

令和元年6月13日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16809

研究課題名(和文) 前立腺癌細胞浸潤を促進する新規細胞膜結合型タンパク分解制御因子に関する研究

研究課題名(英文) Roles of proteolytic regulators in prostate cancer cell invasion.

研究代表者

上田 紗弥(伊藤紗弥)(Ueda, Saya)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90534511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は前立腺癌の増悪メカニズムの解明を目的とし、スクリーニングにより同定した新規細胞浸潤促進因子(CNPY2・MEP1A)の作用機序を明らかにすることを試みた。CNPY2の作用機序の一つとして前立腺癌増悪の鍵因子であるARのタンパク量制御を見出した。CNPY2はE3ユビキチン酵素MYLIPのユビキチン化活性を減弱させ、MYLIPによるARタンパク分解を阻害することを明らかにした。また、CNPY2は数種のヒートショックプロテインと相互作用したことから、タンパク質フォールディングへの関与も推測された。一方、メタロプロテアーゼであるMEP1Aはアンドロゲンに応答し活性化する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌治療における課題は、ホルモン抵抗性癌に対する効果的治療法の開発である。ARの異常発現はホルモン抵抗性癌の細胞増殖の一因であると推測されており、ARのタンパク量制御メカニズムを明らかにした本研究成果は前立腺癌の進展メカニズムを理解する上での重要な知見と位置づけられ、今後の臨床分野への応用が期待される。

今後、CNPY2を介したタンパク質の量的・質的管理システム、およびホルモン抵抗性癌におけるMEP1A活性メカニズムに関して新たな知見を得ることで、ホルモン抵抗性前立腺癌に対する治療法の開発に繋がる分子メカニズムを明らかにできると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To uncover the mechanism by which human prostate cancer progresses, we have previously performed a genetic screen for regulators of human prostate cancer progression using the *Drosophila* accessory gland. We found that CNPY2 and MEP1A markedly promoted cell growth and cell invasion of prostate cancer (PC) cells.

In this study, we suggested that CNPY2 controls AR protein levels in PC cells. Signaling by the androgen-induced AR has been known to be promote cell growth of PC cells. Our results suggested that CNPY2 promoted cell growth of PC cells by inhibition of AR protein degradation through MYLIP-mediated AR ubiquitination. In addition, we showed that CNPY2 interacted with several heat shock proteins. This result suggests that CNPY2 may control protein folding in cancer cells.

MEP1A, a metalloprotease is reported to be activated after propeptide cleavage. In this study, we showed that active-type of MEP1A may be increased by androgen signal in PC cells.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 タンパク分解制御 癌細胞浸潤

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

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌治療は病期の早い段階で行うアンドロゲン療法が有効であるのに対し、病期が進み転移性を有する癌に対する効果的治療法は確立されていない。その理由は前立腺癌の細胞浸潤・転移を制御する分子メカニズムが明らかにされておらず、治療標的となる因子が不明であるからと考えられる。

そこで申請者らは前立腺癌細胞の浸潤・転移を制御する新規因子の同定を目的としてショウジョウバエをモデル個体とした前立腺癌転移モデルを構築し、個体レベルで癌細胞転移制御因子のスクリーニングを行った。その結果、前立腺癌細胞における機能が明らかにされていない二つの因子 CNPY2 及び MEP1A が前立腺癌細胞の浸潤を顕著に亢進することを見出した (Ito S et. al., BBRC, 2014)。CNPY2 や MEP1A は細胞膜上に発現する因子であり、タンパク分解に関与する と考えられていることから、細胞外基質のタンパク分解を介して癌細胞の浸潤能を制御する可能性が高いと推測された。

2. 研究の目的

前立腺癌の浸潤・転移メカニズムは明らかにされておらず、効果的治療を行う上で浸潤・転移制御を担う鍵因子の同定は必須であると考えられる。本研究では、前立腺癌転移モデルショウジョウバエを用いたスクリーニングにより見出した二つの浸潤促進因子(CNPY2・MEP1A)を介した前立腺癌細胞の浸潤・転移メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

1) CNPY2 の作用機序解明の試み

CNPY2 をノックダウンした前立腺がん細胞を用いて発現解析 (RT-qPCR, ウェスタンブロットティング) を行い、アンドロン受容体 (AR) の mRNA 量およびタンパク量を定量した。

免疫沈降や *in vivo*, *in vitro* ubiquitination assay を行い、MYLIP による AR の Ubiquitin 化が CNPY2 により阻害されることを示した。

前立腺がん細胞を用いた細胞増殖アッセイを行い、CNPY2 のノックダウンが細胞増殖に及ぼす効果を検討した。

前立腺癌患者検体より RNA を抽出し、RT-qPCR を用いた発現解析を行った。

2) CNPY2 と相互作用する因子の網羅的探索

flag タグ融合 CNPY2 安定発現細胞株を樹立し、細胞質画分を用いて flag 抗体による精製を行った。サイズ分画後、MS 解析により相互作用因子の同定を行った。

3) 前立腺がん細胞における MEP1A の発現検討

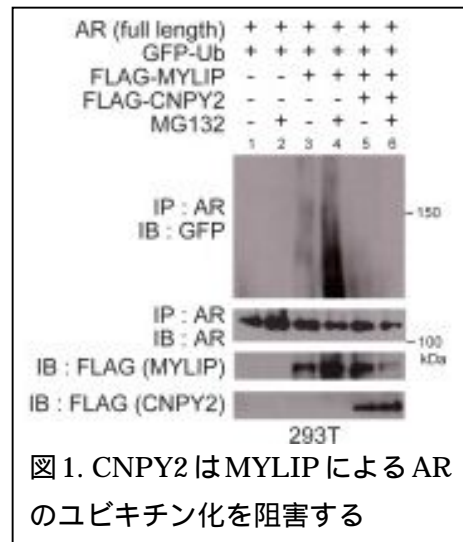
アンドロゲン投与を行ったアンドロゲン応答性前立腺がん細胞 LNCaP を用いて、RT-qPCR およびウェスタンブロットティングを行い、MEP1A の mRNA 量とタンパク量のアンドロゲン

依存的変動を検討した。

4. 研究成果

1) CNPY2 を介した AR タンパク分解阻害メカニズムの解明

CNPY2 の作用機序の一つとして前立腺癌増悪の鍵因子である AR のタンパク量制御を見出した。まず、CNPY2 との相互作用が知られている E3 ユビキチン化酵素 MYLIP が AR のポリユビキチン化を担うことを示した。MYLIP による AR のポリユビキチン化は CNPY2 により抑制された (図 1)。さらに、CNPY2 は MYLIP と E2 ユビキチン酵素 UBE2D1 の相互作用を阻害することで、MYLIP のユビキチン化活性を減弱させる分子メカニズムが示された。CNPY2 はユビキチン-プロテアソーム系を介した AR のタンパク分解に対し抑制的に作用することで、結果的に細胞内の AR タンパクの蓄積を誘導すると考えられる。実際に、CNPY2 の機能阻害により引き起こされる前立腺癌細胞の増殖抑制は AR の強制発現により抑制解除された。また、前立腺癌患者検体においても CNPY2 と AR の発現量に正の相関が認められた (Ito S et al., Oncotarget, 2018)。



2) CNPY2 の相互作用因子の同定

CNPY2 の作用機序のさらなる解明を目的とし CNPY2 と相互作用する因子の網羅的探索を試みた。その結果、CNPY2 は数種のヒートショックプロテインと相互作用することを見出し、タンパク質フォールディングに関与する可能性が示唆された。

今後、CNPY2 がヒートショックプロテインに対してどのように作用するのかを明確にすることで、癌細胞におけるタンパク質の量的・質的管理メカニズムの一端を解明できると考えられる。その成果は、がんに対する新たな治療法の開発に繋がると期待される。

3) 活性型 MEP1A のアンドロゲン依存的増加

LNCaP 細胞において MEP1A タンパクはアンドロゲン依存的に増加する一方、 mRNA 量はアンドロゲン投与による変動が見られなかった。MEP1A はペプチド分解を受け活性化することが知られるプロテアーゼである。アンドロゲン投与で増加した MEP1A タンパクは分解後の分子量であることから、MEP1A はアンドロゲンにより活性化する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

- 1) Ito S, Kayukawa N, Ueda T, Taniguchi H, Morioka Y, Hongo F, Ukimura O, MRGBP promotes AR-mediated transactivation of KLK3 and TMPRSS2 via acetylation of histone H2A.Z in prostate cancer cells., *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms*, 査読有, 1861 (2018) 794-802, doi: 10.1016/j.bbagr.2018.07.014.
- 2) Oti T, Takanami K, Ito S, Ueda T, Matsuda KI, Kawata M, Soh J, Ukimura O, Sakamoto T, Sakamoto H., Effects of Sex Steroids on the Spinal Gastrin-Releasing Peptide System Controlling Male Sexual Function in Rats., *Endocrinology*, 査読有, 159 (2018) 1886-1896, doi: 10.1210/en.2018-00043.
- 3) Ito S, Ueno A, Ueda T, Nakagawa H, Taniguchi H, Kayukawa N, Fujihara-Iwata A, Hongo F, Okihara K, Ukimura O, CNPY2 inhibits MYLIP-mediated AR protein degradation in prostate cancer cells., *Oncotarget*, 査読有, 9 (2018) 17645-17655, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24824>
- 4) Taniguchi H, Ito S, Ueda T, Morioka Y, Kayukawa N, Ueno A, Nakagawa H, Fujihara A, Ushijima S, Kanazawa M, Hongo F, Ukimura O, CNPY2 promoted the proliferation of renal cell carcinoma cells and increased the expression of TP53., *Biochemical and biophysical research communications*, 査読有, 485 (2017) 267-271, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.095. Epub 2017 Feb 21.

〔学会発表〕(計2件)

- 1) Saya Ito, Akihisa Ueno, Takashi Ueda, Hideo Nakagawa, Hidefumi Taniguchi, Naruhiro Kayukawa, Fumiya Hongo, Koji Okihara, Osamu Ukimura, CNPY2 inhibits MYLIP-mediated AR protein degradation in prostate cancer cells., 第16回アジア泌尿器科学会, 2018年
- 2) Saya Ito, Akihisa Ueno, Takashi Ueda, Hideo Nakagawa, Hidefumi Taniguchi, Naruhiro Kayukawa, Fumiya Hongo, Kazumi Kamoi, Koji Okihara, Osamu Ukimura, CNPY2 maintains AR protein levels in prostate cancer cells., 第76回日本癌学会学術総会, 2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：浮村 理

ローマ字氏名：UKIMURA Osamu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。