

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20067

研究課題名(和文) 前立腺癌進展過程におけるラミニン受容体の発現調節とEMT-MET制御機構の解明

研究課題名(英文) The regulation for laminin receptor expression of prostate cancer during EMT-MET process

研究代表者

米山 徹 (Tohru, Yoneyama)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：50587649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、前立腺癌(PC)の神経周囲浸潤(PNI)に関与する転移促進性ラミニン受容体であるintegrin $\alpha 6 \beta 1$ と転移抑制性ラミニン受容体であるO型糖鎖(LNMG)の発現調節とEMT-MET制御機構の関連を検討した。PC細胞は、EMTに伴い、integrin $\alpha 6 \beta 1$ およびlet7i miRNA発現が亢進し、let7i miRNAがLNMGの合成酵素の一つである4GAT1の発現を特異的に抑制し、LNMG合成を減少させることで、転移促進性integrin $\alpha 6 \beta 1$ シグナル伝達経路およびSDF-1/CXCR4経路を介したERK活性化により、PC細胞の神経周囲浸潤能を亢進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although tumor microenvironment of highly innervated prostate considered to be laminin-rich and up-regulation of metastasis promoting laminin-binding integrin $\alpha 6 \beta 1$ contributed to perineural invasion (PNI) and following metastasis of prostate cancer, many papers did not consider an anti-metastatic effect of laminin-binding glycan (LNMG) on $\alpha 6 \beta 1$ -dystroglycan in prostate cancer (PC). Here we identified that the SDF-1-CXCR4 axis and metastasis promoting integrin $\alpha 6 \beta 1$ upregulation occurred during EMT responsible for enhancement of migration capacity to perineural cells and perineural invasion capacity in metastatic PC cells. We also showed that translational repression of 4GAT1 by hsa-let-7i-5p miRNA was responsible for anti-metastatic LNMG depletion occurred during EMT process. These findings suggest that the SDF-1-CXCR4 axis and regulation of laminin receptor expression occurred during EMT especially, let-7i-5p regulated LNMG synthesis might be important for PNI and PC metastasis.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：神経周囲浸潤 ラミニン受容体 上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は神経に沿って進展し、被膜外浸潤すると考えられており、PNI は前立腺癌の播種に関して最も重要なメカニズムの一つである (Villers A et al. J Urol.149:793-798,1993.)。ラミニンレセプターの一つである integrin $\alpha 6$ は、神経周囲浸潤した前立腺癌細胞で発現が亢進することが報告されている (Sroka IC. J Cell Physiol. 224:283-288, 2010)。一方、 α -dystroglycan (α -DG) のムチンドメインに付加されるラミニン結合性 O 型糖鎖 (Laminin binding O-glycan: LNBG) は、基底膜との接着に重要であり、悪性度が高い前立腺癌細胞では、本糖鎖の合成異常が起こることが報告されている (Bao X et al. PNAS 106:12109-12114, 2009. Shimojo et al. Prostate. 71:1151-1157, 2011)。我々の研究から、LNBG の発現を調節する因子の一つとして FER tyrosine kinase (FER) を同定してきた。FER の発現亢進が LNBG の合成に関連する糖転移酵素の発現を抑制することで、基底膜との接着を損ない、ラミニンから integrin $\alpha 6$ へのシグナル伝達を増加させることで遊走能、浸潤能が増加することを示した (Yoneyama et al. Mol Biol Cell. 23. 771-780, 2012) (図1)。

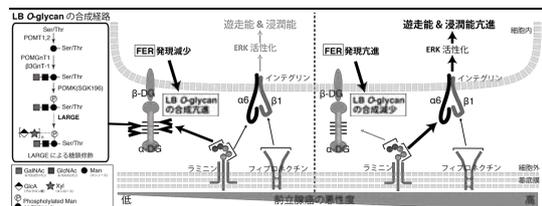


図1. ラミニンレセプターの発現調節による前立腺癌の遊走能、浸潤能の変化

以上の知見から、前立腺癌細胞のラミニンレセプターは、FER のような発現調節因子によってその発現が制御され、結果として前立腺癌細胞の運動能が亢進し、被膜外へ浸潤転移をされると考えられる。しかしながら、ラミニンレセプターの発現調節と癌細胞の浸潤転移に必須である EMT-MET との関連は不明である。本研究では、前立腺癌細胞の浸潤転移におけるラミニンレセプターの発現調節と EMT-MET 制御機構について解明するために integrin $\alpha 6$ と α -DG の LNBG の 2 種の異なる機能を有するラミニンレセプターの発現が異なる PC-3 細胞集団を単離し、比較解析することで、ラミニンレセプターの発現調節と EMT-MET 制御機構について検討可能であると考えた。

2. 研究の目的

前立腺癌の進展過程において被膜外浸潤に関わる PNI と前立腺癌細胞の EMT および MET は重要なメカニズムであるが、その詳細な分

子機構は解明されていない。本研究では、前立腺癌の局所進展の鍵となる PNI に関与するラミニンレセプター (integrin $\alpha 6$ およびラミニン結合 O 型糖鎖: LNBG) の発現調節と癌の浸潤転移に必須である EMT-MET 制御機構との関連性について明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、前立腺全摘標本を用いた免疫組織化学的検討によってラミニンレセプター (LNBG、integrin $\alpha 6$) の局在、PNI に関する臨床的意義を明らかにする。次にラミニンレセプターの発現が異なる前立腺癌細胞株の DNA マイクロアレイ解析を行い、ラミニンレセプターの発現調節に関連する責任分子を検索する。次に同定した責任分子の過剰発現、ノックダウン細胞を調製し、ラミニンレセプター発現への影響を検討する。さらに各種前立腺癌細胞および上記で調製した細胞を用いて種々の基質に対するケモタキシスアッセイ、マトリゲル浸潤能およびヒト神経周膜細胞に対する浸潤能を検討する。最終的にマウスに上記の前立腺癌細胞を正所性に移植し、腫瘍形成能や転移能について検討し、ラミニンレセプターおよび EMT-MET 責任分子の発現と PNI との関連を調査する。

4. 研究成果

前立腺癌細胞に発現する代表的なラミニンレセプターとして integrin $\alpha 6$ と α -DG の LNBG の発現を神経周囲浸潤している前立腺全摘組織 (97 例) の免疫染色 (図 2) によって調べた。

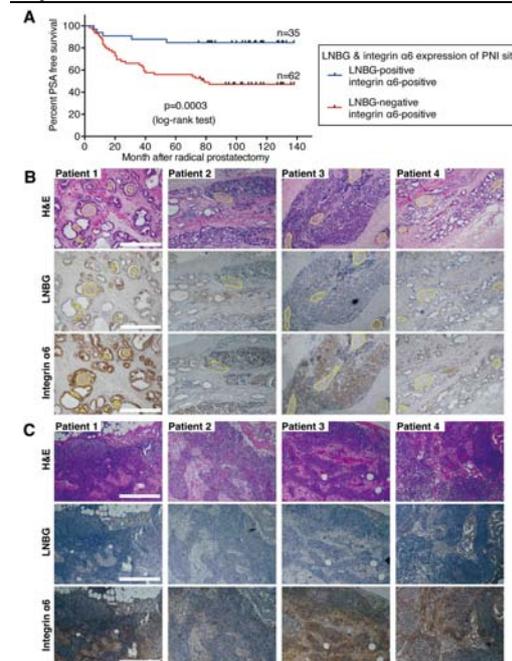


図2. 神経周囲浸潤部位における integrin $\alpha 6$ と LNBG の免疫染色および PSA 再発との関連

その結果、PNI 部位における LNBG 陰性かつ integrin $\alpha 6$ 陽性腫瘍の存在(図 2B)は、前立腺癌の生化学的再発に関与することを明らかにした(図 2A)。また所属リンパ節転移部位においても検討した検体全て LNBG 陰性かつ integrin $\alpha 6$ 陽性腫瘍であった(図 2C)。

臨床検体で得られた知見を前立腺癌細胞株で検証するため、低浸潤性細胞(LNCaP および PC3-H)と高浸潤性細胞株(LNCaP-androgen independent: LNCaP-AI および PC3-L)における integrin $\alpha 6$ と LNBG の発現や LNBG の合成に関連する糖転移酵素の発現を細胞蛍光染色および Western blot (WB) (図 3)、qPCR (図 4) および DNA microarray (図 5) で調査した。

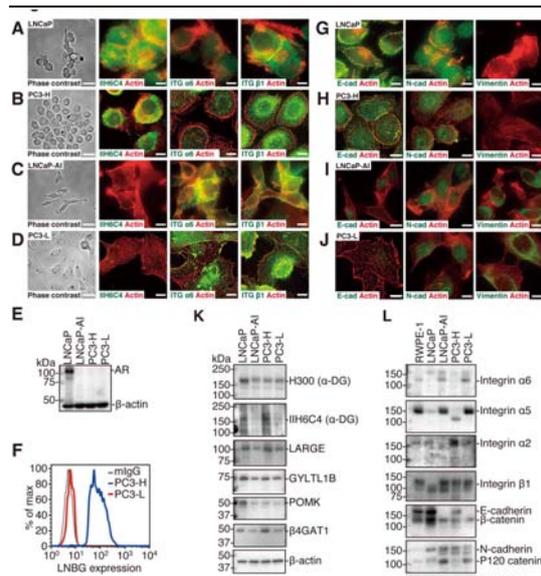


図 3. 前立腺癌細胞株の integrin $\alpha 6$ と LNBG の細胞蛍光免疫染色、FACS と WB 解析

A,B,C,D. 各前立腺癌細胞株におけるラミニンレセプターの発現。ラミニンレセプターは、Alexa488 (緑)、 β -actin は、TRIC (赤)標識 2 次抗体で検出した。G,H,I,J. 各前立腺癌細胞株における EMT 関連分子の発現。E-cadherin, N-cadherin, vimentin は、Alexa488 (緑)、 β -actin は、TRIC(赤)標識 2 次抗体で検出した。E. WB による各前立腺癌細胞株における Androgen レセプターの発現。F. FACS による PC3-H および PC3-L 細胞における LNBG の発現解析。K,L WB による各前立腺癌細胞株における integrin および LNBG 合成関連糖転移酵素の発現。

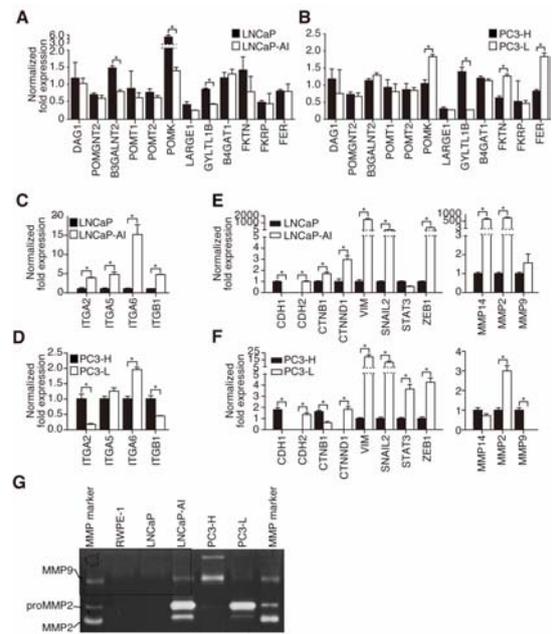


図 4. 前立腺癌細胞株の integrin $\alpha 6$ と LNBG の qPCR による発現解析

A,B. qPCR による LNBG 合成関連糖転移酵素の発現。C,D. qPCR による integrin の発現。E,F. qPCR による EMT 関連遺伝子の発現。

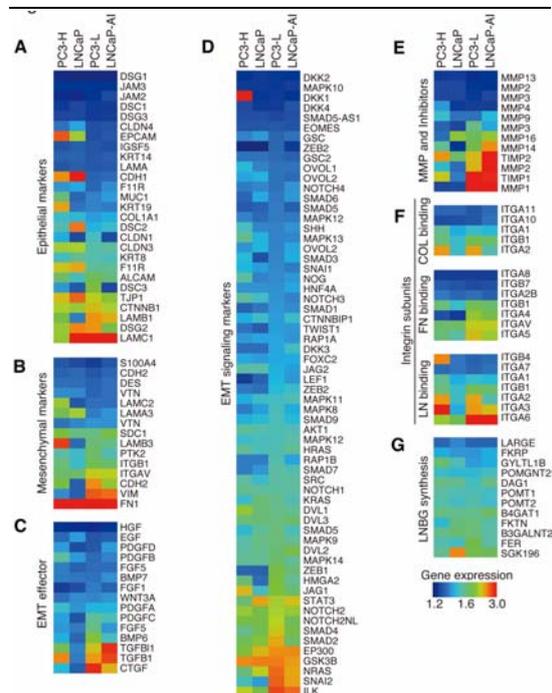


図 5. 前立腺癌細胞株の integrin と LNBG 合成関連酵素、EMT 関連遺伝子の Microarray による発現解析

図 3,4,5 の結果から、高浸潤性を示す前立腺癌細胞では integrin $\alpha 6$ の発現が亢進するが、同じラミニンレセプターである LNBG の発現は、顕著に減少し、LNBG が減少した細胞では、EMT 関連分子の発現が亢進していることが明らかとなった。

このことから以降の実験では、ラミニンレセプターの発現が異なり、Integrin $\alpha 6$ 発現亢進

かつLNBG 発現減少の高浸潤性 PC3-L および LNCaP-AI 細胞と Integrin $\alpha 6$ 発現減少かつ LNBG 発現亢進の低浸潤性 PC3-H および LNCaP 細胞で検討を進めた。

また前立腺癌細胞が神経周囲へと浸潤する際に神経周膜細胞(HPNC)が分泌するケモカインに誘引されていると考えられたことから、HPNC 細胞が分泌するケモカインの測定を行った (図 6A)。

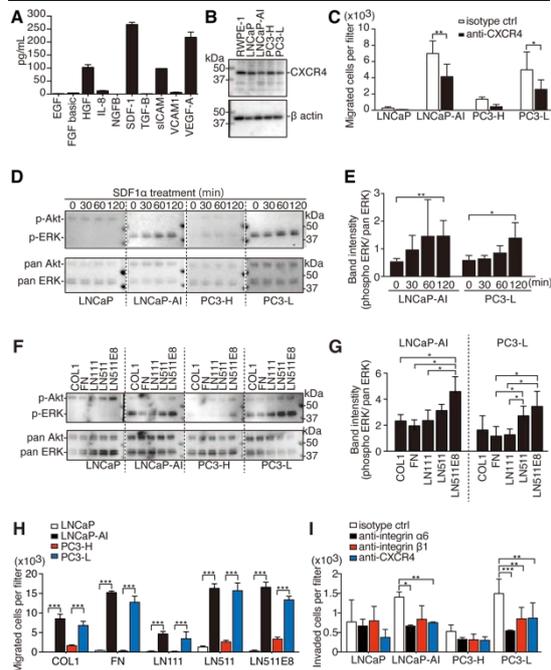


図 6. HPNC が分泌する SDF-1 に対する前立腺癌細胞の遊走能と ERK 活性化および各種細胞外基質に対する遊走能

その結果、HPNC 細胞は、多量の Stromal derived factor-1 (SDF-1)を分泌していることが明らかとなった (図 6A)。さらに SDF-1 のレセプターである C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4)は、前立腺正常上皮および前立腺癌細胞で発現していることが明らかとなった (図 6B)。HPNC 細胞が分泌する SDF-1 が前立腺癌細胞の遊走能を亢進するかどうかを調べるために、抗 CXCR4 抗体で処理した前立腺癌細胞と処理していない前立腺癌細胞の HPNC 細胞のコンディショナル medium (HPNC-CM)に対するケモタキシスアッセイを行った (図 6C)。その結果、前立腺癌細胞の HPNC-CM に対する遊走能は、低浸潤性細胞である LNCaP および PC3-H と比較し、高浸潤性細胞である PC3-L および LNCaP-AI 細胞で顕著に高く、抗 CXCR4 抗体によって有意に阻害されることから HPNC 細胞が分泌する SDF-1 が前立腺癌細胞上の CXCR4 と相互作用することにより、細胞遊走シグナルが活性化する可能性が示唆された。このことから次に SDF-1 処理による前立腺癌細胞の ERK および AKT のリン酸化について調べた (図

6D,E)。その結果、SDF-1 により高浸潤性細胞である PC3-L および LNCaP-AI 細胞で ERK のリン酸化が有意に増加し、遊走能が亢進することが明らかとなった。

高浸潤性前立腺癌細胞は、HPNC 細胞が分泌する SDF-1 によって遊走能が亢進することが明らかとなったが、さらに前立腺癌細胞がラミニンリッチな神経周膜細胞へ到達するためには、ラミニンへの親和性が重要と考え、ラミニンを始めとする細胞外基質の刺激による ERK および AKT のリン酸化についても調べた (図 6F,G)。その結果、LNBG を高発現している LNCaP や PC3-H 細胞では、ERK の活性化がほとんど認められなかったのに対し、LNBG の発現が減少し、integrin $\alpha 6$ の発現が亢進している高浸潤性前立腺癌細胞は、特に LN511 や integrin $\alpha 6$ が結合する LN511E8 ドメイン処理によって有意に ERK のリン酸化が亢進した。このことから、前立腺癌細胞は、コラーゲンやフィブロネクチンよりもよりラミニンに親和性が高いことが示唆された。

さらに前立腺癌細胞の各種細胞外基質に対するハプトタキシスアッセイを行った (図 6H)。その結果、ERK のリン酸化と同様に高浸潤性前立腺癌細胞は、特に LN511 やインテグリン $\alpha 6$ が結合する LN511E8 ドメインをコーティングしたフィルターに高い遊走能を示すことが明らかとなった。

次に神経周膜細胞層に対する浸潤能を調査するために神経周膜細胞積層モデルに対する浸潤アッセイと抗 integrin $\alpha 6$ 抗体あるいは、抗 CXCR4 抗体による阻害実験を行った (図 6I)。その結果、LNBG を高発現している LNCaP や PC3-H 細胞と比較し、LNBG の発現が減少し、integrin $\alpha 6$ の発現が亢進している高浸潤性前立腺癌細胞 (LNCaP-AI および PC3-L) は、神経周膜細胞層モデルに対する浸潤能が有意に高く、これらは、抗 integrin $\alpha 6$ 抗体あるいは、抗 CXCR4 抗体によって有意に阻害され、LNBG 高発現低浸潤性細胞

(LNCaP や PC3-H) と同程度の浸潤能となった。これらの細胞生物学的実験から神経周囲に浸潤しやすい PC 細胞は、LNBG 陰性かつ integrin $\alpha 6$ 陽性細胞であることが示唆された。

さらにマイクロアレイ解析からラミニンレセプターの発現調節、EMT-MET 制御に関連する責任分子を検索した結果 (図 7A)、let7i miRNA の発現が神経周囲浸潤能が高い PC 細胞で顕著に増加することが明らかとなった (図 7A,B)。let7i miRNA の標的遺伝子を TargetScan によって検索した結果、LNBG の合成に関与する $\beta 1,4$ glucuronyltransferase 1($\beta 4$ GAT1)の 3'-UTR 領域に let7i miRNA-5p の結合部位があることが明らかとなった (図 7C)。レポーターアッセイの結果 (図 7D) から、let7i-5p miRNA が $\beta 4$ GAT1 の 3'-UTR 領域

の標的部位に結合することで $\beta 4GAT1$ 発現を抑制的に調節することが示唆された。さらに FACS 解析から、let7i-5p miRNA 阻害剤処理により、LNBG 低発現高浸潤性細胞株 (PC3-L および LNCaP-AI) において顕著に LNBG の合成が亢進することが明らかとなり、let7i-5p miRNA 阻害剤が、 $\beta 4GAT1$ のタンパク合成を亢進させることが明らかとなった (図 7F,G)。

さらに細胞生物学的実験から let7i miRNA 阻害剤が LNBG の合成に関与する $\beta 4GAT1$ の発現を抑制し、LNBG の合成を減少させ PC 細胞の神経周囲への遊走および浸潤能を抑制することを明らかにした (図 7H,I)。

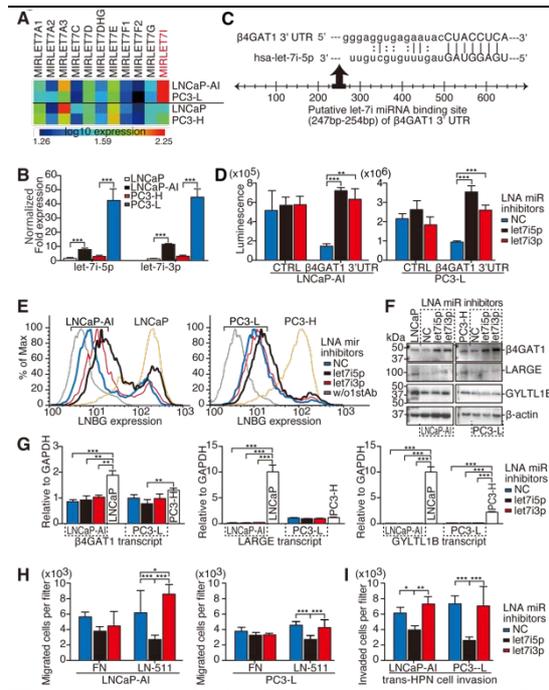


図 7. LNBG の合成に関与する $\beta 4GAT1$ の発現調節に関与する let7i-5p miRNA の発現と let7i-5p miRNA 阻害剤による LNBG 合成能への影響

さらに LNBG 高発現低浸潤性細胞 (LNCaP および PC3-H) \rightarrow let7i-5p miRNA を強制発現させた結果、 $\beta 4GAT1$ のタンパク質発現および LNBG の合成が亢進した (図 8A,B,C)。

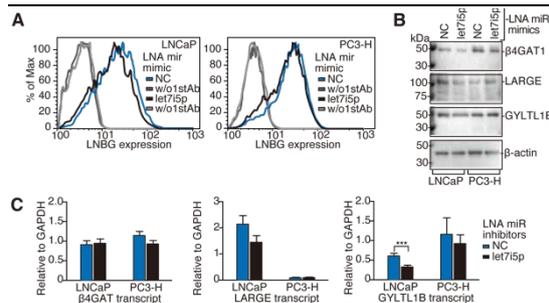


図 8. LNBG 高発現低浸潤性細胞における let7i-5p miRNA の一過性強制発現による LNBG 合成への影響

最後に神経周囲浸潤能が高い PC 細胞を前立腺に移植したマウスに let7i miRNA 阻害剤投与し、腫瘍形成能、転移能を評価した (図 9A-E)。

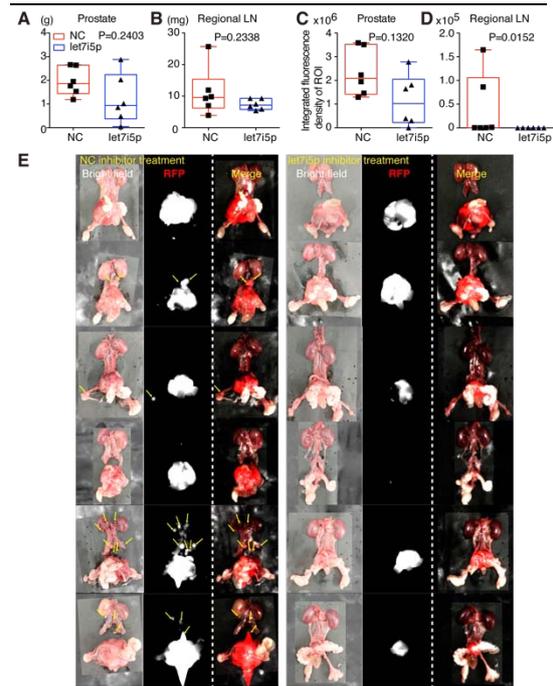


図 9. 前立腺正所性腫瘍移植モデルにおける let7i-5p miRNA 阻害剤投与の影響

その結果、let7i miRNA 阻害剤を投与した群で腫瘍形成能および転移能が減少し、腫瘍組織の LNBG の発現が増加した (図 10)。

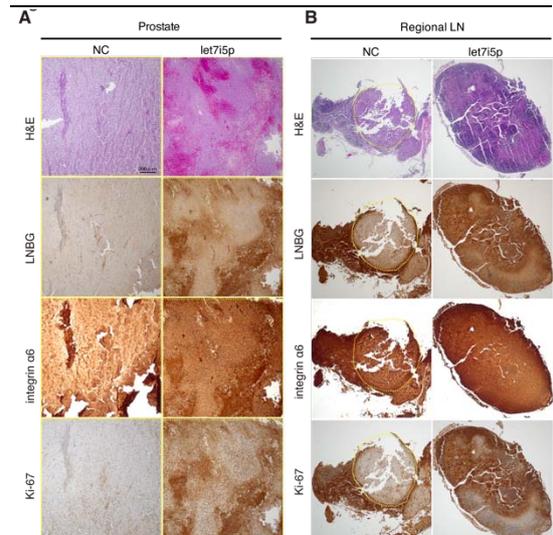


図 10. 前立腺腫瘍およびリンパ節転移部位摘出標本におけるラミニンレセプターの発現と Ki67 染色 (let7i-5p miRNA 阻害剤投与の影響)

以上の結果から、神経周囲に浸潤しやすい PC 細胞は、LNBG 陰性かつ integrin $\alpha 6$ 陽性細胞であることが示唆された。LNBG 陰性化の過程は、EMT によって発現が亢進する let7i-5p miRNA が $\beta 4GAT1$ のタンパク質発現を抑制す

ることでLNBGの合成が減少する一つメカニズムを明らかにした。またlet7i-5p miRNA阻害剤が、前立腺癌の腫瘍形成および転移能を抑制する創薬ターゲットとなり得る可能性が示唆された。これらの成果を論文にまとめ投稿予定である。

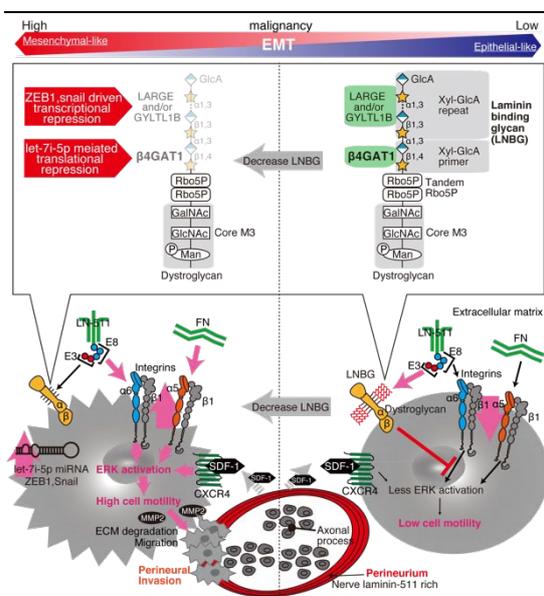


図 12. 本研究で明らかとなった前立腺癌細胞における神経周囲浸潤メカニズム

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 9 件)

1. 米山 徹, 藤田 尚紀, 岩村 大径, 岡本 亜希子, 飛澤 悠葵, 山本 勇人, 畠山 真吾, 古家 琢也, 福田 穰, 大山 力: miRNAによって制御されるラミニン結合O型糖鎖の前立腺癌神経周囲浸潤、転移における役割: 第104回日本泌尿器科学会総会 2016年4月23-25日 宮城県仙台市(仙台国際会議場) ポスター
2. Yoneyama T, Fujita N, Iwamura H, Okamoto A, Yamamoto H, Mori K, Hatakeyama S, Hashimoto Y, Koie T, Tobisawa Y, Fukuda M, Ohyama C.: Role of anti-metastatic laminin-binding O-glycan on α -dystroglycan regulated by miR-X in prostate cancer.: 31st European association of Urology annual meeting 2016年3月11-15日. ドイツ(ミュンヘン) ポスター
3. 米山 徹, 藤田 尚紀, 岩村 大径, 岡本 亜希子, 飛澤 悠葵, 山本 勇人, 畠山 真吾, 古家 琢也, 福田 穰, 大山 力: miRNAによって制御される

ラミニン結合O型糖鎖の前立腺癌神経周囲浸潤における役割: 第25回泌尿器科分子・細胞研究会 2016年2月26-27日 大阪府大阪市(ハイアットリージェンシー大阪・ATCコンベンションルーム) ポスター

4. Yoneyama T, Fujita N, Iwamura H, Okamoto A, Yamamoto H, Hatakeyama S, Koie T, Tobisawa Y, Fukuda M, Ohyama C.: The role of laminin-binding O-glycan on α -dystroglycan regulated by miRNA for perineural invasion in prostate cancer.: 第88回日本生化学会 2015年12月1-4日. 兵庫県神戸市(神戸ポートピアホテル) ポスター
5. 米山 徹, 藤田 尚紀, 岩村 大径, 岡本 亜希子, 飛澤 悠葵, 山本 勇人, 畠山 真吾, 古家 琢也, 福田 穰, 大山 力: The role of laminin-binding O-glycan on α -dystroglycan regulated by miRNA for perineural invasion in prostate cancer.: 第9回東北糖鎖研究会 2015年9月4-5日 宮城県仙台市(東北薬科大学) ポスター
6. Yoneyama T, Fujita N, Tobisawa Y, Hatakeyama S, Koie T, Ohyama C, Fukuda M.: Role of Laminin receptors for perineural invasion in prostate cancer.: 30th European association of Urology annual meeting 2015年3月21日. スペイン(マドリッド) ポスター

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

米山 徹 (Yoneyama, Tohru)
弘前大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50587649

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究者協力者

なし