

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06390

研究課題名(和文) イヌAR複合体を起点としたホルモン療法抵抗性前立腺がん診断・治療戦略の創出

研究課題名(英文) Development of diagnostic and therapeutic strategies for hormone therapy-resistant prostate cancer diagnosis and treatment using the canine AR complex as a origin.

研究代表者

落合 和彦(Ochiai, Kazuhiko)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：30550488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトで難治性のアンドロゲン受容体シグナル(ARシグナル)非依存前立腺は、去勢条件下で生じるイヌのホルモン療法抵抗性前立腺がん病態と近似しており、イヌ前立腺がんの発症・難治化メカニズム解明の意義は大きい。申請者は、アンドロゲン非依存条件下で起こるイヌのARシグナル伝達機構を解明するために、イヌAR全長をクローニングし、各種実験に供してきた。その中で、イヌARに存在するグルタミン(Q)の繰り返し数がARシグナル伝達機構におよぼす影響について、細胞生物学的に検証した。この機構を調節する因子としてのREIC/Dkk-2およびSGTAの役割についても検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イヌは去勢により雄性ホルモン分泌の遮断を行うにもかかわらず、雄性ホルモン誘導性の前立腺がんを発症する。このメカニズム解明はヒト前立腺がんのうち、ホルモン療法に抵抗性を示す難治性症例の病態解明に繋がることが期待される。本申請課題では、イヌのアンドロゲン受容体がもつ構造多型がアンドロゲン受容体シグナル伝達におよぼす影響について解析した。また、本機構に対する、がん抑制遺伝子REIC/Dkk-3およびコシャペロン分子であるSGTA分子の関与についても解析した。

研究成果の概要(英文)：Androgen receptor signaling (AR signaling)-independent prostate, which is refractory in humans, approximates canine hormone therapy-resistant prostate cancer pathology that occurs under castration conditions, and is of great significance in elucidating the mechanisms underlying the development and refractoriness of canine prostate cancer. In order to elucidate the mechanism of canine AR signaling under androgen-independent conditions, the applicant has cloned the entire length of the canine AR and used it in various experiments. In this context, the effect of the number of glutamine (Q) repeats present in the canine AR on the AR signaling mechanism was examined from a cell biological perspective. The role of REIC/Dkk-2 and SGTA as regulators of this mechanism was also examined.

研究分野：獣医分子腫瘍学

キーワード：イヌ 前立腺がん アンドロゲン受容体

1. 研究開始当初の背景

近年の獣医療技術革新により、伴侶動物の寿命は長期化し、それに伴い腫瘍性疾病は増加傾向にある。人と伴侶動物が幸福に共存するには**健康寿命の増進**こそが不可欠であり、転移や再発を伴う難治性固形がんに対する**がん治療ブレイクスルー**が必要となっている。申請者は前所属である岡山大学において発見されたReduced Expression in Immortalized Cells(**REIC**)の抗腫瘍効果を中心とした機能解析について研究を進めてきた。REICは正常細胞に比べ不死化細胞においてその発現が減弱する遺伝子群の1つとして同定された(*BBRC.*, 268:20-4, 2000)。REICはヒトの多種類のがんで高頻度に発現が低下していること(*BBRC.*, 289: 257-63, 2001)が知られており、申請者らはヒト前立腺がんおよび悪性中皮腫細胞担がんマウスにREIC遺伝子発現アデノウイルスベクター(Ad-REIC)を用いて強制発現させると、アポトーシスを誘導すると同時に全身性に抗がん免疫活性を賦活化する機能を持つことを明らかにした(*Cancer Res.*, 2005; *Int. J. Oncol.*, 2009; *Cancer Res.*, 2009)。現在Ad-REICは物質特許保有者である岡山大学病院において、前立腺がんを含む複数のがん種をターゲットとした臨床研究～治験が進行中であり、中でも難治性前立腺がん病態であるホルモン療法抵抗性患者において、原発巣および転移リンパ節への投与で高い治療実績を上げている。申請者はこれまでに、REIC遺伝子の腫瘍特異的アポトーシス誘導能に着目し、イヌおよびネコの乳腺腫瘍細胞株におけるREICタンパク質発現の減少を立証し、Ad-REICによる抗腫瘍効果についても証明した(*Vet. J.*, 2013; *Vet Comp Oncol.*, 2017)。さらに、本申請課題の前段階である基盤研究(C)「イヌREICによるホルモン療法抵抗性前立腺がん治療戦略の創出」(代表:落合和彦)において、前立腺がんホルモン療法抵抗性を付与し、難治化させるSmall Glutamine-rich Tetratricopeptide repeat-containing protein α (**SGTA**)とREICが相互作用することを見出した。REICはSGTAのダイマー形成を阻害し、SGTAダイマーが抑制していたAR成熟を促進することで、ホルモン療法抵抗性前立腺がん細胞におけるARシグナル伝達を復帰させることを、ヒトとイヌの両方で明らかとし、REICがAR複合体内で分子モータータンパク質であるDyneinの軽鎖(Tctex-1)に結合し、ARを核内に輸送するというメカニズムの概念を証明した(*Oncotarget*, 2016; *BMC Vet Res.*, 2017)。

また、申請者はこれまでの研究過程で、イヌAR複合体構成シャペロン分子の一つであるFK506-binding protein 4 (**FKBP52**)が、去勢イヌでアンドロゲン刺激非依存的に前立腺がんを発症させるキー分子である可能性を見出した。ホルモン療法抵抗性前立腺がん培養細胞内における実験で、イヌFKBP52の強制発現はアンドロゲン誘導体 dihydrotestosterone (DHT)非存在下でのARシグナル伝達を促進した。これはつまり、去勢雄イヌにおいて、アンドロゲン供給が無かったとしてもFKBP52が存在すればARシグナル伝達に伴う前立腺細胞増殖が起こる可能性を示している。

2. 研究の目的

前立腺がんを自然発症する動物はヒトとイヌに限られるという報告がある(*ILAR J.*, 2014)。そのなかで、多くの雄イヌは飼育を容易にする目的で去勢術が施される。これにより、体内アンドロゲンレベルは著減し、雄性生殖器疾患の発症率は減少するが、しばしば前立腺がんが発生する。アンドロゲン欠乏環境下で生じた前立腺がんの多くは、代表的な治療手段であるARシグナル伝達制御を目的としたホルモン療法に抵抗性を示

すため、予後が非常に悪い。これは、ヒト前立腺がんに対するホルモン療法実施過程の一部に生じる難治化病態と近似しており、イヌの前立腺がん病態解析はヒト難治性前立腺がん病態の解明にも繋がる。また、申請者が一部特許を保有し、イヌで他のがん種に対し特異的かつ強力にアポトーシスを誘導するREICを新規治療ツールとして活用することは、申請者でしか成し得ない。さらに、申請者は所属機関で樹立したイヌ前立腺がん株化細胞CHP-1の性状解析を行い、ARシグナル伝達機構に異常があることを確認している（*Vet Comp Oncol.*, 2017）。

本申請課題においては、**難治性イヌ前立腺がん由来培養細胞に対するREIC強制発現によるアポトーシス誘導と、その際に起きるAR複合体のコンフォメーション変化について細胞生物学的および免疫学的手法を駆使して解析する。**特にアンドロゲン刺激非依存的にAR分子成熟を促し、去勢雄イヌの前立腺がん発症に関わる可能性を持つFKBP52を中心としたシャペロン分子群の発現プロファイルに主眼を置いて研究を遂行する。

3. 研究の方法

1年目（2019年度）

去勢雄イヌ前立腺がん症例から樹立され、申請者らが性状解析したCHP-1細胞株におけるAR複合体の発現状態および細胞内局在を免疫染色、免疫沈降法で解析する。また、ヒト前立腺がん治療において治験が進んでいるアデノウイルス製剤Ad-REICによるアポトーシス誘導を試みる。新たなイヌ前立腺がん細胞株の樹立を研究計画全体にわたり継続する。

2年目（2020年度）

前年度に引き続き、Ad-REICによってアポトーシスを誘導したCHP-1細胞その他新たに樹立するにおいてAR複合体の細胞内局在およびコンフォメーション変化を免疫学的手法により解析する。さらに、ヒトホルモン療法感受性(LNCaP)および抵抗性(PC3)細胞におけるFKBP52発現状況をプロファイルし、ホルモン療法抵抗性獲得との相関を解析する。

3年目（2021年度）

CRISPER/Cas9によるゲノム編集技術を用いて、イヌ前立腺がん細胞のSGTAおよびFKBP52遺伝子をKOし、DHT刺激依存的/非依存的なARシグナル伝達機構を解析する。また、本学付属動物医療センターにて診断・治療を行う去勢雄イヌの前立腺がんおよびその発症起点であると考えられる前立腺過形成症例におけるSGTAおよびFKBP52を中心としたAR複合体構成シャペロン群の発現を遺伝子・タンパク質レベルで精査する。これらから得られる知見を活かし、難治性イヌ前立腺がんの早期診断マーカー開発および創薬起点を探索する。

4. 研究成果

アンドロゲン受容体シグナル（ARシグナル）非依存環境下で生じた前立腺がんの多くは、ARシグナル伝達制御を目的としたホルモン療法に抵抗性を示すため、予後が非常に悪い。これは、ヒト前立腺がんに対するホルモン療法実施過程の一部に生じる難治化病態と近似しており、イヌ前立腺がんの発症・難治化メカニズム解明の意義は大きい。申請者はこれまでに、その一端がSGTAにあることをヒトとイヌで証明した（*Oncotarget*, 2016; *BMC Vet Res*, 2017）。

上記研究の中で、イヌAR全長をクローニングし、各種実験に供してきたが、ARにはN

末端付近にグルタミン(Q)の繰り返し配列が存在し、その数が短いほど前立腺がん罹患し易いというデータがヒトで報告されている(*Cancer Res*, 2000)。イヌでも過去に前立腺がん症例と対照群の間で Poly Q 配列長に有意差が見られるという報告があったが(*J Vet Intern Med*, 2008)。イヌ AR シグナル伝達と Poly Q 配列長の相関について実験的に検証した例はない。そこで、本研究ではイヌ AR に 2 か所存在する Poly Q 配列を遺伝子工学的手法により長さを増減させ、細胞生物学的手法を用いて AR シグナル伝達機構におよぼす影響を精査した。その結果、イヌの AR においても Poly Q 配列長により AR シグナル伝達の強度が変動することが明らかとなった。本申請課題では、この成果を Ochiai *et al.*, 2021 *Vet Comp Oncol*, 19(2):399-403 として発表した。この成果により、イヌ AR の構造と前立腺がん発症機構についての関連性解明を研究する有用なツールが構築された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kawakami S, Michishita M, Sakae M, Morimatsu M, Uemura M, Kashiwagi N, Maeda M, Machida Y, Azakami D, Egusa AS, Onozawa E, Ishioka K, Watanabe M, Tanaka Y, Omi T, Ochiai K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Novel canine isocitrate dehydrogenase 1 mutation Y208C attenuates dimerization ability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.12214.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujita H, Bando T, Oyadomari S, Ochiai K, Watanabe M, Kumon H, Ohuchi H.	4. 巻 74
2. 論文標題 Dkk3/REIC, an N-glycosylated Protein, Is a Physiological Endoplasmic Reticulum Stress Inducer in the Mouse Adrenal Gland	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Medica Okayama	6. 最初と最後の頁 199-208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18926/AMO/59950.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Iwata T, Sadahira T, Ochiai K, Ueki H, Sasaki T, Haung P, Araki M, Watanabe T, Nasu Y, Watanabe M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Tumor suppressor REIC/Dkk-3 and its interacting protein SGTA inhibit glucocorticoid receptor to nuclear transport	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 1739-1745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2020.8819.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Azakami D, Saito A, Ochiai K, Ishiwata T, Takahashi K, Kaji N, Kaji D, Kaji N, Michishita M.	4. 巻 166
2. 論文標題 Chronic Basophilic Leukaemia in a Dog.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Pathology	6. 最初と最後の頁 5-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcpa.2018.10.170.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Michishita M, Saito N, Nozawa S, Furumoto R, Nakagawa T, Sato T, Ochiai K, Azakami D, Katayama K, Nakahira R, Tazaki H, Machida Y, Ishiwata T.	4. 巻 81
2. 論文標題 Metabolite profiling in sphere-forming cells from canine mammary adenocarcinoma cell lines using gas chromatography-mass spectrometry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1238-1248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0194.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tani H, Kurita S, Miyamoto R, Ochiai K, Tamura K, Bonkobara M.	4. 巻 18
2. 論文標題 Canine histiocytic sarcoma cell lines with SHP2 p.Glu76Gln or p.Glu76Ala mutations are sensitive to allosteric SHP2 inhibitor SHP099.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 161-168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12524.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uemura M, Ochiai K, Morimatsu M, Michishita M, Onozawa E, Azakami D, Uno Y, Yoshikawa Y, Sasaki T, Watanabe M, Omi T.	4. 巻 18
2. 論文標題 The canine RAD51 mutation leads to the attenuation of interaction with PALB2.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 247-255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12542.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwata T, Sadahira T, Ochiai K, Ueki H, Sasaki T, Haung P, Araki M, Watanabe T, Nasu Y, Watanabe M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Iwata T, Sadahira T, Ochiai K, Ueki H, Sasaki T, Haung P, Araki M, Watanabe T, Nasu Y, Watanabe M.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and therapeutic medicine	6. 最初と最後の頁 1739-1745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2020.8819.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Guo J, Wang Z, Weng Y, Yuan H, Yoshida K, Ikegame M, Uchibe K, Kamioka H, Ochiai K, Okamura H, Qiu L.	4. 巻 75
2. 論文標題 N-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone regulates osteoblast apoptosis and differentiation by mediating intracellular calcium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular signalling	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ochiai K, Sutijarit S, Uemura M, Morimatsu M, Michishita M, Onozawa E, Maeda M, Sasaki T, Watanabe M, Tanaka Y, Omi T.	4. 巻 19
2. 論文標題 The number of glutamines in the N-terminal of the canine androgen receptor affects signalling intensities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 399-403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12663.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田中 良和, 林田 真琴, 落合 和彦, 前田 まりか, 廣瀬 紗千, 田辺 愛理, 野中 柚希, 久保田 匠, 豊島 麻美子, 大矢 真里奈, 川越 美琴, 薩見 春輝, 石川 創
2. 発表標題 市販GS製剤による猫コロナウイルス増殖抑制効果の検討
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柏木 伸旭, 落合 和彦, 植村 光希, 前田 まりか, 道下 正貴, 森松 正美, 近江 俊徳, 田中 良和
2. 発表標題 p53変異イヌ乳腺腫瘍細胞株CTB-m2の性状解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大竹 真優, 石黒(大沼) 俊名, 落合 和彦, 木崎 景一郎
2. 発表標題 イヌ乳腺腫瘍細胞株に対するHER2阻害薬の効果の検証
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植村光希, 落合和彦, 森松正美, 柏木伸旭, 宇埜友美子, 道下正貴, 皆上大吾, 小野沢栄里, 近江俊徳
2. 発表標題 イヌRAD51変異が複合体形成におよぼす影響の検討
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川泰永, 森松正美, 落合和彦, 田中杏里咲, 折野宏一
2. 発表標題 BRCA2のC末端RAD51結合領域におけるRAD51との結合に影響を与えるアミノ酸残基の同定
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中沢綾香, 石黒(大沼)俊名, 落合和彦, 森松正美, 木崎景一郎
2. 発表標題 がん抑制遺伝子p53に変異を有するイヌ乳腺腫瘍細胞に対する血管新生阻害薬の抗腫瘍効果の解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 正典, 大竹陽奈, 齊藤千祥, 長島智和, 落合和彦, 田村恭一, 道下正貴, 盆子原誠, 堀達也, 河上栄一
2. 発表標題 新規の犬前立腺癌細胞株CHP-2に対するRAF阻害剤GDC-0879の抗腫瘍活性
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大竹 真優, 石黒(大沼) 俊名, 落合 和彦, 木崎 景一郎
2. 発表標題 イヌ乳腺腫瘍細胞株に対するHER2阻害薬の効果の検証
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柏木 伸旭, 落合 和彦, 植村 光希, 前田 まりか, 道下 正貴, 森松 正美, 近江 俊徳, 田中 良和
2. 発表標題 p53変異イヌ乳腺腫瘍細胞株CTB-m2の性状解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 良和, 林田 真琴, 落合 和彦, 前田 まりか, 廣瀬 紗千, 田辺 愛理, 野中 柚希, 久保田 匠, 豊島 麻美子, 大矢 真里奈, 川越 美琴, 薩見 春輝, 石川 創
2. 発表標題 市販GS製剤による猫コロナウイルス増殖抑制効果の検討
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 兵頭 あかね, 町田 雪乃, 落合 和彦, 小野沢 栄里, 皆上 大吾, 道下 正貴
2. 発表標題 猫の脾外分泌腺癌株化細胞Fpacc-E由来のsphere形成細胞の特性解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤 美咲, 落合 和彦, 町田 雪乃, 皆上 大吾, 中川 貴之, 道下 正貴
2. 発表標題 猫乳癌細胞株におけるCDK4/6阻害剤Palbociclibのin vitro抗腫瘍効果
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植村 光希, 落合 和彦, 道下 正貴, 吉川 泰永, 前田 まりか, 森松 正美, 近江 俊徳, 田中 良和
2. 発表標題 イヌとヒトで異なるRAD51分子構造がDNA相同組換え修復効率におよぼす影響の検討
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村 久志, 山本 昌美, 岸本 拓也, 町田 雪乃, 道下 正貴, 落合 和彦, 中川 貴之, 松田 陽子, 高橋 公正, 石渡 俊行
2. 発表標題 犬の乳腺腫瘍におけるnest inの発現と悪性挙動への関与
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田 律, 町田 雪乃, 榎本 竜也, 木下 那由多, 道下 莊, 羽成 直己, 皆上 大吾, 落合 和彦, 道下 正貴
2. 発表標題 犬の乳腺腫瘍オルガノイドの樹立
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近江 俊徳, 宇埜 友美子, 中村 知尋, 落合 和彦, 青木 博史, 宇田川 智, 浅野 潤三, 土田 修一
2. 発表標題 ネコAB式血液型を担うCMAH遺伝子解析の臨床応用への検討
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 落合和彦
2. 発表標題 がん関連遺伝子の細胞内相互作用解析から見えてくるもの
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会 生理・生化学分科会/臨床分科会(小動物)合同シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上妻 創, 吉川 泰永, 森松 正美, 落合 和彦, 折野 宏一
2. 発表標題 癌抑制遺伝子Brca2のイントロン1における発現調節機構の解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本獣医生命科学大学 生命科学総合研究センター
<https://www.nvlu.ac.jp/research-center/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------