

機関番号：12301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390419
 研究課題名（和文） 全ゲノム・ホモザゴシティー・ハプロタイプ解析による前立腺癌責任遺伝子の解明
 研究課題名（英文） Genetic analysis of prostate cancer susceptibility performing genomewide homozygosity haplotype analysis
 研究代表者
 鈴木 和浩（SUZUKI KAZUHIRO）
 群馬大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：80312891

研究成果の概要（和文）：

家族性・遺伝性前立腺癌の責任遺伝子を探索する目的で全ゲノム・ホモザイゴシティー・ハプロタイプ解析による検討を目指した。これまで継続してきた研究および今回の期間の検討を通じて、8番染色体23領域に存在するスクアレン合成酵素をコードする遺伝子 *farnesyl diphosphate farnesyltransferase (FDFT1)* との関連が示唆された。すなわち、プロモーターに存在する1塩基多型である rs2645429 の AA+AG タイプが GG タイプに比較して有意に前立腺癌リスクを増加させた。またタイプのプロモータ活性は有意に高いことが分かり、増殖を促進することが示された。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the genomic DNA using genomewide homozygosity haplotype analysis to identify the susceptibility gene for familial/hereditary prostate cancer. Through previous studies and the present study, we found the significant association of prostate cancer risk with the gene encoding squalene synthase, i.e., farnesyl diphosphate farnesyltransferase (FDFT1). The AA+AG genotypes of SNP in the promoter region, rs2645429 was found significantly in patients with cases. Functional analysis of FDFT1 showed the elevation of promoter activity in the A type promoter, and that the squalene synthase has close relations to prostate cancer growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	11,200,000	3,360,000	14,560,000

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌、遺伝子解析、スクアレン合成酵素、*FDFT1*

1. 研究開始当初の背景

我々の教室では以前から本邦における家族性・遺伝性前立腺癌の臨床的・基礎的研究を行っており、科学研究費補助金によって継続的に仕事をしてきた。本研究はこの継続した

研究の一環としてさらに前立腺癌の責任遺伝子を検討する目的で計画した。

2. 研究の目的

本邦における家族性・遺伝性前立腺癌の責任遺伝子を検討する目的である。

3. 研究の方法

こまでの罹患同胞対連鎖解析で得られた知見をさらに詳細に検討するため、全ゲノム・ホモザイゴシティー・ハプロタイプ解析による検討をいれて検討するとともに、候補遺伝子の機能解析を行うこととした。

候補遺伝子の機能解析は、遺伝子の一塩基多型とコントロールおよび症例（家族性・遺伝性前立腺癌・散発性前立腺癌）との関連解析を行った。さらに、そのSNPが当該遺伝子の発現に対してどのように影響を及ぼすかを、mutagenesisによるレポーターアッセイにより評価した。さらに、当該遺伝子のコードする酵素のsiRNAによる発現調整および酵素自体の阻害剤を使用した実験によって増殖に対する効果をin vitroで検討した。

最終的には、ヒト前立腺組織での発現を検討し、総合的に機能解析した。

4. 研究成果

(1) 候補遺伝子の解析

今回の検討およびこれまでの知見 (Matsui H et al. J Hum Genet, 2004) より8番染色体に存在するFDFT1に有意な関係を認めた。

Genomewide linkage analysis of FPC in Japanese: Matsui H et al. J Hum Genet, 2004

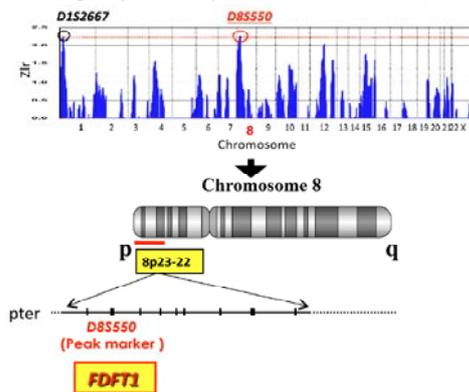


図1 各染色体との連鎖関係

FDFT1は図2のようにacetyl-CoAからコレステロールを合成するsterol branchおよびユビキノン、ドリコール、ファルネシルタンパク、ゲラニレートタンパクを合成するnon-sterol branchに関係するメバロン酸系路のsterol branchの律速酵素であるスクアレン合成酵素をコードする遺伝子である。図2にそのおもなcommon variantを示した。

今回、家族性前立腺癌 115 家系の発端者、散発性前立腺癌 138 例、コントロールとして前立腺肥大症 119 例のゲノムDNAを用い、5つのSNP、rs2645429, rs11549147, hCV25649966, rs2294136, rs1804473のゲノタイプを検討した。

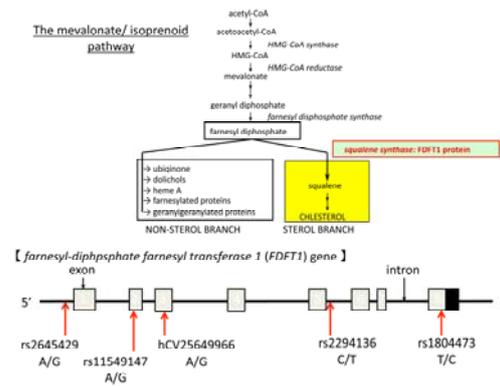


図2 メバロン酸系路とFDFT1のマップ

rs2645429はプロモータ領域、rs11549147はexon2、hCV25649966はexon3、rs2294136はintron5:exon junctions、rs1804473はexon8にそれぞれ存在し、それぞれA/G, A/G, A/G, C/T, T/Cのゲノタイプをもつ多型である。TaqMan®SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems)を使用しタイピングした。

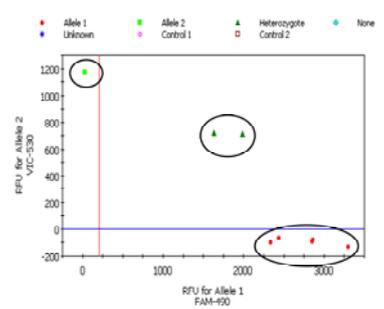


図3 TaqMan®SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems)によるゲノタイプ

図3に示すように、高感度かつ簡便にゲノタイプングが可能であり、精度高い解析が可能であった。

家族性前立腺癌、散発性前立腺癌、コントロールそれぞれの年齢は平均69.1歳、69.2歳、71.2歳、それぞれ40-88歳、47-84歳、51-88歳に分布した。癌症例では病期ABCDは家族性前立腺癌では、2, 50, 30, 28, 不明8例。散発性前立腺癌ではそれぞれ2, 29, 55, 51, 1例であった。病理学的な分類はグリーソンスコア6以下が家族性前立腺癌で26例、散発性前立腺癌で18例、グリーソンスコア7以上がそれぞれ83例、120例、不明が家族性前立腺癌で6例であった。

ゲノタイピングの結果、rs11549147, hcv25649966, rs2294136, rs1804473 ではコントロールに比較して家族性、散発性前立腺癌ともに有意な関係を認めなかった。しかし、プロモータに存在する SNP である rs2645429 では G/G のホモタイプと比較して G/A および A/A の A を含むゲノタイプで前立腺癌の有意な上昇が家族性前立腺癌のグループで認められた ($p < 0.05$)。

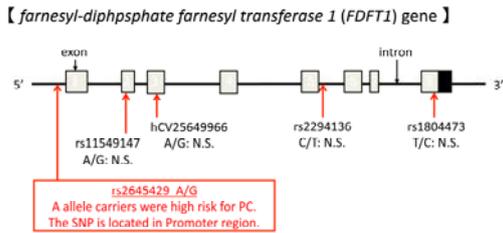


図4 F D F T 1 のマップと S N P

このように、F D F T 1 のプロモータに存在する rs2645429 は前立腺癌のリスクに関与した遺伝子の S N P である可能性が示唆された。

(2) F D F T 1 およびスクアレン合成酵素の前立腺癌における機能解析

このように、スクアレン合成酵素をコードする遺伝子である F D F T 1 のプロモータに存在する S N P がリスクを増加させたため、プロモータの mutant を使用したレポーターアッセイを行った。プロモータの全長を含むベクター、truncated ベクターなど図5で示すベクターによるルシフェラーゼ活性を検討した。図6に作成した mutant を使用した。

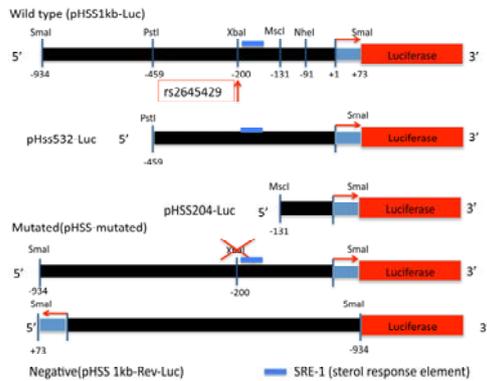


図5 プロモータのレポーターアッセイ

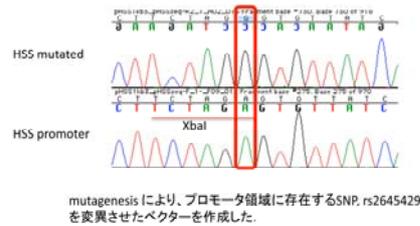


図6 Mutagenesis により rs2645429 を変異

細胞は DNA の取り込みやすさからまず COS-7 細胞を使用し行った。この結果全長をもつベクターに比較して 532 および 204bp のベクターではそれぞれ 20%、8% の活性に減少した。今回作成した rs2645429 の mutant では G/G としたベクターで約 22% まで活性が低下した。

次に、前立腺癌細胞である LNCaP 細胞で検討した。全長のベクターに比較して、532bp、204bp のベクターで、それぞれ 3.5%、8% に低下した。作成した mutant ベクターでは 2.8% に活性が低下した。

このように、COS-7 細胞および LNCaP 細胞ともに、rs2645429 の A-G の変化のみで活性を 70% 程度減少させることが示された。

以上のことから F D F T 1 の rs2645429 は活性を変化させることが示され、ゲノタイプとして A タイプはプロモータ活性の亢進が前立腺リスクと関連していることを示唆した。

このため、F D F T 1 がコードするスクアレン合成酵素自体を操作することで前立腺癌の増殖などが変化するかを次に検討した

まず、F D F T 1 を siRNA で knock down してスクアレン合成酵素の遺伝子発現を抑制した。その結果、LNCaP 細胞では 60% に、P C - 3 細胞では 70% に M T S アッセイで検討した細胞増殖が抑制されていた。

各種前立腺癌細胞における F D F T 1 発現量

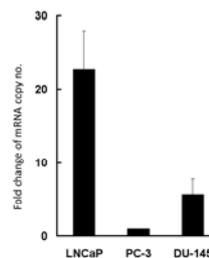


図7 前立腺癌細胞株における F D F T 1 発現量

図7にLNCaP, PC-3, DU-145といった前立腺癌細胞のF D F T 1の発現量を示した。今回のsiRNAによるF D F T 1の発現抑制による細胞増殖の抑制程度の差はこのベースの発現量の差から推察された。

次に、スクアレン合成酵素の阻害剤を用いた検討を行った。TAK475を使用した。MT S アッセイでみた増殖能の抑制はやはり、LNCaP で濃度依存性に増殖抑制を認めた。一方、PC-3 細胞では100 μM という高濃度ではじめて増殖抑制効果を認めた。このことは、同様に遺伝子発現のベースラインの差が一部関与していることを支持した。

F D F T 1 に関係する検討の最後としてヒト前立腺組織における発現の差を検討した。針生検で得られた組織からRNAを抽出し、cDNA を作成後、定量的P C R によってFDFT1mRNA を定量した。その結果、グリーンソンスコア8以上の悪性度の高い前立腺癌サンプルでは悪性所見を認めないサンプルと比較して約3倍の発現を認め、高度の有意差を認めた (p<0.001)。

(3) 脂質代謝と前立腺癌の関係の検討

以上の結果のように、メバロン酸系路を制御するスクアレン合成酵素と前立腺癌の関係がクローズアップしたため、メバロン酸系路本来の主要な機能である、sterol branch およびnon-sterol branch の機能と前立腺癌の関係を検討した。

まず、メバロン酸の上流に位置するHMGCo-A還元酵素を阻害するスタチンと前立腺癌の関係を検討した。シンバスタチンを使用し、PC-3 細胞の増殖を抑制し、アポトーシスの誘導を確認した。Non-sterol branch にはドリコールがあるが、これは IGF1 受容体のN-glycosylation に関係していることが報告されている。IGF1-IGF1 受容体は前立腺癌のサバイバル因子の重要な1つであるため、シンバスタチンと IGF1-1 受容体の関係を検討した。この結果シンバスタチンにより IGF-1 受容体発現が減少し、PC-3 細胞の増殖抑制が起こっていることが判明した。

次に、血液中の脂質と前立腺癌を検討するため、血液中の中性脂肪に富むリポタンパクであるレムナトリポタンパク (R L P) に注目した。RLPはPC-3細胞の増殖を促進し、LNCaP 細胞では引き起こさなかった。細胞による増殖の差を検討する目的で、脂質の受容体に着目した。すなわち、これまでR L P の受容体とされていた VLDL 受容体が前立腺細胞でも関係しているかを検討した。mRNA は存

在するものの、タンパクレベルではV L D L 受容体は非常に微量であった。前立腺細胞ではLDL 受容体がR L P の受容体の本体であることを見だし、siRNA による検討などからそれを証明した。LDL 受容体の発現はSterol element binding protein 2 (SREBP-2) によって制御されているが、PC-3 細胞ではその制御がきかず、脂質による細胞増殖が引き起こされていることが判明した。

さらに、H D L と前立腺癌に関する研究にも発展し、H D L は ABCA-1 を介して前立腺癌細胞増殖と遊走能の亢進をもたらすことを見いだす検討にも一部今回の研究は関与した。

また、高脂肪食を与えたマウスにおいて前立腺重量の差は認めないものの、NFκ B の亢進が認められ、さらに、グルタチオンペルオキシダーゼ3 (GPx3) の発現の抑制を認めた。G P X 3 は癌の悪性度とともに発現抑制が認められており、今後腫瘍マーカーとしての発展も期待された。

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 6 件)

① Sekine Y, Osei-Hwedie D, Matsuda K, Raghavachari N, Liu D, Furuya Y, Koike H, Suzuki K, Remaley AT: High fat diet reduces the expression of glutathione peroxidase 3 in mouse prostate. Prostate, 査読あり、in press.

② Sekine Y, Suzuki K, Remaley AT: HDL and sphingosine-1-phosphate activate stat3 in prostate cancer DU145 cells via ERK1/2 and S1P receptors, and promote migration and invasion. Prostate, 査読有 in press.

③ Koike H, Morikawa Y, Sekine Y, Matsui H, Shibata Y, Suzuki K: Survivin is associated with cell proliferation and has a role in 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 induced cell growth inhibition in prostate cancer. J Urol 査読有 2011, 185(4):1497-1503.

④ Sekine Y, Demosky SJ, Stonik JA, Furuya Y, Koike H, Suzuki K, Remaley AT: High-density lipoprotein induces proliferation and migration of human prostate androgen-independent cancer cells by an ABCA1-dependent mechanism. Mel Cancer Res 査読有 2010, 8(9), 1284-1294.

⑤ Hamano T, Matsui H, Sekine Y, Ohtake N, Nakata S, Suzuki K: Association of SNP rs1447295 and microsatellite marker DG8S737 with familial prostate cancer and high grade disease. J Urol 査読有 2010, 18482), 738-742.

⑥ Sekine Y, Koike H, Nakano T, Nakajima K, Takahashi S, Suzuki K: Remnant lipoproteins induced proliferation of human prostate cancer cell, PC-3 but not LNCaP, via low density lipoprotein receptor. Cancer Epidemiol 査読有 2009, 33(1), 16-23.

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 鈴木和浩、松井博、関根芳岳：前立腺癌における脂質の役割 第 69 回日本癌学会学術総会、2010.9.24 大阪国際会議行(大阪府)
- ② Sekine Y, Suzuki K, Remaley Y: HDL and sphingosin-1-phosphate activate signal transducer and activator of transcription 3 in prostate cancer DU145 cells via ERK1/2 and S1P receptors. 第 101 回米国癌学会学術総会 2010.4.20 ワシントンDCコンベンションセンター(ワシントンDC、アメリカ)
- ③ 松井博、福間裕二、濱野達也、小池秀和、関根芳岳、大竹伸明、中田誠司、鈴木和浩：家族性前立腺癌責任遺伝子の候補 FDFT1 遺伝子多型と機能解析についての検討 前立腺シンポジウム基礎部門 2009.12.14 品川コンファレンスセンター(東京都)
- ④ Fukuma Y, Matsui H, Hamano T, Ohtake N, Nakata S, Suzuki K: Association between common sequence variants in the FDFT1 gene and the prostate cancer risk in the Japanese population. 第 104 回米国泌尿器科学会 2009.4.26 シカゴコンベンションセンター(シカゴ、アメリカ)
- ⑤ Koike H, Sekine Y, Morikawa Y, Arai S, Furuya Y, Matsui H, Shibata Y, Suzuki K: Survivin is associated with cell proliferation and plays a role in 1 α ,25-dihydrovitamin D3 induced cell growth inhibition in prostate cancer. 第 104 回米国泌尿器科学会 2009.4.26 シカゴコンベンションセンター(シカゴ、アメリカ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 和浩 (SUZUKI KAZUHIRO)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80312891

(2) 研究分担者

伊藤 一人 (ITO KAZUTO)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00302472

松井 博 (MATSUI HIROSHI)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40450374

小池 秀和 (KOIKE HIKDEKAZU)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：90420091

萩原 弘一 (HAGIWARA KOICHI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：00240705