

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462422

研究課題名(和文)細胞間輸送機構を標的としたホルモン療法抵抗性前立腺癌治療法確立に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Establishment of the new strategy targeted to intracellular communication mechanism in castration resistant prostate cancer

研究代表者

内木 拓 (NAIKI, Taku)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：50551272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ホルモン療法抵抗性前立腺癌(CRPC)には抗がん剤が使用されるが、薬剤が細胞内に効率よく分布せず、効果が乏しくなる。Connexin43(Cx43)によって構成されるGap junction(GJ)は、低分子物質を交通させ隣接細胞との連絡を維持し生体の恒常性を保持する。それゆえ、CRPCでGJが担う輸送機構が回復すれば、薬剤が細胞内に分布しやすくなる。今回私たちは動物モデルを用いた解析で、CRPCにおいてCx43の発現低下を認めることを初めて確認した。さらに、CRPC細胞株へCx43を安定導入することで、Cx43の発現上昇が、ホルモン療法下における細胞増殖低下を誘導することを証明した。

研究成果の概要(英文)：Prostate cancer growth is androgen sensitive, therefore, the first-line therapy of prostate cancer is androgen deprivation therapy like castration. However, the therapeutic efficacy is limited. Chemotherapy including taxane derivatives is next strategy in castration resistant prostate cancer (CRPC), however, the distribution of derivatives is various. Connexin 43 (Cx43) is a major gap junction (GJ) protein, and intracellular communication by using low molecular substances is normally performed through GJ. We previously established new CRPC animal models, and present study, cDNA microarray analyses revealed that Cx43 was suppressed in CRPC. Moreover, Cx43 regulates apoptotic signaling in castrated condition in new established Cx43 overexpressed prostate cancer cells. Therefore, GJ may play important roles in preventing castration resistant growth.

研究分野：医歯薬学

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 細胞間連絡能 細胞間連絡機構

1. 研究開始当初の背景

ホルモン療法抵抗性前立腺癌の進展・転移メカニズムに関しては不明な点が多く、ヒトの病態を良く模倣した安定的に骨に転移を起こす動物モデルはほとんどない。従って、この過程を個体レベルで模倣し、遺伝子やタンパクの発現及び機能変化を経時的にとらえることは、ホルモン療法抵抗性前立腺癌の増殖・進展メカニズムの解析に重要であると考えられる。

私たちは、ラットのプロバシン遺伝子プロモーターの下流に、SV40 ラージ T 抗原の遺伝子を結合して得られる PBSVT ジーンを、Sprague-Dawley (SD)系ラットの受精卵に導入し、前立腺癌のモデルラットを確立した。Transgenic rat for adenocarcinoma of the prostate (TRAP)と名付けられたこのモデルラットに発生する前立腺癌は、病理学的にもヒトの前立腺癌に類似した点を多く認めた。私たちは、このモデルラットを用いて、発がんメカニズムの解析や癌抑制物質などの研究を行ってきた。しかし TRAP から生じる前立腺癌は全て、去勢術などのホルモン療法で消失するため、ホルモン療法抵抗性前立腺癌の研究には不向きであった。

そこで私たちは、TRAP から得られた前立腺癌組織を、去勢したヌードマウス皮下に移植し、長期に継代することで、アンドロゲンの枯渇した状態でも、安定して増殖する腫瘍を得ることができ、さらにそこから細胞株を樹立できた。PCai1 と名づけた、この前立腺癌細胞株は、ヌードマウスの前立腺への同所移植や、尾静脈投与を行うことで、安定的に骨転移を起こすことが分かり、新たな転移動物モデルを確立することに成功した。

2. 研究の目的

上記の樹立した前立腺癌モデルにおいて、ホルモン療法抵抗性に関与する因子を探索

するため、抵抗性を獲得する前後で cDNA マイクロアレイ解析を行った。すると、ホルモン療法抵抗性の癌で発現低下を認め、これまで文献上報告のない、遺伝子 Connexin43 (Cx43)を新たに同定することが出来た。そこで、Cx43 に着目したホルモン療法抵抗性(去勢抵抗性)前立腺癌の増殖メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CRPC 皮下移植動物モデルにおける、ホルモン療法感受性の腫瘍と、去勢抵抗性の腫瘍における、Cx43 のタンパク発現解析を、蛍光免疫染色法を用いて検証する。

(2)ラット去勢抵抗性前立腺癌細胞株 PCai1 に GFP ベクターを用いて、Cx43 遺伝子を導入した安定細胞株を作製する。樹立した Cx43 導入前立腺癌細胞株を Charcoal stripped(CS)培地と通常培地で培養することで、生存に及ぼす影響を検証する。

4. 研究成果

(1) 去勢抵抗性の腫瘍では、ホルモン療法感受性の腫瘍と比較して、著明なCx43のタンパク発現低下を認めた。このことから、cDNA マイクロアレイ解析の結果をタンパクレベルで実証できた。(図1)

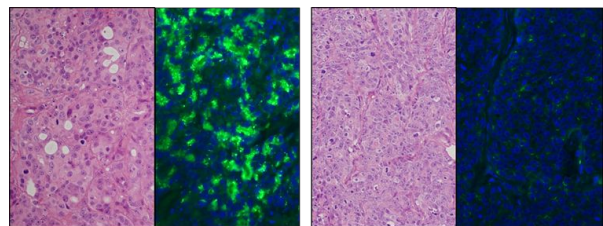


図1: ホルモン療法感受性の腫瘍(左)と去勢抵抗性の腫瘍(右)におけるConnexin 43のタンパク発現の差

(2) 次に、CRPC動物モデルから、私たちの研究室で樹立した、去勢抵抗性前立腺癌細胞株 PCai1を用いて、Cx43の安定導入株を樹立した。mockベクターを導入したPCai1と比較して、Cx43の発現を蛍光免疫染色で検証すると、図2に示すように、安定導入株で

は、細胞膜に局在していた。

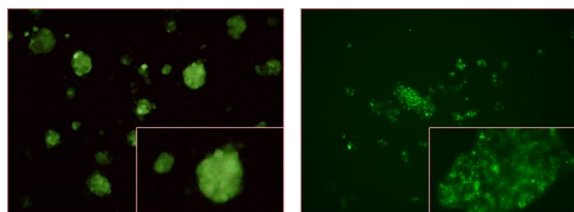


図2: 新規に樹立したPCa1 mockベクター導入株(左)とPCa1 Cx43安定導入株(右)発現の局在がそれぞれ細胞質と細胞膜で異なっている

これらの細胞株を用いて、通常培地とCS培地における細胞増殖の変化を検証すると、Cx43安定導入株において、CS培地における増殖が有意に低下することが証明された。(図3)

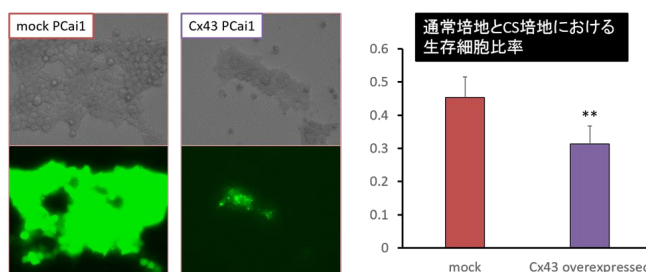


図3: CS培地におけるmock PCa1細胞とCx43 PCa1細胞の増殖形態(左)通常培地とCS培地における生存細胞数の比率(右)

以上より、ホルモン療法抵抗性(去勢抵抗性)前立腺癌は、Cx43を主要なタンパクとするgap junctionを抑えることで、細胞間の連絡能を低下させ、増殖を有利に行うメカニズムが存在していることが示された。今後、これらの調節メカニズムを検証することで、新たな抗がん剤治療の樹立に向けた解析を行っていく。

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4件)

1. Kato H, Naiki-Ito A, Naiki T, Suzuki S, Yamashita Y, Sato S, Sagawa H, Kato A, Kuno T, Takahashi S: Connexin 32 dysfunction promotes ethanol-related hepatocarcinogenesis via activation of Dusp1-Erk axis. *Oncotarget*. 2016; 7(2): 2009-2021. (査読あり)
DOI: 10.18632/oncotarget.6511
2. Sagawa H, Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yamashita Y, Suzuki S, Sato S, Shiomi K, Kato A, Kuno T, Matsuo Y, Kimura M, Takeyama H, Takahashi S: Connexin 32 and luteolin play

protective roles in non-alcoholic steatohepatitis development and its related hepatocarcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*. 2015; 36(12): 1539-1549. (査読あり)

DOI: 10.1093/carcin/bgv143

3. Etani T, Suzuki T, Naiki T, Naiki-Ito A, Ando R, Iida K, Kawai N, Tozawa K, Miyata N, Kohri K, Takahashi S: NCL1, a highly selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, suppresses prostate cancer without adverse effect. *Oncotarget*. 2015; 6(5): 2865-2878. (査読あり)
DOI: 10.18632/oncotarget.3067

4. Naiki T, Naiki-Ito A, Asamoto M, Kawai N, Tozawa K, Etani T, Sato S, Suzuki S, Shirai T, Kohri K, Takahashi S: GPX2 overexpression is involved in cell proliferation and prognosis of castration resistant prostate cancer. *Carcinogenesis*. 2014; 35(9): 1962-1967. (査読あり)
DOI: 10.1093/carcin/bgu048

[学会発表](計4件)

1. Naiki T, Naiki-Ito A, Kawai N, Etani T, Shirai T, Kohri K, Yasui T, Takahashi S: Establishment of castration resistant prostate cancer animal model, and analyses for new innovative therapy. 第74回日本癌学会・学術総会、2015.10.8-10、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
2. Naiki T: Establishment of castration resistant prostate cancer animal model, and analyses for new innovative therapy. Hallyum and Nagoya City University joint symposium. 2016.7.8、名古屋市立大学病院(愛知県名古屋市)
3. Naiki T, Naiki-Ito A, Asamoto M, Kawai N, Tozawa K, Etani T, Sato S, Suzuki S, Shirai T, Kohri K, Takahashi S: GPX2 overexpression is involved in cell proliferation and prognosis of castration resistant prostate cancer. 第4回前立腺生物学シンポジウム 伊勢志摩 2014、2014.6.26-27、鳥羽国際ホテル(三重県鳥羽市)
4. 内木 拓、河合 憲康、安藤 亮介、恵谷 俊紀、戸澤 啓一、郡 健二郎:(第

7 回ヤングリサーチグラント受賞者記念
講演) 去勢抵抗性前立腺癌の発症に関わ
る GPX2 の同定とその機能解析。第 102
回日本泌尿器科学会、2014.4.24-27、神戸
国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポー
トピアホテル(兵庫県神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内木 拓 (NAIKI, Taku)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 50551272

(2) 研究分担者

河合 憲康 (KAWAI, Noriyasu)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 20254279

安藤 亮介 (ANDO, Ryosuke)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 30381867

惠谷 俊紀 (ETANI, Toshiki)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究
員
研究者番号: 30600754

飯田 啓太郎 (IIDA, Keitaro)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床
研究医
研究者番号: 30713945

内木 綾 (NAIKI, Aya)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 20509236