

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10597

研究課題名(和文) CRPCにおけるCAVEOLIN-1、2関連シグナル伝達を介した新規治療法の探索

研究課題名(英文) Development of new treatment strategy targeting CAVEOLIN-1 and 2 related signaling axis

研究代表者

賀本 敏行(Kamoto, Toshiyuki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：00281098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)患者36例とホルモン感受性前立腺癌(HSPC)患者22例の血液サンプルを用いて、Caveolin-1(CAV1)とCAV2蛋白の血漿中濃度を測定したところ、HSPC患者と比較して、有意にCRPC患者でCAV1とCAV2の発現が増加していた。癌細胞株には、同様にCRPC細胞株であるPC3やDU-145細胞でCAV1とCAV2の発現が増加していた。PC3細胞を用いたin vitroの実験系で、CAV1とCAV2のノックダウンにより、PC3細胞の遊走能の低下が確認された。ビメンチンやN-cadherinなど複数の分子の発現に変化がみられており、現在解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：We evaluated that plasma concentration of Caveolin (CAV)1 and CAV2 was increased in castration resistant prostate cancer (CRPC) patients compared with androgen sensitive prostate cancer patients. Next, we introduced CAV1 and CAV2 specific small interfering into PC3 cell line (CRPC) to knock-down (KD) both molecules. We performed cell migration assay using PC3 prostate cancer cells and compared the results between CAV1-KD, CAV2-KD and negative control PC3 cells. In addition, we performed real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and RT2 Profiler PCR Array analysis to identify factors that influence migration. As a result, we observed significant downregulation in cell motility of CAV1-KD and CAV2-KD PC3 cells compared with negative control. RT-qPCR revealed that the expression of vimentin and N-cadherin were downregulated in CAV1-KD PC3 cells. In addition, PCR array revealed decreased expression of MGAT5, MMP13, MYCL in CAV1-KD PC3, and ETV4, FGFR4 and SRC in CAV2-KD PC3.

研究分野：泌尿器科

キーワード：前立腺癌 去勢抵抗性前立腺癌 カベオリン-1 カベオリン-2

1, 研究開始当初の学術的背景

(1)CAV1 および CAV2 はほとんどすべての細胞膜上に認められるカベオラとよばれる細胞膜陥没構造を構成する主要蛋白の一つであり (Sternberg PW et al., Nat Cell Biol., 1999) 泌尿器癌における高発現が報告されている。我々はこれまでに CRPC 患者血漿および CRPC model cell line である PC3 において CAV1 発現が亢進していることを見出し、PI3K-AKT シグナル pathway が関与している可能性があることが示唆された (Sugie S, Kamoto T et al., Anticancer Res., 2013)。さらに最近の報告では CAV1 のサブタイプである CAV2 が CAV1 とクロストークを形成し、PC の増殖に促進的に働くと推測されている (Nolwenn Briand et al., Biochimie., 2012)。しかしその詳細なメカニズムは明らかになっていない。

(2)近年、CRPC への進展に Androgen receptor (以下 AR) のみならず Follicle stimulating hormone receptor (以下 FSHR) が深く関与している可能性があるとの報告があり (Gartrell BA et al., Urol Oncol., 2013) その重要性が示されている。従来より、この FSHR と卵巣癌の進展には密接な相関があることが多数報告されており (Zhang Z et al., Cancer Letter., 2013) さらに注目すべきことに近年 CAV1、2 発現により、FSHR がリン酸化などを介して活性化し、その結果、卵巣癌の進展に促進的に作用する可能性まで示唆されている (Sanna E et al., Exp Cell Res., 2007)。一方、PC において CAV1、2 による AR のリン酸化を介した癌進展に関する報告 (Bennett N et al., IUBMB Life., 2009) は散見されるものの、CAV1、2 と FSHR に関する報告は見当たらない。

2, 研究の目的

本研究では、CAV2 の発現および機能、そして CAV2 の CAV1 との関連 (クロストーク) をさらに解析し、これら分子を抑制することで PI3K/AKT 情報伝達系ならびに TGF beta 耐性に及ぼす影響を検討する。同時に AR ないし FSHR などの性ホルモン受容体の発現および機能にどう影響するかを確認する。

本研究により、CRPC における CAV2 および CAV1 のシグナル伝達活性化経路、性ホルモン受容体活性化経路の双方の解明を行いたいと考えている。この解明により、上記 CRPC に対するセカンドライン以降の薬剤と別の機序を利用した新規薬剤の開発が期待できると考える。

3, 研究の方法

(1)臨床サンプルの CAV2 の発現解析および CAV1 発現量との相関解析

CRPC を含む前立腺患者の血液及び組織などの臨床サンプルを用いて CAV2 の発現を同定する。血液中 CAV2 の発現はウエスタンブロット並びに EILSA 法で、癌組織は、RT-PCR、Realtime PCR、ウエスタンブロットにより検討する。また組織中 CAV2 の発現は免疫組織染色にて検討する。これら CAV2 の発現量と CAV1 の発現量の間に関係があるかも合わせて検討する。臨床サンプルは当院倫理委員会で承認を受けた同意書にて、承諾が得られた患者から採取した血液・組織サンプルを使用する。臨床データと共に統計的解析を行う。

(2)臨床検体中の AR および FSHR 発現量の解析
臨床検体中の AR および FSHR 発現量は RT-PCR、Realtime PCR にて mRNA レベルを、市販されている ELISA kit を用いて蛋白レベルを測定し、得られた結果と **計画 1** で得た CAV2、CAV1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

発現量とともに統計的解析を行う。

(3)CRPC モデル細胞株 (DU145 および PC3) を用いた CAV2 の発現、機能解析と細胞内 AR および FSHR 発現量の測定

上記の CRPC モデル細胞株において CAV1 が強発現することがすでに報告されているため、今回は DU145 および PC3 において CAV2 の発現を mRNA 並びにタンパク質レベルで確認する。さらに細胞内の AR および FSHR 発現量も測定し、ホルモン感受性細胞株 (LNCaP) と比較検討する。また、CAV1 同様、CAV2 により活性化されていると推測されている、PI3K/AKT 情報伝達系ならびに TGFbeta 耐性について検討する。

(4)CAV 2 および CAV1 遺伝子 knock down 細胞株の作製と CAV2 および CAV1 機能解析

CAV2 および CAV1 特異的 siRNA 並びに shRNA 発現レトロウイルスベクターを用いて、両分子高発現細胞株に対して導入し、CAV2、CAV1 の knock down を行う。CAV1 KD 細胞株とコントロールベクター導入株との間で、細胞増殖、細胞周期、アポトーシス、PI3K-AKT 情報伝達系の活性化、浸潤能の検討を行う。同時に、両者における癌細胞内の AR および FSHR 発現量の増減の有無を解析する。

(5)In vivo 前立腺癌モデルマウスにおける CAV2 および CAV1 の機能解析

CAV1 および CAV2 高発現 CRPC 細胞および CAV1、CAV2 KD CRPC 細胞をそれぞれ SCID マウスに移植、前立腺癌モデルマウスを作成する。これらのモデルマウスを用いて、それぞれの前立腺組織中における AR および FSHR 発現量を比較検討する。さらにこれらのモデルマウスを生存曲線の作成し、PI3K/AKT 情報伝達系ならびに TGFbeta 耐性を介した癌増殖能および転移能について病理学的に比較検討

する。

4. 研究成果

(1)臨床サンプルを用いた CAV1 および CAV2 発現量と臨床データとの相関解析

宮崎大学医の倫理委員会で承認を得た後、当院及び関連施設において、加療中の CRPC 患者 36 名、ホルモン感受性前立腺癌 (non-CRPC と記載) 患者 22 例からの同意を得て、血液サンプルを取得した。患者背景を表 1 に示す。CRPC 群で有意に PSA 値が高く、局所進行や転移はすべて CRPC 群に認められた。

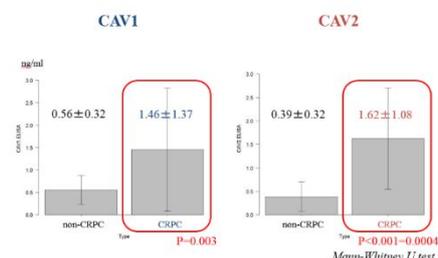
次に、血漿中の CAV1 および CAV2 蛋白濃度を ELISA にて測定した。血漿中の CAV1 および CAV2 濃度は CRPC 群で有意に高値であった (図 1)。さらに、CRPC 群において CAV1 と CAV2 の値には相関関係がみられた (図 2)。一方で、Gleason score (図 3) や臨床病期 T 分類 (図 4) との相関はみられなかった。

表 1

	CRPC	non-CRPC	P-value
Age (years), mean \pm SD	68.7 \pm 7.7	66.2 \pm 5.2	0.18
PSA (ng/ml), mean \pm SD	41.8 \pm 28.4	8.8 \pm 4.1	<0.001
Gleason score, n (%)			
6	2 (5.6)	4 (18.2)	0.045
7	8 (22.2)	9 (40.9)	
8-10	26 (72.2)	9 (40.9)	
Clinical stage, n (%)			
T1-T2	7 (19.4)	13 (59.1)	0.004
T3-T4	29 (80.6)	9 (40.9)	<0.001
N0	16 (44.4)	22 (100)	<0.001
N1	20 (55.6)	0 (0)	<0.001
M0	7 (19.4)	22 (0)	0.008
M1	29 (80.6)	0 (0)	<0.001
Total (n)	36	22	

PSA: prostate specific antigen.

図 1 Plasma CAV1 and CAV2 levels



(2)前立腺癌細胞株を用いた CAV1、CAV2 およ

びカベオリン関連分子の発現解析

CRPC model として PC3、DU145、22Rv1、non-CRPC model として LNCaP 細胞を準備し、それぞれの細胞から mRNA とタンパクを抽出した。それぞれの細胞における CAV1、CAV2 およびアンドロゲンレセプター (AR) の発現を解析したところ、臨床検体での結果と同様に、CRPC 株である PC3 において、有意に CAV1 と CAV2 が高発現していることを RNA と蛋白レベルで確認した (図 5、図 6)。

(3)CAV1 および CAV2 の一過性ノックダウン細胞の作製と、細胞遊走能、浸潤能の解析

CAV1 と CAV2 に対する siRNA を用いて、ノックダウンを行い、発現を RNA、蛋白レベルで確認した (図 7)。

興味深いことに、CAV2 のノックダウンにより、CAV1 の発現が低下する現象がみられた。siRNA のシーケンス、干渉部位も共通点はなく、原因を特定できなかった。

次に、CAV1 と CAV2 のノックダウンによる細胞遊走能への影響を、cell migration assay (図 8) と wound healing assay (図 9) で確認した。その結果、CAV1 および CAV2 のノックダウンにより、PC3 細胞の遊走能は有意に低下した。一方マトリジェル浸潤アッセイでは (図 10)、CAV1 と CAV2 のノックダウンによる明らかな PC3 の浸潤能に対する影響を確認できなかった。

(4)CAV1 および CAV2 のノックダウンによる PC3 細胞の遊走能低下の要因に関する考察

次に、PC3 細胞の遊走能へ直接影響を与えている分子を同定するために、E-cadherin、N-cadherin、 α -カテニン、ピメンチン、HGF アクチベーターインヒビター (HAI)-1、HAI-2、EGFR、Snail と Slug の発現の変化について、CAV1 および CAV2 のノックダウンの前後でその発現 (mRNA) を比較した。その結果、CAV1 のノックダウンにより、ピメンチンと N-cadherin の発現が軽度低下していたことが確認された。CAV1 の発現が、EMT に関与している可能性もあり、今後も原因を追究していく予定である。

さらに、PCR アレイ {RT² Profiler PCR Array system (QIAGEN, Cat. No. PAHS-028Z)} にて、癌の転移に関与していることが明らかな 84

種類の分子について、CAV1 および CAV2 のノックダウンによる影響を解析した。その結果、CAV-1 のノックダウンにより、MGAT [Mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase] 5、MMP13 (Matrix metalloproteinase 13) と MYCL (V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived) の発現が、有意に低下していた。一方で、CAV2 のノックダウンにより、MYCL と ETV4 (Ets variant 4) の発現が有意に低下、さらに FGFR4 (Fibroblast growth factor receptor 4) と SRC (V-src sarcoma viral oncogene homolog) の発現も低下傾向が確認された。また、CAV1 および CAV2 のノックダウンにより、MYCL の発現低下がみられたが、一方で MYC の発現は増加していた (表 2)。

結論

去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) 患者 36 例とホルモン感受性前立腺癌 (HSPC) 患者 22 例の血液サンプルを用いて、Caveolin-1 (CAV1) と CAV2 蛋白の血漿中濃度を測定したところ、HSPC 患者と比較して、有意に CRPC 患者で CAV1 と CAV2 の発現が亢進していた。

前立腺癌細胞株においては、同様に CRPC 細胞株である PC3 や DU-145 細胞で CAV1 と CAV2 の発現が増加していた。PC3 細胞を用いた *in vitro* の実験系で、CAV1 と CAV2 のノックダウンにより、PC3 細胞の遊走能の^{図10}低下が確認された。ピメンチンや N-cadherin など浸潤転移に関わると報告されている複数の分子 (MGAT5、MMP13、MYCL、ETV4、FGFR4、SRC) の発現に変化がみられており、今後遊走能低下の要因についてさらに解析を進めていく予定である。以上の内容を下記の学会で発表し、論文化した。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

図 2

Plasma CAV1 and CAV2 levelsの相関

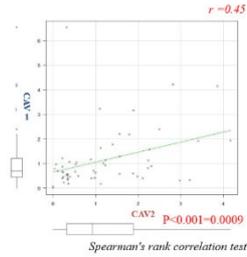


図 3

Gleason grade

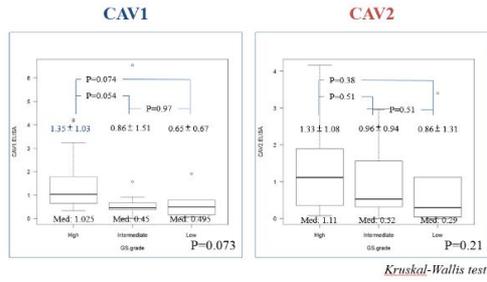


図 4

T grade

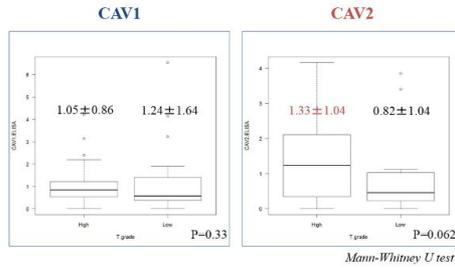


図 5

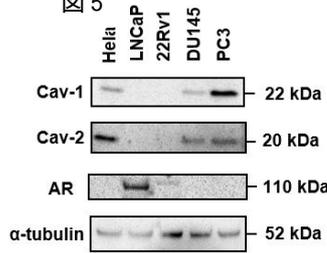


図 6

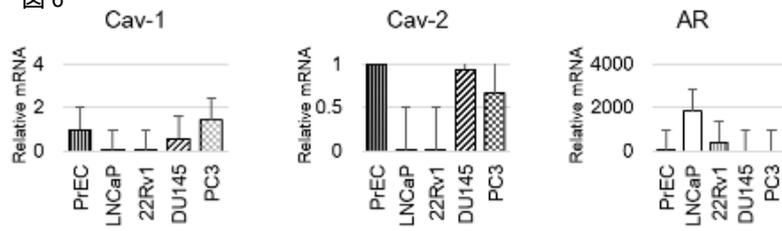


図 7

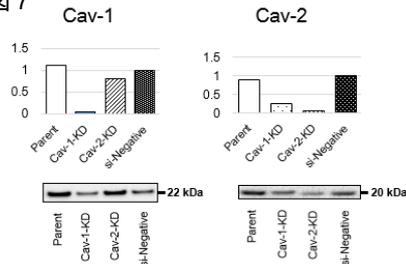


図 8

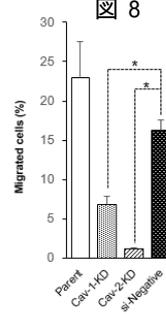


図 9

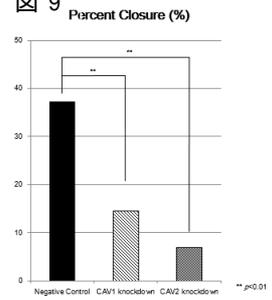


図 10

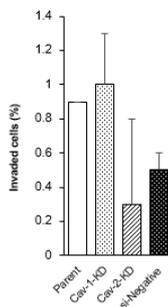


表 2

Gene Symbol	Gene Name	Fold Change	
		Cav-1-KD	Cav-2-KD
MGAT5	Mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase	-2.03*	-1.77
MMP13	Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	-2.13*	1.12
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	2.06*	2.55*
MYCL	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian)	-2.31*	-2.68*
ETV4	Ets variant 4	-1.66	-2.38*
FGFR4	Fibroblast growth factor receptor 4	-1.64	-1.95
SRC	V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)	-1.54	-1.95

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 7 件)

1. Kamimura T, Kida K, Takeda M, Sato S, Fujii M, Inoue M, Tsukino H, Mukai S, Nanashima A, Nakamura K, Kamoto T. Surgical intervention for renal cell carcinoma with inferior vena cava extension combined with laparoscopic procedure. Res Rep Urol. 2017 Jun 19;9:107-112. (査読有)
2. Sugie S, Mukai S, Yamasaki K, Kamibeppu T, Tsukino H, Kamoto T. Plasma macrophage-stimulating protein and hepatocyte growth factor levels are associated with prostate cancer progression. Hum Cell. 2016, 29(1):22-29. (査読有)
3. Katayama Y., Kamibeppu T., Nishii R., Mukai S., Wakeda H., Kamoto T.: CT evaluation of acupuncture needles inserted into sacral foramina. Acupunct Med. 2016, 34(1): 20-26. (査読有)
4. Sugie S, Mukai S, Yamasaki K, Kamibeppu T, Tsukino H, Kamoto T. Significant Association of Caveolin-1 and Caveolin-2 with Prostate Cancer Progression. Cancer Genomics Proteomics. 2015, 12(6):391-396. (査読有)
5. Mukai S, Yorita K, Kawagoe Y, Katayama Y, Nakahara K, Kamibeppu T, Sugie S, Tsukino H, Kamoto T, Kataoka H. : Matriptase and MET are prominently expressed at the site of bone metastasis in renal cell carcinoma: immunohistochemical analysis. Hum Cell 2015 28(1) : 44-50. (査読有)
6. Mukai S, Yorita K, Yamasaki K, Nagai T, Kamibeppu T, Sugie S, Kida K, Onizuka C, Tsukino H, Kamimura T, Kamoto T, Kataoka H. Expression of human kallikrein 1-related peptidase 4 (KLK4) and MET phosphorylation in prostate cancer tissue: immunohistochemical analysis. Hum Cell. 2015, 28(3):133-142. (査読有)
7. Ishizaki H., Nakashima S., Hamada T., Nishida T., Maehara N., Ikeda T., Tsukino H., Mukai S., Kamoto T., Kondo

K.: Laparoscopic anterior pelvic exenteration for locoregionally advanced rectal cancer directly invading the urinary bladder: A case report of low anterior resection with en bloc cystectomy for sphincter preservation. Asian J Endosc Surg. 2015 8(3):343-346 (査読有)

[学会発表](計 2 件)

1. Caveolin-1 および 2 による E-cadherin の発現を介した前立腺癌細胞遊走能の亢進: 山崎浩司、賀本敏行: 第 26 回泌尿器科分子・細胞研究会、大分、2017. 3
2. 前立腺癌進展と CAVEOLIN-1、2 の関連: 杉江悟、賀本敏行 他: 第 33 回日本ヒト細胞学会学術集会、宮崎、2015. 5

6. 研究組織

(1)研究代表者

賀本 敏行 (Toshiyuki Kamoto)

宮崎大学・医学部発達泌尿生殖医学講座泌尿器科学分野・教授

研究者番号: 00281098

(2)研究分担者

向井 尚一郎 (Shoichiro Mukai)

宮崎大学・医学部発達泌尿生殖医学講座泌尿器科学分野・准教授

研究者番号: 10315369

月野 浩昌 (Hiromasa Tsukino)

宮崎大学・医学部発達泌尿生殖医学講座泌尿器科学分野・講師

研究者番号: 60433059

山崎 浩司 (Koji Yamasaki)

宮崎大学・医学部発達泌尿生殖医学講座泌尿器科学分野・医員

研究者番号: 30777355

杉江 悟 (Satoru Sugie)

宮崎大学・医学部発達泌尿生殖医学講座泌尿器科学分野・医員

研究者番号: 50626140 (辞退)