

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590361

研究課題名(和文) ヒト前立腺癌におけるインテグリンベータ4の発現とその意義

研究課題名(英文) Significance of the integrin beta4 in the human prostate cancer

研究代表者

吉岡 年明 (YOSHIOKA TOSHIKI)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：80302264

研究成果の概要(和文)：本研究ではintegrin $\beta 4$ が、ヒト前立腺癌において、進展を促進するように働いていると予想し、その仮説を検討する目的で、ヒト前立腺癌培養細胞DU145やLNCapにおいて、 $\beta 4$ がどのような役割を担っているのか、またヒト前立腺癌組織における、 $\beta 4$ とその関連分子の発現はどのようなのか、などについて検討した。ヒト前立腺癌細胞において、 $\beta 4$ はErbB2やc-Metと結合し、そのチロシンリン酸化を増強させて、*in vitro*における増殖や浸潤の増強、アポトーシスの抑制、さらに*in vivo*での腫瘍増大に関与していることが判明した。またヒト前立腺癌組織において、免疫染色にて $\beta 4$ の発現を検討したところ、半数以上の症例で腫瘍細胞に発現が認められ、 $\beta 4$ を発現している腫瘍細胞は、ErbB2やc-Metも発現していることが多いことが判明した。以上から、 $\beta 4$ が、ヒト前立腺癌において、ErbB2やMetシグナリングと関わり、腫瘍の進展を促進するように働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we hypothesized that integrin $\beta 4$ ($\beta 4$) may promote the progression of the human prostate cancer. To examine the hypothesis, we studied first, the role of $\beta 4$ in the human prostate cancer cells, DU145 and LNCap. Second, we tested the expression of $\beta 4$ and other molecules, which were concerned to $\beta 4$, in the human prostate cancer tissues. In the human prostate cancer cells, $\beta 4$ bonded ErbB2 and c-Met and made the cells increase proliferation and invasion, and decrease to get into apoptosis *in vitro* by reinforcing tyrosine-phosphorylation of ErbB2 and c-Met. $\beta 4$ also increased the size of the xenograft under the skin, *in vivo*. Immunohistochemical staining of $\beta 4$ on human prostate cancer tissues revealed that positive expression of $\beta 4$ was found more than half of the samples. Interestingly, many of $\beta 4$ positive cancer cells also expressed ErbB2 and c-Met. These results indicate that $\beta 4$ may promote the progression of human prostate cancer by cooperating with ErbB2 and Met signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理, インテグリンベータ4

1. 研究開始当初の背景

種々の癌においてintegrin $\beta 4$ ($\beta 4$)は、ErbB2

やMetなどのreceptor tyrosine kinaseの活性増強を介して、腫瘍の進展を促進する重要な役割を担っている。これまで前立腺癌においては、 $\beta 4$ の蛋白発現が癌化に伴い正常発現部位(基底層)から消失することから、その進展に関与しないと報告されていた (Cress et al., Cancer Met Rev, 1995)。

研究代表者らは、この $\beta 4$ が、*in vivo*における前立腺癌の進展にどのような役割を果たしているのか、またそれに関わるシグナリングを明らかにするために、チロシンリン酸化残基が豊富な、 $\beta 4$ 基質ドメイン部分の欠損マウス ($\beta 4$ -1355T: 1355番目以下のアミノ酸が欠損) を作製し (Nikolopoulos et al., Cancer Cell, 2004; Guo et al., Cell, 2006), このマウスを、provasinをpromoterとし、SV40を発現させて前立腺癌を発症する、TRAMP (Transgenic adenocarcinoma of mouse prostate) マウスに掛け合わせ、 $\beta 4$ -1355Tを導入し、腫瘍進展における影響を検討した。その結果、 $\beta 4$ はPINにおいて発現が上昇し、高分化腺癌でもそれが維持され、この段階、特にPINにおける増殖能、アポトーシスやangiogenesisに影響して、腫瘍の増大、生存期間の減少、組織学的悪性度の進展、転移形成能の増加に影響していることを確認し、 $\beta 4$ が、*in vivo*における前立腺癌の進展に重要な役割を果たしていることを示した。

2. 研究の目的

本研究ではintegrin $\beta 4$ ($\beta 4$)がマウスのみならず、ヒト前立腺癌においても、進展を促進するように働いていると予想し、その仮説を検討する目的で、ヒト前立腺癌培養細胞DU145やLNCapにおいて、 $\beta 4$ がどのような役割を担っているのか、また、ヒト前立腺癌組織における、integrin $\beta 4$ とその関連分子の発現はどうか、などについて検討する。

3. 研究の方法

ヒト前立腺癌培養細胞DU145やLNCapにおける $\beta 4$ の役割を検索するために、以下の方法を用いて検討する。

(1) $\beta 4$ をRNA interferenceして発現を低下させた影響をみる。

研究代表者らは、 $\beta 4$ および $\beta 4$ 関連分子のErbB2やMetなどを発現する、アンドロゲン非依存性のヒト前立腺癌培養細胞DU145を用いて、 $\beta 4$ のshort hairpin部分に対するRNA interference (sh-RNA) (Guo et al., Cell, 2006)により、 $\beta 4$ をノックダウンさせて発現を低下させ、*in vitro*における増殖能、浸潤能、アポトーシスおよびヌードマウス皮下におけるxenograftの腫瘍形成能などを、コントロール (sh-RNA; targeting AGCCACACTTGTGGAAC)と比較して検討する。また $\beta 4$ のノックダウンにより、 $\beta 4$ 関連分子のErbB2やc-Metなどがどのような影響を受けるのかについても検討する。

(2) $\beta 4$ をDNA transfectionして発現を増加させた影響をみる。

Integrin $\beta 4$ を発現しない、アンドロゲン依存性のヒト前立腺癌培養細胞LNCapに対して、プラスミドに組み込んだ wild typeの $\beta 4$ や $\beta 4$ 基質ドメイン部分の欠損した $\beta 4$ -1355TのDNA

(Nikolopoulos et al., Cancer Cell, 2004) をトランスフェクションして発現させることにより、LNCapがどのような影響を受けるのかを、増殖能、アポトーシスおよびヌードマウス皮下における

xenograftの腫瘍形成能などについて評価し、その役割を検討する。また内因性に発現しているErbB2がどのように影響されるのかも検討する。

(3) ヒト前立腺癌組織における、 $\beta 4$ とその関連分子の発現の検討については、主に免疫組織化学染色法を用いる。

$\beta 4$ や、ErbB2やc-Metなど $\beta 4$ と関連する可能性のある分子について、免疫組織化学染色に有効な特異的な抗体を検索し、約30例の組織標本における蛋白レベルでの発現を検討する。

4. 研究成果

(1) Integrin $\beta 4$ はErbB2やc-Metと結合し、これらのリン酸化を増強させている。

我々は、ヒト前立腺癌培養細胞DU145の $\beta 4$ に対するsh-RNAによるノックダウンにより、 $\beta 4$ の発現が低下した2つのクローン (#1, #2) を、またコントロールsh-RNAにより、 $\beta 4$ の発現の維持されたコントロールクローン(Co)を得た (図1左図)。これらのクローンを $\beta 4$ で免疫沈降 (Immunoprecipitation, IP) して、Western blot (WB) で共沈するErbB2やc-Metとの結合の程度をみたところ、コントロールクローン(Co)において、 $\beta 4$ とErbB2やc-Metが結合していることが判明した (図1右図)。

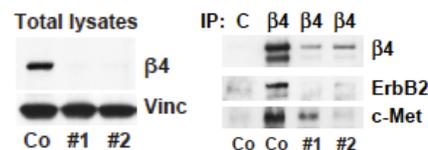


図1. $\beta 4$ のノックダウンによるクローン#1, #2およびコントロールクローン(Co)における $\beta 4$ の発現 (左図). $\beta 4$ による免疫沈降 (Immunoprecipitation, IP) と Western blot (WB) による発現 (右図). Coにおいて、 $\beta 4$ は、ErbB2やc-Metと共沈し、これらと結合していた。

これらのクローンを、ErbB2のヘテロダイマーであるErbB3のリガンドであるNeuregulin (NRG) やc-MetのリガンドであるHepatocyte growth factor (HGF)で刺激したところ、コントロールではErbB2やc-Metのチロシンリン酸化が認められたが、 $\beta 4$ をノックダウンしたクローン#1, #2ではチロシンリン酸化の有意な低下が認められた (図2, 3)。

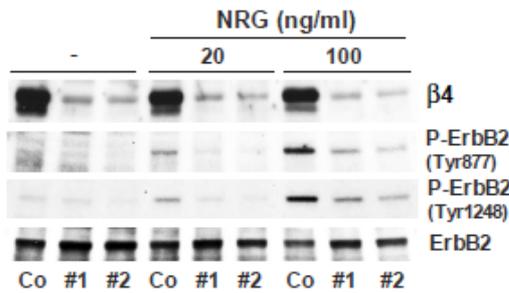


図2. NRG刺激時のErbB2の変化(WB). $\beta 4$ をノックダウンしたクローン#1, #2は, NRG刺激時のErbB2のチロシンリン酸化が有意に低下した.

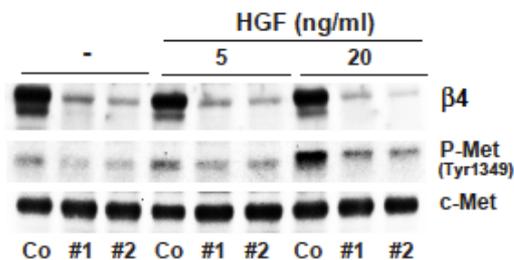


図3. HGF刺激時のc-Metの変化(WB). クローン#1, #2は, HGF刺激によるc-Metのチロシンリン酸化が有意に低下した.

(2) Integrin $\beta 4$ はErbB2やc-Metのリン酸化を増強させて, *in vitro*における増殖, 浸潤の増強に働き, また*in vivo*における腫瘍増大に関与している.

次に, これらのクローンをNRGやHGFで刺激して*in vitro*における増殖, 浸潤およびヌードマウス皮下における*in vivo*での腫瘍形成能をみたところ, クローン#1, #2において, 有意にBrdU陽性細胞数で示される増殖能の低下(図4), また, ボイデンチャンバーを用いたマトリゲルへの浸潤能の低下(図5)を認めたが, これらの低下は, fetal bovine serum (FBS)で刺激した際には差がみられなかった. さらに, ヌードマウス皮下におけるxenograftの腫瘍形成能を調べたところ, クローン#1, #2で有意に*in vivo*での腫瘍形成の低下が認められ, その低下は, 少なくとも一部は増殖能の低下の影響によることが判明した(図6).

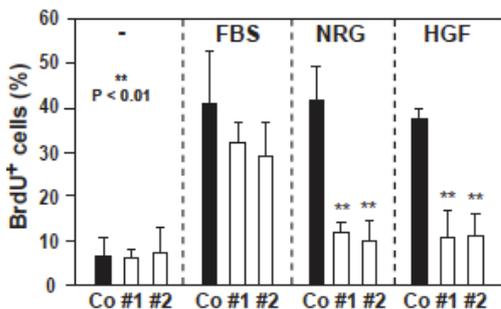


図4. *In vitro*における増殖能. $\beta 4$ をノックダウンしたクローン#1, #2は, NRGやHGF刺激によるBrdU陽性細胞数(増殖能)が有意に低下した.

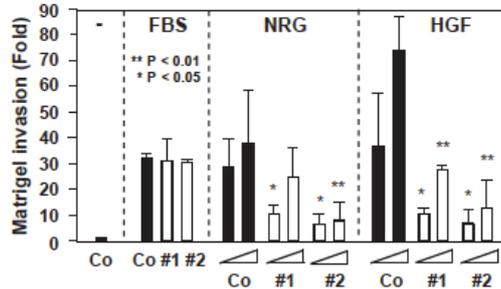


図5. *In vitro*における浸潤能. クローン#1, #2は, NRGやHGF刺激による浸潤能が有意に低下した.

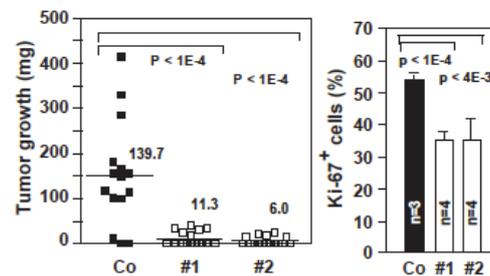


図6. *In vivo*での腫瘍形成能. クローン#1, #2は, ヌードマウス皮下での腫瘍形成が有意に低下し(左図), 腫瘍における増殖能の低下が認められた(右図).

以上から, $\beta 4$ は, ErbB2やc-Metと結合し, それらのチロシンリン酸化を増強させて, *in vitro*における増殖や浸潤また*in vivo*での腫瘍増大に関与していることが判明した.

(3) Integrin $\beta 4$ はErbB2のリン酸化を増強させて, アポトーシスを抑制している.

次に我々は, TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)を用いて, これらのクローンにアポトーシスを誘導し, その影響をTUNEL法で評価した. $\beta 4$ の発現が低下したクローン#1, #2は, 有意にアポトーシスに陥った細胞が増加した(図7). 夫々蛋白を採取してWBにて検索したところ, これらのアポトーシスはカスパーゼ経路を介しており, クローン#1, #2でアポトーシス産物であるcleaved caspase 8, 9, 6, 7, 3が増加していた(図8). 次に, $\beta 4$ と関連するErbB2とアポトーシスとの関係をみたところ, 図9に示すように, TRAILにより, クローン#1, #2でアポトーシスが増加する際, アポトーシス産物であるcleaved caspase 8 (Clev. Cas.)の増加とは逆に, ErbB2のチロシンリン酸化の低下が認められ(*), ErbB2阻害剤のAG825処理によりcleaved caspase 8がさらに増加した. またHRG(NRG)刺激により, ErbB2のチロシンリン酸化が増

加し(*), 逆にcleaved caspase 8の低下が認められた。これらの反応の際, コントロール(Co)ではErbB2のリン酸化は維持されており(*), アポトーシスに陥る細胞も少なかった。

以上より, TRAILによるアポトーシスを, $\beta 4$ はErbB2のリン酸化を維持することにより抑制している可能性が示された(図9)。

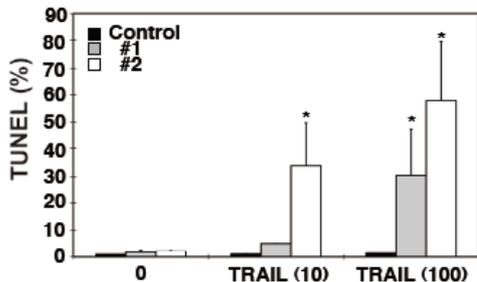


図7. TRAILで誘導したアポトーシスの割合(TUNEL法). $\beta 4$ をノックダウンしたクローン#1, #2は, アポトーシスが有意に増加した。

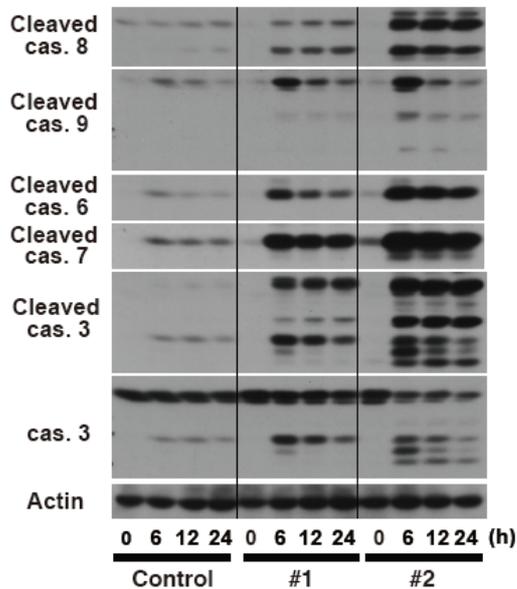


図8. TRAILで誘導したアポトーシスにおけるカスパーゼ経路の検討(WB). これらのアポトーシスはカスパーゼ依存性で, クローン#1, #2で, アポトーシス産物であるcleaved caspase 8, 9, 6, 7, 3が増加していた。

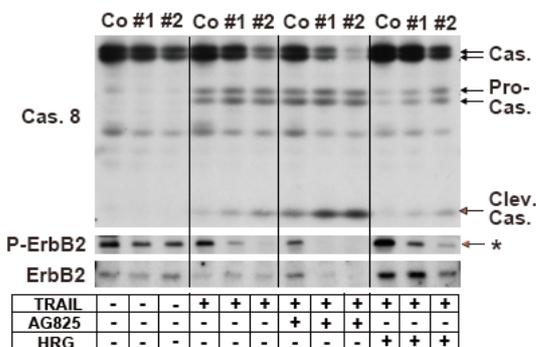


図9. TRAILで誘導したアポトーシスにお

けるErbB2の変化(WB). $\beta 4$ を発現するコントロール(Co)は, ErbB2のチロシンリン酸化を維持することにより, アポトーシスを抑制した。

(4) Integrin $\beta 4$ の導入は, ErbB2のリン酸化を増強させ, *in vitro*での増殖の増強および*in vivo*における腫瘍増大を導く。

我々は次に, $\beta 4$ を発現していないヒト前立腺癌培養細胞LNCapに対して, vectorに組み込んだwild typeの $\beta 4$ (WT)および $\beta 4$ 基質ドメイン部分の欠損した $\beta 4$ -1355T (TR)のDNAまたvectorのみをコントロール(Co)としてトランスフェクションし, その影響を検討した。また内因性に発現しているerbB2がどのように影響されるのかも検討した。図10における各クローンから, Co1, TR2およびWT2を選択し実験に用いた。これらのクローンをNRGで刺激し, 蛋白を採取してWBで検討すると, wild type- $\beta 4$ (WT2)では, control (Co1)や $\beta 4$ -1355T (TR2)と比較して, ErbB2のチロシンリン酸化の増強と, ErbB2のチロシンリン酸化部位に結合するShcのチロシンリン酸化の増強が認められ(図11左図), また増殖能の増加がみられた(図11右図)。

更に, WT2は, Co1や TR2と比較して, ノードマウス皮下における*in vivo*での腫瘍形成を有意に増加させ(図12左図), 形成された腫瘍は増殖能が高かった(図12右図)。

以上から, $\beta 4$ をノックダウンした結果と同様に, $\beta 4$ をトランスフェクションして発現させた場合も, $\beta 4$ は, ErbB2のチロシンリン酸化を増強させて, *in vitro*における増殖また*in vivo*での腫瘍増大に関与していることが判明した。

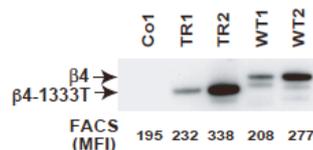


図10. Control vector (Co), truncated $\beta 4$ ($\beta 4$ -1355T, TR)およびwild type- $\beta 4$ (WT)を導入した各クローンの発現の程度(WB)。

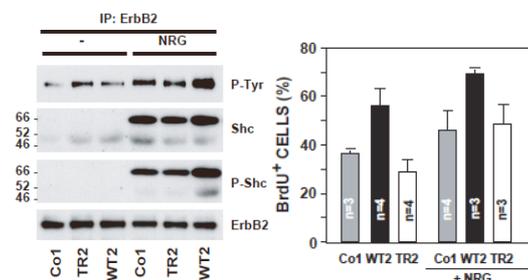


図11. NRG刺激時のErbB2やShcの変化(WB)と*in vitro*における増殖能. Wild type- $\beta 4$ (WT2)は, control (Co1)や $\beta 4$ -1355T (TR2)と比較して, NRG刺激時に, ErbB2のリン酸化の増

強とシグナル下流のShcのリン酸化の増強が認められ(左図), また *in vitro*での増殖能の増加もみられた(右図).

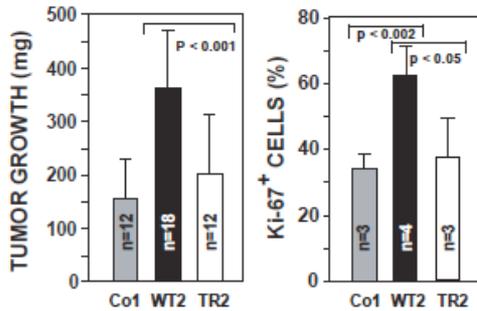


図12. *In vivo*での腫瘍形成能. Wild type-β4を導入したWT2は, control (Co1)や β4-1355T (TR2)と比較して, ノードマウス皮下での腫瘍形成を有意に増加させ(左図), その腫瘍における増殖能を増加させていた(右図).

(5) ヒト前立腺癌組織において, integrin β4は高頻度に発現し, ErbB2やc-Metとの共発現を認める.

我々は次にヒト前立腺癌組織を用いて, β4の発現と, ヒト前立腺癌培養細胞においてβ4との関連が確認された, ErbB2やc-Metの発現を, 免疫組織化学染色法を用いて検討した. これらの分子はいずれも, 正常腺管では二層構造を示す腺細胞のうち, 基底側の基底細胞に発現していた(*), 図13). また正常腺管の周囲に浸潤した癌細胞の細胞膜や細胞質に発現していた(図13). 前立腺癌組織におけるβ4の発現は半数以上に認められ, β4を発現する癌細胞は, ErbB2やc-Metも発現していることが多いことが確認された. 以上より, ヒト前立腺癌培養細胞で得られたβ4の役割が, ヒト前立腺癌組織でも働いている可能性が示唆された.

研究成果をまとめると, 本研究から, 前立腺癌において, β4がErbB2やMetシグナリングと関わり, 腫瘍の進展を促進するように働いている可能性が示唆された.

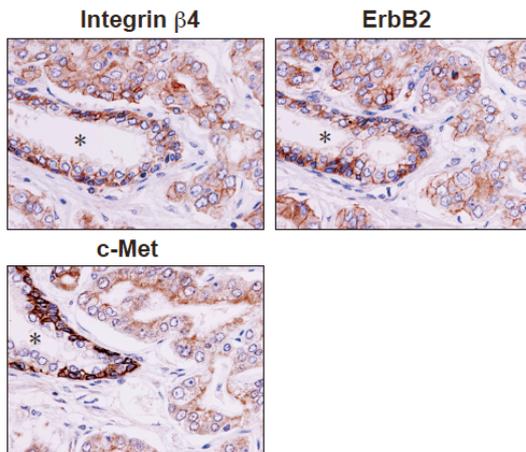


図13. 前立腺癌組織での, 免疫組織化学染色におけるβ4, ErbB2およびc-Metの発現. β4, ErbB2およびc-Metは何れも, 正常腺管では, 二層構造を示す腺細胞のうち, 基底側の基底細胞に発現し(*), また周囲に浸潤した癌細胞の細胞膜や細胞質に発現していた.

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 8 件)

- 1) Kawasaki Y, Omori Y, Li Q, Nishikawa Y, Yoshioka T, Yoshida M, Ishikawa K and Enomoto K. Cytoplasmic accumulation of connexin32 expands cancer stem cell population in human HuH7 hepatoma cells by enhancing its self renewal. *Int. J. Cancer* 査読あり 128: 2011, 51-62.
- 2) Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Futamura N, Kobayashi M, Toyoshima I, Yoshioka T, Enomoto K, Arai N and Arima K. Immunohistochemical characterization of microglia in Nasu-Hakora disease brains. *Neuropathology* 査読あり 30; 2011, in press.
- 3) Yoshioka T, Nishikawa Y, Ito R, Kawamata M, Doi Y, Yamamoto Y, Yoshida M, Omori Y, Kotanagi H, Masuko T and Enomoto K. Significance of integrin alphaVbeta5 and erbB3 in enhanced cell migration and liver metastasis of colon carcinomas stimulated by hepatocyte-derived heregulin. *Cancer Sci.* 査読あり 101: 2011-2018, 2010.
- 4) Yoshida M, Nishikawa Y, Yamamoto Y, Doi Y, Tokairin T, Yoshioka T, Omori Y, Watanabe H, Takahashi N, Yoshioka T, Miura I, Sawada K and Enomoto K. Mast cell leukemia with rapidly progressing portal hypertension. *Pathol. Int.* 査読あり 59: 817-822, 2009.
- 5) Nishikawa Y, Ohi N, Yagisawa A, Doi Y, Yamamoto Y, Yoshida M, Tokairin T, Yoshioka T, Omori Y and Enomoto K. Suppressive effect of orthovanadate on hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats. *Am. J. Pathol.* 査読あり 174 (3), 2009.
- 6) Obara K, Wada C, Yoshioka T, Enomoto K, Yagishita S, Toyoshima I. Acute encephalopathy associated with ingestion of a mushroom, *Pleurocybella porrigens* (angel's wing), in a patient with chronic renal failure. *Neuropathology.* 査読あり 28: 151-156, 2008.

[他 2 件]

[学会発表] (計 4 3 件)

[国際学会 計 5 件]

- 1) Otero JA, Yoshioka T, Koutcher JA, Greenberg NM, Gerald WL, Reuter V, Scher HI, and Giaccotti FG. (2011) Integrin $\beta 4$ signaling promotes prostate cancer initiation by affecting progenitor cells. Keystone symposia, March, Keystone, Colorado, USA.
- 2) Kawasaki, Y., Omori, Y., Li, Q., Nishikawa, Y., Yoshioka, T., Yoshida, M., Ishikawa, K., Enomoto, K. (2009) Cytoplasmic connexin32 induces a metastatic ability in non-metastatic HuH7 hepatoma cells by expanding cancer stem cell population. 100th. AACR, April, Denver, Colorado, USA
- 3) Nishikawa Y, Yoshida M, Sone M, Omori Y, Yoshioka T and Enomoto K. (2008) Identification of the junction between the intrahepatic and extrahepatic and extrahepatic bile ducts in adult and fetal mice. FASEB Conferences, July, Colorado, USA
[他 2 件]

[全国学会] (計 1 9 件)

- 4) 吉岡年明, 西川祐司, 大森泰文, 曾根正行, 矢野珠巨, 豊野美幸, 渡部泰弘, 高橋 勉, 榎本克彦 (2010) Peliosis hepatisを伴った myotubular myopathyの一例. 第99回日本病理学会総会, 4月, 東京.
- 5) Omori, Y., Kawasaki, Y., Yoshioka, T., Yamamoto, Y., Enomoto, K. (2010) Cytoplasmic accumulation of connexin32 expands cancer stem cell population by increasing GRP78 in HuH7 hepatoma cells. 第69回日本癌学会総会, 9月, 大阪.
- 6) 吉岡年明, 西川祐司, 大森泰文, 吉田正行, 川寄洋平, 曾根正行, 榎本克彦 (2009) 前立腺癌細胞におけるTRAIL誘導アポトーシスに対するintegrin $\beta 4$ の役割. 第98回日本病理学会総会, 5月, 京都
- 7) 西川祐司, 曾根正行, 大森泰文, 吉岡年明, 吉田正行, 榎本克彦 (2009) マウス肝傷害における細胆管反応の検討. 第98回日本病理学会総会, 5月, 京都
- 8) Nishikawa, Y., Sone, M., Omori, Y., Yoshioka, T., Enomoto, K. (2009) Stem-cell-independent ductular reaction and carcinogenesis in the mouse liver. 第68回日本癌学会総会, 10月, 横浜
- 9) 吉岡年明, 西川祐司, 大森泰文, 吉田正行, 川寄洋平, 榎本克彦 (2008) Integrin $\beta 4$ ノックダウンは前立腺癌細胞におけるTRAIL誘導アポトーシスを増強する. 第67回日本癌学会総会, 10月, 名古屋

[他 1 3 件]

[地方会] (計 5 件)

[研究会-全国規模] (計 1 4 件)

[図書] (計 4 件)

- 1) 吉岡年明, 榎本克彦 (2010) 肝・胆道系症候群 (第2版) - その他の肝・胆道系疾患を含めて - II. 肝臓編 (下) 肝粘表皮癌. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.14: 319-322.
- 2) 榎本克彦, 吉岡年明, 大森泰文 (2010) 肝・胆道系症候群 (第2版) - その他の肝・胆道系疾患を含めて - II. 肝臓編 (下) 肝肉芽腫. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.14: 310-314.
- 3) 西川祐司, 榎本克彦 (2008) 肝細胞の胆管上皮分化に関わる分子機構. 肝胆膵 57: 367-376.
- 4) 榎本克彦, 吉田正行, 東海林琢男, 齊藤昌宏, 吉岡年明, 大森泰文, 西川祐司 (2008) 肝類上皮肉芽腫. 肝胆膵 57: 513-520.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~byouril/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 年明 (YOSHIOKA TOSHIAKI)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：80302264

(2) 研究分担者

大森 泰文 (OMORI YASUFUMI)

秋田大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90323138

榎本 克彦 (ENOMOTO KATSUHIKO)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20151988

山本 洋平 (YAMAMOTO YOHEI)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70400512

西川 祐司 (NISHIKAWA YUJI)

秋田大学・大学院医学系研究科・准教授

(2008-2009)

研究者番号：90208166

吉田 正行 (YOSHIDA MASAYUKI)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：40451645

(2008)