

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791508

研究課題名（和文）3次元細胞培養したAR陰性前立腺癌細胞の遺伝子発現解析

研究課題名（英文）Gene-expression analysis of AR-negative prostate cancer cells

研究代表者

田村 賢司（TAMURA KENJI）

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：50464384

研究成果の概要（和文）：cDNA マイクロアレイを用いて、3次元培養したヒト前立腺癌細胞株（PC-3, DU145, 22Rv1, LNCaP）の遺伝子発現解析をおこなった。PSAとは独立した前立腺癌特異的なバイオマーカーを同定するため、AR陰性前立腺癌細胞株（PC-3 または DU145）で発現が高く、AR陽性前立腺癌細胞株（22Rv1 ならびに LNCaP）で発現の低い遺伝子の抽出をおこなった。抽出した遺伝子の中から、①分泌蛋白をコードする遺伝子、②前立腺癌臨床検体で高発現する遺伝子、③過去に癌での研究報告のない遺伝子の3つ条件で絞り込んだ結果、KURO3 遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：To identify prostate cancer (PC) specific biomarkers, which are independent of PSA, we analyzed gene expression profiles of PC cell lines (PC-3, DU145, 22Rv1 and LNCaP) by genome-wide cDNA microarray and found dozens of trans-activated genes in AR-negative PC cell lines (PC-3 and DU145), compared with AR-positive PC cell lines (22Rv1 and LNCaP). Among them, we identified a new biomarker, KURO3, as an overexpressed gene in PC-3 cell line and clinical high-grade prostate cancers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：マイクロアレイ、ゲノム、トランスレショナルリサーチ、癌、発現制御

1. 研究開始当初の背景

（1）我々は以前にcDNAマイクロアレイを用いて、ホルモン不応性前立腺癌の遺伝子発現プロファイルの解析を行っており、その解析技術を習得している。その際、前立腺癌の悪性度に関わる可能性のあるいくつかの候補

遺伝子を得ている（Tamura K et al. Molecular Features of Hormone-Refractory Prostate Cancer Cells by Genome-Wide Gene-Expression Profiles. Cancer Res. Jun 1;67(11):5117-5125, 2007）。ホルモン不応性前立腺癌は、今では去勢抵抗性前立腺癌と

呼ばれるようになった。

(2) 前立腺癌細胞ではアンドロゲンレセプター (AR) 経路が中心的な役割を担っており、この経路は去勢抵抗性となっても、維持されている。

(3) 代表的な AR の下流遺伝子は PSA である。PSA の発見は、前立腺癌の診断、治療において多大なる進歩をもたらした。特に PSA を測定することにより前立腺癌の早期診断が可能となり、早期治療による予後の改善に貢献した。

(4) しかしながら、PSA が比較的 low 値 (正常範囲のこともある) であるにもかかわらず骨転移を認める症例や PSA 上昇なく転移巣の増大を認める再燃症例が散見される。また、PSA は癌の悪性度 (Gleason grade) と必ずしも相関しないことが知られており、PSA が low 値であっても非常に悪性度の高い癌が見つかることもある。PSA と癌の進行度、悪性度の間にはいくつかの矛盾点があり、臨床上疑問を感じる事が多々ある。従って、前立腺癌の進行度や悪性度を正確に反映する新たなバイオマーカーの開発は、我々泌尿器科医にとって期待が大きく、臨床への貢献度は計り知れない。

2. 研究の目的

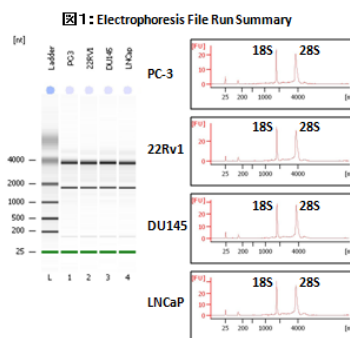
本研究は、前立腺癌の進行度や悪性度を正確に反映するバイオマーカーならびに新規治療法につながる分子標的遺伝子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

PSA に変わるバイオマーカーを発見するには、前立腺癌サンプルの条件を絞り込んだ解析が必要と考える。そこで本研究は、cDNA マイクロアレイを用いて、3次元細胞培養した AR 陰性前立腺癌細胞の遺伝子発現解析を行うことにより、PSA とは独立したバイオマーカーの開発と前立腺癌の新規治療法につながる標的分子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 前立腺癌特異的な新規バイオマーカー候補遺伝子の探索のため、まずヒト前立腺癌細胞株 (PC-3, 22Rv1, DU145, LNCaP) を 3次元培養した後に、各々の細胞から Total RNA を抽出して、Total RNA の品質に問題ないことを確認後 (図 1)、KURABO の DNA マイクロアレイ受託解析サービスを利用し、DNA マイクロアレイを行い、前立腺癌細胞株の遺伝子発現プロファイルを作製した。

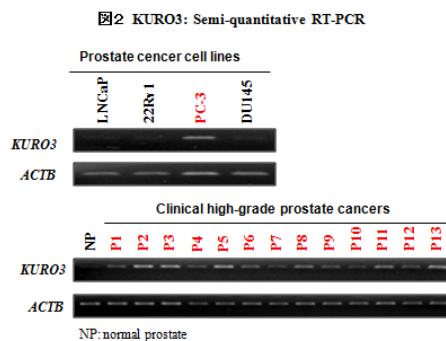


(2) PSA (前立腺特異抗原) とは独立したバイオマーカーを同定するため、PSA が発現していない AR (androgen receptor) 陰性前立腺癌細胞株 (PC-3 または DU145) での発現が高く、AR 陽性前立腺癌細胞株 (22Rv1 ならびに LNCaP) で発現の低い遺伝子の抽出を試みた。

抽出した遺伝子の中から、

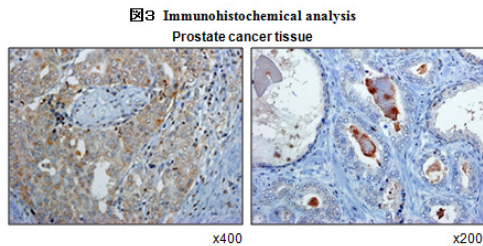
- ① 分泌蛋白をコードする遺伝子
 - ② 前立腺癌臨床検体で高発現する遺伝子
(以前に我々が行った前立腺癌臨床検体のアレイデータを参考)
 - ③ 過去に癌での研究報告のない遺伝子
- 上記①②③の条件を満たすバイオマーカー候補遺伝子として KURO3 (Kochi urology 3) を同定した (論文投稿前であり、正しい遺伝子名は省略)。

(3) まず RT-PCR によりマイクロアレイデータの確認をおこなった。KURO3 遺伝子の発現は、AR 陰性前立腺癌細胞株である PC-3 にのみ認められた。また臨床検体では、非癌者の正常前立腺上皮細胞 (NP) と比較して、前立腺癌患者の癌細胞において KURO3 の高発現を確認した (図 2)。PSA を発現している AR 陽性細胞株 (LNCaP, 22Rv1) で、KURO3 遺伝子の発現を認めなかったことから、PSA とは独立したバイオマーカーに成り得ると判断した。

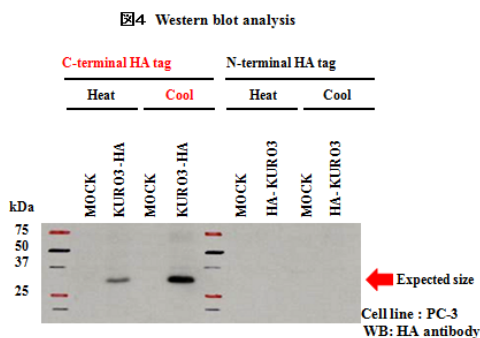


(4) つぎに KURO3 に特異的なポリクローナル抗体を作製して免疫組織染色を行った。RT-PCR 同様に、正常前立腺上皮細胞と比較して癌細胞で KURO3 蛋白の高発現を確認した

(図3)。とくに KURO3 蛋白の発現は Gleason score の高い癌細胞で強陽性を示した (data not shown)。現在、統計学的に有意差があるかどうか症例を増やして検討中である。また KURO3 蛋白の細胞内局在としては cytoplasm と extracellure に認められ、分泌蛋白の可能性が示唆された。



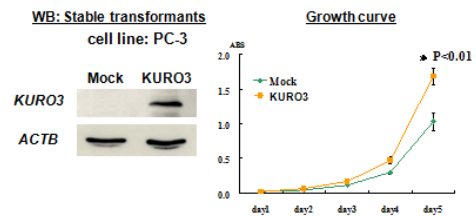
(5) そこで、KURO3 遺伝子を培養細胞に強制発現させた際に、培養上清中に KURO3 蛋白が分泌されるかどうか WB を用いて検討した。N 末と C 末にそれぞれ HA tag をつけた KURO3 発現ベクターを作製し、前立腺細胞株である PC-3 細胞に強制発現させた。培養上清を用いた WB を実施したところ、N 末に HA tag をつけた KURO3 蛋白は検出できなかったが、C 末に HA tag をつけた KURO3 蛋白は検出することができた。この結果から、KURO3 蛋白は N 末側が切断されて細胞外に分泌されることを明らかにした。



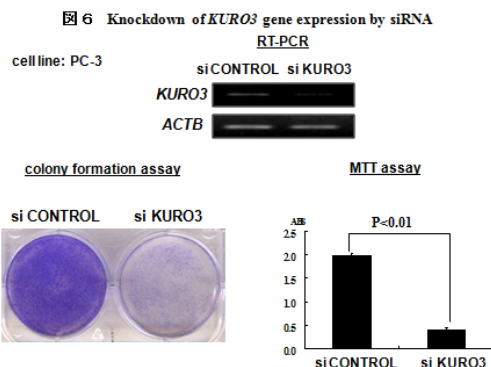
PC-3 cells were transiently transfected with pIREsneo3 / KURO3-expressing vector and pIREsneo3 empty vector (MOCK). We thought that KURO3 protein was cleaved at N-terminal site.

(6) さらに、KURO3 遺伝子の安定発現細胞株を作製し、細胞増殖に関与するかどうかについて検討した。KURO3 を過剰発現させると有意な細胞増殖の促進が観察された (図5)。

図5 KURO3 overexpression promoted PC cell growth.



(7) 一方、siRNA を用いて KURO3 遺伝子をノックダウンした場合に、細胞増殖が抑制されるかどうかについても検討した。結果は、siRNA により KURO3 の発現を抑制すると顕著な細胞増殖の抑制が観察された (図6)。



以上の結果をまとめると、

①cDNA マイクロアレイを用いて、3次元細胞培養した AR 陰性前立腺癌細胞と AR 陽性前立腺癌細胞の遺伝子発現解析をおこなった結果、PSA とは独立した新規バイオマーカー候補 KURO3 遺伝子を同定した。

② RT-PCR により、AR 陰性前立腺癌細胞株の PC-3 細胞で KURO3 の高発現を認めた。AR 陽性前立腺癌細胞株では KURO3 の発現は認めなかった。また臨床検体 (high-grade 前立腺癌) においても KURO3 の高発現を確認した。

③RT-PCR 同様に、免疫組織染色においても癌細胞で KURO3 蛋白の高発現を確認した。とくに KURO3 蛋白の発現は Gleason score の高い癌細胞で強陽性を示した。また KURO3 蛋白は、cytoplasm と extracellure に局在していた。

④KURO3 発現ベクターを作製し、前立腺細胞株である PC-3 細胞に強制発現させたところ、培養上清中に KURO3 蛋白を検出した。この結果から KURO3 蛋白が細胞外に分泌されていることを明らかにした。

⑤KUR03 を過剰発現させると有意な細胞増殖の促進が観察され、一方 siRNA により KUR03 の発現を抑制すると顕著な細胞増殖の抑制が観察された。

⑥前立腺癌で高発現している KUR03 遺伝子は、前立腺癌細胞の増殖に重要な役割を担うと考えられ、バイオマーカーや新規治療法の開発につながる可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

(1) 田村賢司、降幡睦夫、佐竹宏文、庵地孝嗣、山崎一郎、執印太郎

Identification of KUR03 overexpressed in high-grade prostate cancer、
第 69 回 日本癌学会学術総会
2010 年 9 月 22 日～24 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 賢司 (TAMURA KENJI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：50464384