に基づくホルモン不応性前立腺癌の新規標的分子の探索

研究課題名（英文） Exploration of a new molecular target of hormone refractory prostate cancer based on nuclear matrix proteins

研究代表者

井上 貴博（Takahiro Inoue）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80511881

研究成果の概要（和文）：

本研究は、核マトリックス蛋白質（Purine-element binding protein alpha;以下 PURA）がホルモン不応性前立腺癌の新規標的分子の探索に有用であることを示すことを目的として行われた。PC3 細胞に PURA を過剰発現させた細胞とコントロール細胞を比較した結果、PC3PURA 細胞は明らかに細胞増殖速度が低下し、免疫染色法で Ki67 の発現が低下していた。最後に前立腺癌の内視鏡的切除術などで得られた 22 例の去勢抵抗性前立腺癌組織を中心に、tissue microarray を作製した。今後は PURA や LASP-1 の発現が前立腺癌の進展にともないどの様に変化するかの検討を行っていく予定である。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this research is to analyze whether a nuclear matrix protein, Purine-element binding protein alpha (PURA), is useful for exploration for a new molecular target of hormone refractory prostate cancer.

Overexpression of PURA obviously lowered the growth speed of PC3 cells in vivo, and by immunohistochemistry, Ki67 expression was weaker in PC3 cells with PURA overexpression than in control PC3 cells. And we have established tissue microarray, including 22 cases of castration resistant prostate cancer, which were obtained by TUR. Using this microarray, we are planning to ask how those expression changes with progression of prostate cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：前立腺癌

科研費の分科・細目：泌尿器科 腫瘍学

キーワード：PURA LASP-1 前立腺癌 去勢抵抗性

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、本邦でも年々増加しており、死亡数も飛躍的に増加すると試算されている。早期の前立腺癌は手術や放射線療法により根治可能だが、根治不可能な進行癌や再発癌にはホルモン療法が標準治療と位置付けられている。しかし、ほぼ全例、平均2年の奏功期間の後、ホルモン療法に抵抗性を示すホルモン抵抗性前立腺癌(CRPC)となる。この予後不良なCRPCの治療としてDocetaxelの有効性が示されたが、その有効期間も短いため、CRPCの増殖機構の解明に基づいた新たな治療法の開発が急務である。

Nuclear matrix protein (NMP)は核の構造蛋白質であるが、核の形態のみならず核内の微小環境を司ることによって、DNAの転写や転写後調節に深くかかわり、遺伝子の発現に重要な役割を果たしている(Sayyed K. Zaidi, et al. Nat Rev Cancer 2007)。我々はこれまでに、細胞内シグナル伝達経路がCRPCへの進展に重要な役割を果たしていることを示してきたが(Inoue T, et al. Mol Endocrinol 2006, Kobayashi T, Inoue T, et al. Mol Endocrinol 2010)、最近の知見としてPTENなど前立腺癌の進展に関与するシグナル伝達分子が、NMPの構成要素のひとつPMLの発現によってその細胞内局在の制御を受けるとの報告がある(Song MS, et al. Nature 2008)。正常細胞と癌細胞とではNMPの発現様式に差異があることが示されていることも踏まえ(Getzenberg RH et al. Mol Endocrinol 1990)、我々は前立腺癌のアンドロゲン依存性、非依存性の違いで変化するNMPを解析することで、CRPCの増殖機構の解明につながると考えた。

これまで我々は、1) アンドロゲン依存性細胞株(LNCaP)と非依存性細胞株(LN96)のNMPを抽出、二次元電気泳動で展開し、差のあるspotをmass spectrometryで解析した。(図1) 2) その結果、Purine-rich element binding protein alpha(PURA)の発現がアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株に比べ、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株で有意に発現が低下し、LIM and SH3 protein 1(LASP-1)がアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株で有意に発現が上昇していることを見出した。(図2) (Inoue T, et al. Prostate 2008) 3) PURAをその発現低下を認めるPC3やDU145などのアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株に過剰発現させると、それらの細胞増殖は抑制された(Inoue T, et al. Prostate 2008)。

図1

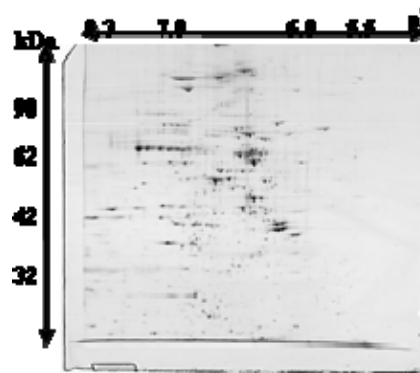
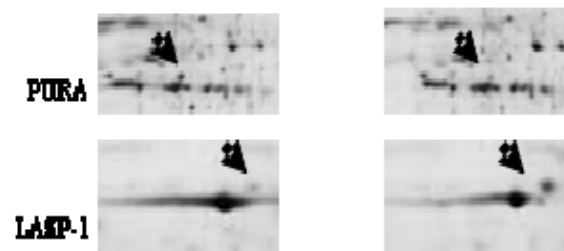


図2



2. 研究の目的

PURAの前立腺癌細胞における発現・機能解析を行い、ホルモン不応性前立腺癌における新規標的分子としての可能性を評価する。

3. 研究の方法

1. PURAの前立腺癌細胞増殖抑制機序を調べるためアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株(LNCaP:PURAの発現を認める)および非依存性前立腺癌細胞株(PC3:PURAの発現が低下している)にPURAを過剰発現させたときに認める遺伝子プロファイルの変化をDNA microarray (U133Plus 2.0; Affymetrix)にて解析した。

2. PURA特異的 siRNAを用いてPURAの発現を抑制した際、過剰発現にて変化を認めた遺伝子群が抑制されるかをRT-PCRにて検証し、PURAによって実際に制御される遺伝子を同定した。

3. PC3細胞を用いてPURAを強制発現した際、in vivoでもin vitroと同様に腫瘍増殖への影響を免疫不全マウス皮下移植モデルを用いて検証した。さらにKi67の発現を免疫染色で検討し、異種腫瘍の増殖抑制が、

細胞増殖の抑制によるものであることを検証した。

4. PURA のプロモーター領域のメチル化やヒストンのアセチル化が前立腺癌における PURA の発現を制御しているかどうかを、前立腺癌細胞に 5-AzaC ないし tricostainA の処理をして、PURA の発現変化を PCR にて解析した。

5. PURA の転写開始点から約 1000bp、600bp、300bp、100bp 上流で制御される luciferase vector を作成し、プロモーター解析を行った。

4. 研究成果

下図(図 3)のとおり microarray の結果を scatter plot すると LNCaP および PC3 に PURA を過剰発現させたときに共通して発現変化する遺伝子群を見出すことができた。共通して発現変化した遺伝子群のうち、発現低下しているものは見いだせなかったが、発現上昇している遺伝子は、scatter plot 上の右上方に位置する遺伝子群である(表 1)。

図 3

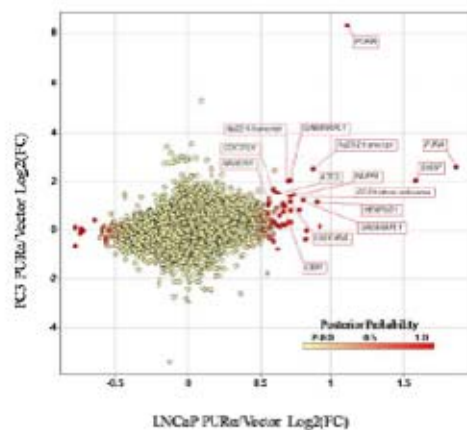


表 1

Probesets	Gene Title	Gene Symbol	Fold changes (PC3PURA/Vector)	Fold changes (LNCaPPURA/Vector)
202672_at	activating transcription factor 3	ATF3	2.88	1.57
208725_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	2.2	1.65
204021_at	purine-rich element binding protein A	PURA	6.09	3.68
204351_at	S100 calcium binding protein P	S100P	4.09	2.87
208869_at	GABA(A) receptor-associated protein like 1	GABARAPL1	2.27	1.74
209290_at	nuclear protein 1	NUPK1	2.74	1.66
211458_at	GABA(A) receptor-associated protein like 1 // GABA(A) receptor-associated protein like 3	GABARAPL1 // GABARAPL3	4.08	1.64
212914_at	chromobox homolog 7	CHX7	2.11	1.58
219806_at	Purine-rich element binding protein A	PURA	992	2.16
217168_at	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	HEKPD1	2.18	1.84
228523_at	nanos homolog 1 (Drosophila)	NANOS1	2.04	1.5
228561_at	cell division cycle 37 homolog (S. cerevisiae)-like 1	CDC37L1	9.11	1.52
228639_at	Transcribed locus, moderately similar to XP_001372598.1 similar FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1 [Monodelphin domest	—	2.58	1.64
295456_at	cDNA clone IMAGE:4819084	—	4.02	1.65
299370_at	Full length insert cDNA clone ZEO1AD4	—	5.66	1.63

これらの遺伝子群は小胞体ストレスや細胞分化に関与している遺伝子群が多かった。

2. LNCaP 細胞に PURA 特異的 siRNA を導入して PURA の発現を抑制したとき、上記 1 で発現上昇した遺伝子群の発現が低下するかどうかを検証した。図 4 のようにおもな遺伝子群は一貫して siRNA-PURA の導入により発現低下した。

3. 次に PC3 細胞に PURA を過剰発現させた細胞とコントロール細胞とを nude mouse の皮下に移植し、vivo での細胞増殖速度を観察した。その結果、PC3PURA 細胞は明らかにコントロール細胞に比べ細胞増殖速度が低下していた。さらに Ki67 の発現を免疫染色法で解析した結果、PC3PURA 細胞のそれは明らかにコントロール細胞に比べ、その発現が低下していた(図 5)。LNCaP 細胞に PURA を過剰発現ないし発現抑制してもその細胞増殖影響はないが、PC3 や DU145 では PURA を過剰発現すると細胞増殖を抑制された。アンドロゲン刺激のある時には LNCaP 細胞ではその増殖は AR の活性に強く依存するため、PURA の発現の有無にはあまり関係しないと思われる。一方、AR 陰性前立腺癌細胞では PURA の発現の有無で、その細胞増殖に影響がでるものと考えられた。LNCaP、PC3、DU145 細胞にそれぞれ 5-AzaC ないし tricostain A あるいは双方の処理をしても、PURA の発現に大きな変化を認めなかった。従って、プロモーター領域のメチル化あるいはヒストンのアセチル化の程度では上記 3 細胞の PURA の発現の差異を説明できないことが分かった(図 6)。

図 4

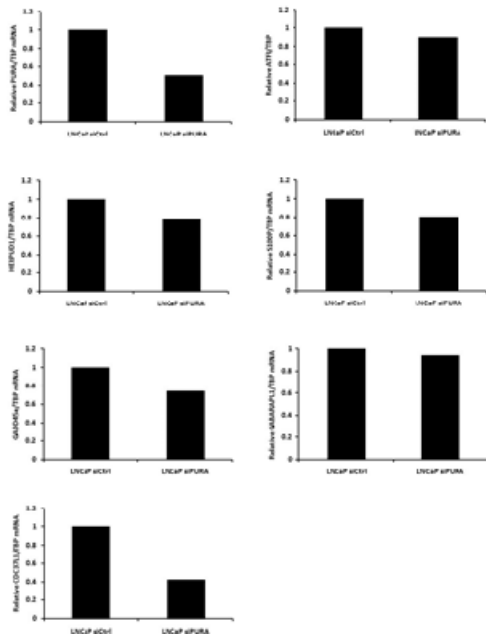


図 5

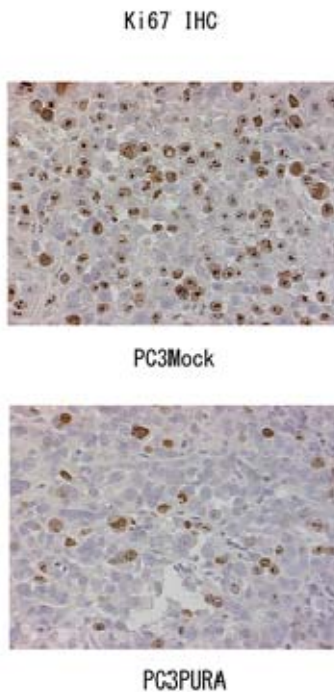
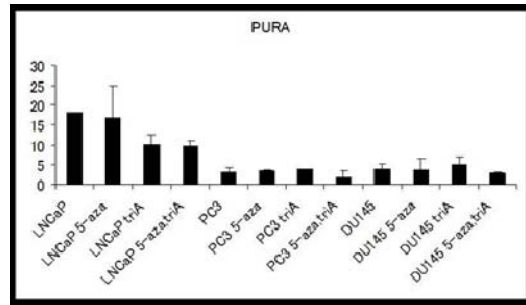
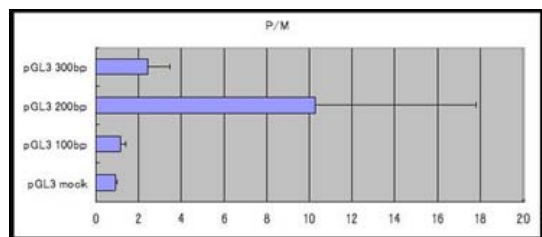
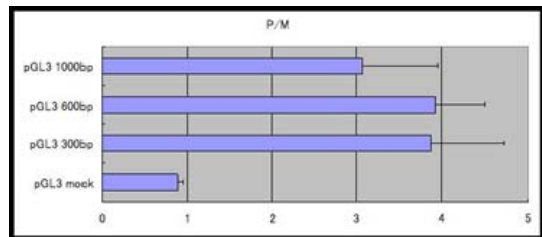


図 6



5. そこで、PURA の発現を制御する転写因子を検索する目的で PURA の発現制御するプロモーター領域の解析を行った。PURA の転写開始点から約 1000bp、600bp、300bp、200bp、100bp 上流で制御される luciferase vector を作成し、プロモーター解析を施行したところ、PURA の発現に重要な役割を果たすプロモーター領域は-200~-100bp にあることがわかった (図 7)。現在、target の転写因子の探索中である。

図 7



結語

アンドロゲン依存性前立腺癌細胞 (LNCaP) に比べ、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞 (PC3、DU145) において PURA の発現は抑制されており、本研究にて後者の細胞では PURA が細胞増殖を負に制御していることが分かった。とくに PURA は小胞体ストレスや細胞分化に関わる遺伝子群を制御しており、後者の細胞で PURA によって上記の遺伝子群が誘導されることで細胞増殖が抑制されることが推察された。PURA の発現はプロモーター領域のメチル化やヒストンのアセチル化、いわゆる epigenetic な変化で制御されているの

ではなかった。PURAの発現の制御は、そのプロモーター領域(とくに-200bp~0bp)に結合する転写因子の発現の差が関与していることが示唆された。この因子の探索は今後の研究課題である。

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 11 件) すべて査読有

1) Takahiro Inoue, Osamu Ogawa "Role of Signaling Transduction Pathways in Development of Castration-Resistant Prostate Cancer," *Prostate Cancer*, vol. 2011, Article ID 647987, 7 pages, doi:10.1155/2011/647987. 2011.

2) Mizowaki T, Takayama K, Norihisa Y, Ogura M, Kamba T, Inoue T, Shimizu Y, Kamoto T, Ogawa O, Hiraoka M. Long-term outcomes of three-dimensional conformal radiation therapy combined with neoadjuvant hormonal therapy for Japanese patients with T1c-T2N0M0 prostate cancer. *Int J Clin Oncol*. Oct 5. [Epub ahead of print] 2011

doi: 10.1007/s10147-011-0326-z

3) Xing ND, Ding ST, Saito R, Nishizawa K, Kobayashi T, Inoue T, Oishi S, Fujii N, Lv JJ, Ogawa O, Nishiyama H. A potent chemotherapeutic strategy in prostate cancer: S-(methoxytrityl)-l-cysteine, a novel Eg5 inhibitor. *Asian J Androl*. 13:236-41, 2011 doi: 10.1038/aja.2010.171

4) Shimizu Y, Hamazaki Y, Hattori M, Doi K, Terada N, Kobayashi T, Toda Y, Yamasaki T, Inoue TA, Kajita Y, Maeno A, Kamba T, Mikami Y, Kamoto T, Yamada T, Kanno T, Yoshikawa K, Ogawa O, Minato N, Nakamura E. SPA-1 controls the invasion and metastasis of human prostate cancer. *Cancer Sci*. 102:828-36, 2011

doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01876.x

5) Kobayashi T, Inoue T, Shimizu Y, Terada N, Maeno A, Kajita Y, Yamasaki T, Kamba T, Toda Y, Mikami Y, Yamada T, Kamoto T, Ogawa O, Nakamura E. (2010) Activation of Rac1 Is Closely Related to Androgen-Independent Cell Proliferation of Prostate Cancer Cells Both in Vitro and in Vivo. *Mol Endocrinol* 24 722-34, 2010 doi: 10.1210/me.2009-0326

6) Terada N, Shimizu Y, Kamba T, Inoue T, Maeno A, Kobayashi T, Nakamura E, Kamoto T, Kanaji T, Maruyama T, Mikami Y, Toda Y, Matsuoka T, Okuno Y, Tsujimoto G,

Narumiya S, Ogawa O. Identification of EP4 as a Potential Target for the Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer Using a Novel Xenograft Model. *Cancer Res* 70: 1606-15, 2010

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2984

7) Takashi Kobayashi, Yosuke Shimizu, Naoki Terada, Toshinari Yamasaki, Eijiro Nakamura, Yoshinobu Toda, Hiroyuki Nishiyama, Toshiyuki Kamoto, Osamu Ogawa and Takahiro Inoue Regulation of androgen receptor transactivity and mTOR-S6 kinase pathway by Rheb in prostate cancer cell proliferation. *Prostate* 70:866-874 2010

doi: 10.1002/pros.21120

8) Naoki Terada, Yosuke Shimizu, Toru Yoshida, Atsushi Maeno, Tomomi Kamba, Takahiro Inoue, Eijiro Nakamura, Toshiyuki Kamoto, Osamu Ogawa Antiandrogen Withdrawal Syndrome and Alternative Antiandrogen Therapy Associated with the W741C Mutant Androgen Receptor in a Novel Prostate Cancer Xenograft. *Prostate* 70:252-261, 2009

doi: 10.1002/pros.21058

9) Kobayashi T, Nakamura E, Shimizu Y, Terada N, Maeno A, Kobori G, Kamba T, Kamoto T, Ogawa O, Inoue T. Restoration of cyclin D2 has an inhibitory potential on the proliferation of LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 387(1):196-201, 2009

doi:org/10.1016/j.bbrc.2009.06.146

10) Zeng Y, Kulkarni P, Inoue T, Getzenberg RH. Down-regulating cold shock protein genes impairs cancer cell survival and enhances chemosensitivity. *J Cell Biochem* 107: 179-88, 2009

doi: 10.1002/jcb.22114

11) Inoue T, Maeno A, Talbot C Jr, Zeng Y, Yeater DB, Leman ES, Kulkarni P, Ogawa O, Getzenberg RH. Purine-rich element binding protein (PUR) alpha induces endoplasmic reticulum stress response, and cell differentiation pathways in prostate cancer cells. *Prostate* 69: 861-73, 2009

doi: 10.1002/pros.20936

[その他]

ホームページ等

<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 貴博 (Takahiro Inoue)
京都大学 医学研究科 助教
研究者番号 : 80511881

(2) 研究分担者

小川 修 (Osamu Ogawa)
京都大学 医学研究科 教授
研究者番号 : 90260611