

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11168

研究課題名（和文）前立腺がん「脂質欠乏低酸素環境」の病態解析と進行度予測腫瘍マーカーの開発

研究課題名（英文）Investigation of pathophysiology and biomarker discovery for prostate cancer in the lipid-deficient hypoxia microenvironment

研究代表者

宮城 洋平（Miyagi, Yohei）

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・臨床研究所・所長

研究者番号：00254194

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）：「がん組織の脂質欠乏低酸素環境」は、一般的にがん組織の成長と並行して進行する微小環境で、この環境下で特異的に発現誘導される分子は、がんの進行度が予測できるマーカー、つまり、治療対応が必要な初期進行前立腺がんの診断マーカー/治療分子標的となる可能性がある。本研究では、「脂質欠乏低酸素環境」で10倍以上の発現上昇が見られるGタンパク質共役型受容体分子（仮称：GPCR-X）を見出し、その前立腺がん組織でのmRNA発現を確認した。遺伝子をノックアウトした細胞を作製し、RNAseqによるmRNA発現プロファイルの網羅的解析を進めGPCR-Xの機能に関わる遺伝子の候補を複数得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺がんは、多くの場合、緩徐に増殖する腫瘍である。非常に鋭敏な血液腫瘍マーカーであるprostate specific antigen (PSA)の出現と針生検技術の進歩により、早期、超早期で発見される前立腺がんケースが増加しているが、一方で、治療介入しなくても天寿が全うできる可能性のある患者に対する「過剰治療」が一つの問題となっている。血中PSA濃度は、進行癌にならない場合は、必ずしもがんの進行度を反映していないので、単独では治療介入の指標とならない。がん微小環境の概念に基づき、進行度を反映する新規前立腺がんマーカー候補GPCR-Xの発見は治療介入の時期決定という側面での期待が大きい。

研究成果の概要（英文）：It is known that hypoxic condition together with depletion of nutrients such as lipids or glucose deteriorates along with development or progression of tumors. Therefore, we planned to obtain tumor markers that can estimate the degrees of tumor progression as genes which expression were synergistically and specifically elevated by hypoxia and nutrient depletion. We obtained GPCR-X (provisional name) gene as one of such markers for prostate cancer by genome wide gene expression screening using LNCaP human prostate cancer cells under hypoxia and lipid depletion. We urgently tried to obtain an antibody for GPCR-X in fail, but by in situ hybridization we demonstrated the mRNA of GPCR-X actually existed in the surgically removed prostatic cancer cells. We made GPCR-X gene knockout LNCaP prostate cancer cells and identified genes that may collaborate with GPCR-X by genome wide gene expression analyses.

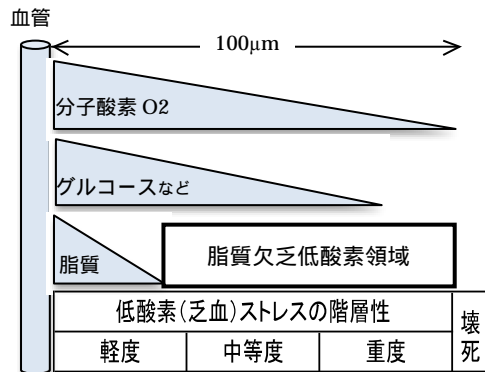
研究分野：腫瘍病理学、分子生物学

キーワード：前立腺がん GPCR 低酸素 低脂質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺がんの血液腫瘍マーカー prostate specific antigen (以下 PSA) は、アンドロゲン依存性に前立腺上皮細胞から腺腔へ分泌されるタンパク質である。大部分の前立腺がんは、アンドロゲン依存性に増殖する腺癌で PSA を産生する。PSA は癌化による組織構築の変化で血中に移行すると推測されている。血清 PSA は、極めて鋭敏で感度が高い前立腺がんの血液腫瘍マーカーである反面、正常上皮も PSA を産生するので炎症や良性疾患でも血中濃度が上昇し、がんへの特異度は低い。PSA 検査の導入で早期 / 超早期の前立腺がんが多数発見されるようになったが、前立腺がんの多くは増殖が緩徐であり、診断の時点では直ぐに積極的な治療を開始せずとも天寿を全うできると判断し、一旦、経過を観察する「待機療法」が知られている。しかし、待機療法の明確な選択基準が無いことが問題となっている。前立腺がんの早期病変を画像診断で描出することは現時点ではできない。従って、血清 PSA 検査での screening や症状の発生に続いて、前立腺全体から系統的に針生検で検体を採取して病理組織診断が実施される。極めて限られた部位・組織量を検査する針生検では、病変の進行度が評価できない。血清 PSA の値でも、早期病変の進行度評価は難しい。血清 PSA 検査を補完し、がんへの特異度が高く、かつ、進行度(腫瘍の進展状態)を反映して血中濃度が上昇し、「積極的な治療をすべき状態の前立腺がん」が判定できる腫瘍マーカーの開発が臨床の現場では囑望されている。



2. 研究の目的

PSA は、極めて鋭敏で感度が高く、前立腺がんの診断・治療に大きな変革をもたらした反面、発見される早期 / 超早期病変への対応が臨床的な課題となっている。申請者らが見出した「がん組織の脂質欠乏低酸素環境」において特異的に発現誘導される分子は、治療対応が必要な初期進行がんの診断マーカー / 治療分子標的となる可能性がある。本研究では、前立腺がん組織での「脂質欠乏低酸素環境」の分子病態を詳細に解析し、その概念を病理学的に確立すると共に、特に、この環境下で直接血中へ、あるいは細胞外小胞 (extracellular vesicles、EVs) に分泌されるタンパク質を中心に解析し、その、血液腫瘍マーカーとしての可能性を探る。また、これらの分子の治療分子標的としての可能性についても検討を加える。

3. 研究の方法

培養ヒト前立腺がん細胞で、既に得ている「脂質欠乏低酸素環境」で発現誘導される遺伝子候補群について、発現制御メカニズム、EVs 分画を含めた培養上清への産物の放出、を解析する。前立腺全摘術の病理検体で、候補分子発現の形態学的な解析を進め、前立腺がんにおける「脂質欠乏低酸素環境」の概念とその病理学的意義を確立する。これらの研究を実施するために、特異抗体を確保する。市販されていない場合は独自に作製する。当施設のバイオバンクで手術切除前の患者血清が研究用に保管・管理されているので、絞り込んだ「脂質欠乏低酸素環境」で誘導される血清診断マーカー候補の、血清中での検出を試みる。血清への出現状況と前立腺全摘病理検体での発現動態を比較解析し、腫瘍マーカーとしての可能性を検討する。特に PSA 値や、がんの進行程度との相関に着目する。

特に着目した遺伝子については、遺伝子をノックアウトした前立腺がん培養細胞を作製して、その腫瘍生物学的な表現型の変化を解析し、その遺伝子、遺伝子産物の「脂質欠乏低酸素環境」での機能を解析する。

4. 研究成果

申請者らが見出した「がん組織の脂質欠乏低酸素環境」は、一般的にがん組織の成長と並行して進行する微小環境であり、従って、この環境下で特異的に発現誘導される分子は、がんの進行度が予測できるマーカーとして、治療対応が必要な初期進行前立腺がんの診断マーカー / 治療分子標的となる可能性がある。本研究では、「脂質欠乏低酸素環境」で発現誘導される遺伝子群から、特に、低酸素 x 低脂質 で相乗的に 10 倍以上の発現誘導が起こる 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体分子 (仮称: GPCR-X) に着目して研究を進めた。GPCR-X の前立腺がん細胞における機能は未知であるが、診断のみならず、治療の分子標的としても期待できると判断した。

Western Blot や免疫染色ができる抗 GPCR-X 抗体があれば、研究が飛躍的に進むと判断し、初年度から複数の市販されている抗体の検定を行ったが、最終的に研究に使える抗体がないと判断した。そこで、大腸菌でのリコンビナントタンパク質や複数の合成ペプチドを抗原として、種々の方法で独自の抗体作製を試みたが、予想以上に 7 回膜貫通型 GPCR に対する抗体作製は困難で、研究に使用可能な抗体が得られなかった。そこで、臨床検体を含めた GPCR-X の発現解析を mRNA で行うこととし、実際の外科切除前立腺がん組織や前立腺がん針生検組織での GPCR-X *in situ* hybridization を実施し、組織中のがん細胞の細胞質内に GPCR-X 転写産物が存在することを確認できた。低酸素領域との関係性は予想に反して明確ではなかった。受容体膜

タンパクである GPCR-X が EV に取り込まれて分泌される場合、一部がタンパク質分解酵素でプロセッシングされて分泌される場合が想定され、診断の血液マーカーになる可能性は高いと判断しているが、タンパク質レベルの解析を実施するには至らなかった。培養細胞が分泌する EV 中の GPCR-X mRNA を解析したが、検出感度以下であった。

GPCR-X が「がん組織の脂質欠乏低酸素環境」で誘導されてどのような機能を発揮しているのかを解析するために、ホルモン感受性を維持した前立腺がん細胞である LNCaP 細胞を用いて CRISPR/Cas9 法による GPCR-X 遺伝子ノックアウト細胞を作製した。抗体での GPCR-X タンパク質の発現消失が確認出来ないため、GPCR-X 遺伝子のシーケンシングを行いノックアウトを確認にした。予想に反して、野生型細胞と GPCR-X 遺伝子ノックアウト細胞で、通常培養条件下、低酸素低脂質培養条件下で、細胞の増殖能、生存能に優位な差は見られなかった。免疫不全マウス皮下でのゼノグラフト形成能にも顕著な差が見られず、GPCR-X の脂質欠乏低酸素環境での機能は現在のところ不明である。一方で、RNAseq による網羅的な遺伝子発現解析を実施して、脂質欠乏低酸素培養条件下で、GPCR-X 遺伝子ノックアウト細胞では発現が消失、低下、或いは発現が誘導されなくなる遺伝子の候補を複数得ることができており、これらの遺伝子を足掛かりに、研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小井 詰 史朗 (Koizume Shiro) (60416063)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・その他 (82713)	