

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07942

研究課題名(和文) 前立腺幹細胞抗原(PSCA)を分子標的とする膵臓癌の創薬基盤の構築

研究課題名(英文) Analysis of Prostate Stem Cell Antigen (PSCA) dependent mechanism of pancreatic cancer

研究代表者

高橋 哲史 (Takahashi, Tetsufumi)

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40449004

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)：前立腺幹細胞抗原PSCAは、膵臓がん組織において高発現し、転移・悪性化において重要であると考えられている。本研究では、ヒト膵臓がん細胞株KMP2を細胞低吸着シャーレによる3D培養を行い、PSCAの高発現細胞培養系の構築を行なった。また、構築した培養系を用いた解析により、PSCAはNumbにより発現制御されていることが明らかとなった。また、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、転移膵臓がん組織で発現上昇の認められる複数の遺伝子が3D培養KMP2細胞で上昇し、一部遺伝子においては、PSCAと同様にNumbにより発現制御されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Prostate Stem Cell Antigen (PSCA) is expressed in pancreatic cancer tissue and considered as the crucial factor for cancer metastasis. In this study, we established the new culture method of pancreatic cancer cells using cell repellent culture dishes. In this 3D condition, human pancreatic cancer cell KMP2 expressed the high level of PSCA mRNA and protein. In this connection, we identified Numb as one of PSCA regulating factor. In addition, microarray analysis revealed that the expressions of several genes, which reported to be highly expressed in metastatic pancreatic cancer tissue, were up-regulated in KMP2 cultured using 3D method. In these genes, some genes are also regulated by Numb.

研究分野：病態生理 腫瘍学

キーワード：膵臓がん PSCA 3D培養

1. 研究開始当初の背景

前立腺幹細胞抗原(Prostate Stem Cell Antigen: PSCA)は前立腺癌や膵臓癌で過剰発現し(Argani et al., Cancer Res. 2001; Gu et al., Oncogene 2000)、これら腫瘍の悪性化に關与すると考えられている。また、疾患と一塩基多型(SNPs)との相関を疫学的解析するゲノムワイド関連解析(GWAS)の結果、PSCA 遺伝子の5'-非翻訳領域(5'-UTR)における SNP(rs2294008) のリスクアレル(Tアレル)が、様々な癌の発症因子となることが示唆されている(Sakamoto et al., Nat Genet. 2008; Tanikawa et al., 2012; Fu et al., PNAS 2012)。この SNP は、通常の翻訳開始点の上流に新たな翻訳開始点を生じ、野生型よりも9アミノ酸残基多い変異型の蛋白質が産生される。この変異型 PSCA は GPI アンカー型の膜局在蛋白質として発現し、野生型の細胞質と異なる局在を示すと考えられている。現在、米国にて膜局在変異型 PSCA に対するモノクローナル抗体の転移性膵臓癌に対する治療効果の治験が行なわれている。これまでの結果、PSCA 高発現群で一定の効果が認められている。さらに PSCA を標的とした膵臓癌転移診断法の治験も行なわれており、本因子もしくは本因子の発現調節因子は、膵臓癌の治療薬ならびに診断薬の標的因子になり得るものと考えられる。しかしながら、変異型 PSCA に特異的な発現調節機構や、リガンドを含めた他の因子との相互作用については、ほとんど明らかでない。

上述の通り、変異型 PSCA は少なくとも膵臓癌の転移に重要な役割を果たしていると考えられる。一方で、驚くべきことに日本人の rs2294008 は、変異型(Tアレル)と野生型(Cアレル)が同程度存在するという分析結果が示されており(JSNP データベース参照) 癌組織での PSCA の蛋白発現は、主として rs2294008 の SNP 以外の未知の因子による制御に起因するものと考えられる。そのため、癌特異的な PSCA 発現調節因子は、特異的な抗癌剤開発の標的因子となり得るものと考えられる。一方、野生型の PSCA よりゲル電気泳動上で高分子に位置する変異型 PSCA は、N-グリコシダーゼ処理により野生型程度に低分子化が起きると報告されている。そのため、変異型 PSCA は翻訳後に N 結合型糖鎖修飾を受けるものと考えられ、この糖鎖修飾は、変異型 PSCA の活性に重要な役割を果たしている可能性も考えられる。

2. 研究の目的

膵臓がんの PSCA の発現制御機構の解析を行う為、転移性膵臓がん細胞を低吸着シャーレによる 3D 培養を行い、PSCA の発現誘導効果を検討する。さらに構築した培養系を用い、PSCA 発現調節機構の解析を行う。

3. 研究の方法

1) 使用した細胞

ヒト肝転移膵臓がん細胞 KMP2 およびヒト腹水転移膵臓がん細胞 AsPC-1 を用いた。

2) 遺伝子発現解析

膵臓がん細胞を通常のプラスチックシャーレを用いた 2D 培養、もしくは細胞低吸着シャーレを用いた 3D 培養を 7 日間行った後、RNA を抽出した。得られた RNA を用い、affymetrix 社の HTA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析および定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析を行なった。

3) 蛋白質発現解析

各種培養細胞の抽出液を用いて、ウエスタンブロッティングによる蛋白質発現解析を行なった。また、一部のサンプルについては、N-glycosidase F 処理することにより、蛋白質に結合する N 結合糖鎖を切断した。

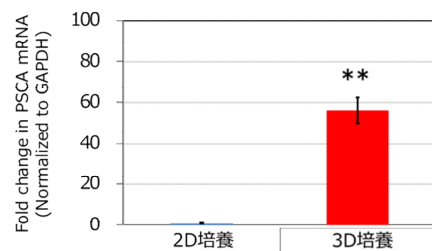
4) Numb ノックダウン細胞の作製

Numb に対するそれぞれ標的配列の異なる 2 種類の shRNA を発現するレンチウイルスベクターを作製し、これらを KMP2 細胞に感染させた。その後、抗生物質(ピューロマイシン)存在下での選択培養を行い、Numb のノックダウン細胞株を作製した。

4. 研究成果

1) KMP2 細胞における PSCA mRNA 発現量に対する 3D 培養の影響

2D 培養および 3D 培養した KMP2 細胞より RNA を抽出し、定量的 RT-PCR にて PSCA mRNA の発現を検討した。その結果、2D 時に比べ、3D 培養時において 50 倍以上 PSCA mRNA の発現増加が認められた(図 1)。



Values are means \pm SD. Data were statistically analyzed by unpaired t test with Welch's correction. ** $p < 0.01$.

図 1. 3D 培養時における PSCA mRNA 発現増加

2) 3D 培養の PSCA 関連蛋白質発現に対する影響

rs2294008T アレル(変異型)を有する KMP2 細胞を 3D 培養した結果、蛋白質レベルでも PSCA の顕著な発現増加が認められた。また、この PSCA 蛋白質は想定分子量より大きく、

比較的ブロードなバンドとして検出された(図2)。そこで、この細胞抽出液を N-glycosidase F 処理し、再度抗 PSCA 抗体を用いて解析したところ、想定分子量まで低分子シフトした。そのため、3D 培養した KMP2 細胞で発現誘導される PSCA 蛋白質は、高度に N-結合糖鎖により修飾されていることが明らかとなった。

一方、rs2294008C (野生型) アレルを有する AsPC-1 においては、3D 培養時において若干の PSCA 蛋白質の発現誘導が認められた。

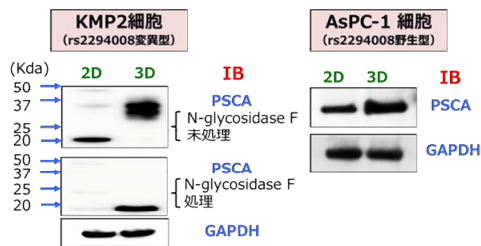


図2. 3D 培養の PSCA 蛋白質発現に対する影響

3) 3D 培養時における Musashi2 (Msi2) および Numb の発現

膵臓がん組織において Msi2 が発現上昇し、この Msi2 が Numb の発現を抑制することにより、膵臓がんの発生および悪性化進展すると報告されている (Oncotarget 2017; 8:14359-14373)。そこで、3D 培養 KMP2 における Msi2 および Numb の蛋白質発現を 2D 培養と比較した結果、Msi2 の発現増加および Numb の発現低下が認められ(図3) 臨床の膵臓がん患者と同様な発現パターンが認められた。

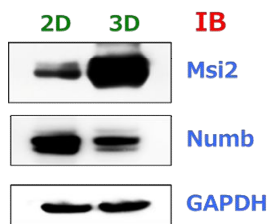
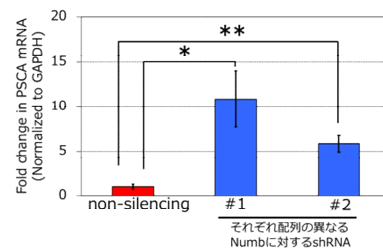


図3. KMP2 細胞における Msi2 および Numb の発現について

4) 膵臓がんにおける Numb 依存的な遺伝子発現調節機構の解析

研究代表者は以前の胃粘膜傷害修復過程における分子発現機構を解析した際に、Numb が PSCA の発現調節を行うと報告している (Takahashi et al., PLOS ONE 2013; 8:e53540.)。そこで、Numb に対し、それぞれ標的配列の異なる 2 種類の shRNA を発現するレンチウイルスを作製し、Numb ノックダウン KMP2 細胞を作製した。これら細胞における PSCA の mRNA 発現を定量的 RT-PCR により解析した結果、コントロール群に比べ Numb ノッ

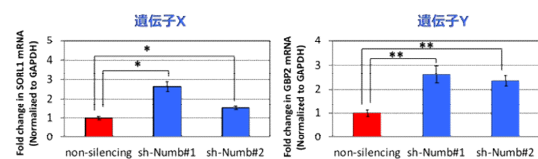
クダウン群において PSCA mRNA の有意な発現上昇が認められた(図4)。以上の結果より、膵臓がん細胞においては、PSCA は Numb により負に発現制御されていることが明らかとなった。さらに、2D および 3D 培養した KMP2 細胞より RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行なった。さらに得られた結果について、膵臓がんが転移した肝臓組織と正常肝臓組織での mRNA 発現を比較した既報のマイクロアレイのデータ (Barry S et. al., Clin Exp Metastasis 2013) および転移の無い原発膵臓がん組織と近接正常膵臓組織での mRNA 発現を比較した既報マイクロアレイデータ (Donahue TR., Clin Cancer Res. 2012) を再解析したものと比較解析した。その結果、KMP2 細胞において 3D 培養時に 2 倍以上遺伝子発現上昇し、かつ膵臓がん転移肝臓組織で発現上昇し、さらに転移の無い原発膵臓がん組織で発現上昇の認められない遺伝子について解析した結果、14 遺伝子がピックアップされた。これらは膵臓がん転移特異的遺伝子である可能性があり、これらのうち、いくつかの遺伝子においては、Numb ノックダウン細胞において遺伝子発現上昇が認められ(図5) PSCA 同



様に Numb により負に発現制御されていることが明らかとなった。

Values are means \pm SD. Data were tested by ANOVA, followed by Tukey-Kramer's posttest. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図4. Numb ノックダウン KMP2 細胞における PSCA mRNA の発現



Values are means \pm SD. Data were tested by ANOVA, followed by Tukey-Kramer's posttest. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図5. Numb ノックダウン KMP2 細胞における転移関連遺伝子の発現

以上の結果より、本研究において、細胞低吸着シャーレを用いた 3D 培養により、転移膵臓がん細胞を臨床組織と同様に PSCA を高発現する細胞に誘導できることがあきらかとなった。また、この PSCA の発現調節因子として Numb が同定された。さらに、Numb により、膵臓がん転移に関わる複数の遺伝子の発現が負に制御されている可能性が示唆さ

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)

[学会発表](計 6 件)

高橋哲史、中村正彦、鈴木秀和. 膵臓がん細胞における Numb 依存的分子制御機構の解析. 第 36 回サイトプロテクション研究会、5月19日、京都、2018年

高橋哲史、五十鈴川和人、中村正彦、鈴木幸男、鈴木秀和、金成俊. 膵臓がん転移における Numb の役割. 日本薬学会第 138 年会、金沢、3月28日、2018年

高橋哲史、五十鈴川和人、中村正彦、鈴木秀和、金成俊. 3D 培養細胞を利用した抗膵臓がん新規治療薬の創薬研究、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017、京都、8月26日、2017年

高橋哲史、鈴木秀和、佐伯宣久、鈴木幸男、中村正彦、五十鈴川和人、金成俊. 3D 培養を用いた膵臓がん細胞培養系の構築および薬剤探索への応用. 日本薬学会第 137 年会、仙台、3月27日、2017年

高橋哲史、飯塚美有、鈴木秀和、鈴木幸男、中村正彦、五十鈴川和人、金成俊. 新規膵臓癌治療薬探索のための *in vitro* 培養系の構築及び和漢薬への応用. 第 33 回和漢医薬学会学術集会、東京、8月27日、2016年

飯塚美有、高橋哲史、佐伯宣久、鈴木幸男、中村正彦. 膀胱癌細胞における前立腺幹細胞抗原 (PSCA) 発現に及ぼす 3 次元培養の影響. 日本薬学会第 136 年会、横浜、3月27日、2016年.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 哲史 (Tetsufumi, Takahashi)
横浜薬科大学・薬学部漢方薬学科・講師
研究者番号：40449004