

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791124

研究課題名 (和文) SND1 の前立腺癌における生物学的意義の解明と治療への応用

研究課題名 (英文) Study for biological function in prostate cancer of SND1 and its role for therapeutic target.

研究代表者 木村 高弘 (KIMURA TAKAHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00307430

研究成果の概要 (和文)：本研究は SND1 の前立腺癌における生物学的機能を検討することを目的とした。前立腺特異的 SND1 発現トランスジェニック (TG) マウスを作成し、生後 18 ヶ月後、前立腺の病理的検討を行った。前立腺における SND1 の発現を確認したが、前立腺癌の発生は観察されなかった。SND1 発現に伴う分子変化を検討するため、前立腺 RNA を用いてマイクロアレイを施行した。正常と TG マウスにおける mRNA の発現変化が大きい分子に関し real time PCR により、その発現変化を検討した。その結果から、SND1 発現に伴い発現が変化している分子を同定した。

研究成果の概要 (英文)：The aim of the study was to elucidate the biological function of SND1 in prostate cancer. Transgenic mouse expressed SND1 prostate-specifically was produced and the prostate was observed histologically. At the 18 months old, cancer was not observed in the prostate. To observe the molecular change according to SND1 expression, microarray was performed using total RNA extracted from the prostate. Change of expression was compared between TG and control mice and the change was confirmed by real time PCR. Some molecules were identified and thought to have roles in carcinogenesis of prostate cancer.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

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：①癌②泌尿器科③前立腺癌④バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は欧米先進国において男性が罹患する最も頻度の高い癌であり、高齢化社会を迎えた本邦においてもその頻度は近年急速に増加し、最も注目されている疾患のひとつである。前立腺癌に対する治療は、手術療法、放射線療法、化学療法、内分泌療法と多くの有効な治療法があるため、個々の症例の組織学的悪性度、進行度に応じて最も適切な治療法を選択することがその治療戦略を立てる上で重要である。このため治療前の臨床情報から患者をリスク分類し、治療効果の予測を行うことが一般的である。しかし、現状のリスク分類で用いられる因子（PSA、臨床病期、生検組織における悪性度（グリソンスコア））だけでは、正確なリスクの予測は困難であり、個々の患者の悪性度や治療への反応性などを反映する新たなバイオマーカーの出現が期待されている。これまでに独自に開発したアガロース二次元電気泳動法を用いたプロテオミクス解析により新たに前立腺癌で高発現している 36 種類の蛋白質を発見した(Kuruma H et al. *Proteomics*. 2005; 5(4):1097-112.)。これらはいずれも従来の遺伝子解析では捕らえられなかったものであるが、われわれはこの中から特に前立腺癌で特異性の高い発現を認めた *SND1* に注目した。これまでに行った前立腺癌臨床検体を用いた検討で、*SND1* の発現はグリソンスコア、ステージ等と有意な相関を持っていることが示されている (Kuruma H, Kimura T, et al. *Am J Pathol*. 2009 Jun;174(6):2044-50.)。

しかし *SND1* の生物学的な機能に関しては近年まで全く未知であった。最近大腸癌で高発現し、これが癌抑制遺伝子 *APC* の発現を抑制していることが報告された (Tsuchiya N et al. *Cancer Res*. 2007)。また、癌における蛋白変化に *micro RNA* や *RISC* による転写後調節の機序の重要性が注目されているが、*SND1* は *RISC* の構成蛋白であることも報告されている(Yang Y et al. *Nat Struct Mol Biol*. 2006)。これらの報告から *SND1* は前立腺癌の発癌、進行において重要な役割を演じている可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、*SND1* の前立腺癌の発癌メカニズムにおける役割について明らかにすることを目的とする。

*SND1* の直接的な発癌への関わりについて、前立腺特異的 *SND1* 発現トランスジェニックマウスの作成により検討する。この系では、前立腺特異的に遺伝子発現をする *ARR2PB* プロモーターの下流に *SND1* を搭載したプラスミドを用いてトランスジェニックマウスを作成することにより、*SND1* はマウス前

立腺特異的に強発現させ、これにより *SND1* の前立腺に対する直接的な作用を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) *SND1* ノックダウンに伴う細胞増殖変化の検討

① *SND1* を標的とした siRNA の作製

*SND1* を標的とした siRNA (Si-1, Si-2, Si-3) を作製し、*SND1* 発現前立腺癌細胞株 (PC3, LNCaP, DU145) に対しリポフェクション法により *SND1* のノックダウンを行った。トランスフェクト 2 日後のノックダウン効率を *real-time PCR* および *Western blot* 法を用いて検討した。

② *SND1* ノックダウンによる細胞増殖能の変化の検討

*SND1* 発現前立腺癌細胞株を siRNA (Si-1, Si-2, Si-3) により *SND1* ノックダウンを行い、3 日後の *SND1* ノックダウン効率を *real time PCR* 法にて、細胞増殖能の変化を *Cell count* 法により検討した。

③ *SND1* ノックダウンによるアポトーシスの検討

*SND1* ノックダウンによる細胞増殖能の低下の機序を検討するために、siRNA により前立腺癌細胞から *SND1* のノックダウンを行い、*TUNEL* アッセイを行った。

(2) 前立腺特異的 *SND1* 発現トランスジェニックマウスの作成による *SND1* 機能の検討

① 前立腺特異的 *SND1* 発現トランスジェニックマウスの作成

前立腺特異的に遺伝子を発現させる *probasin* プロモーターの改変型である *ARR2PB* プロモーター (Zhang J, et al. *Endocrinology*. 2000; 141(12):4698-710) 下流に *SND1* を挿入し、前立腺特異的 *SND1* 発現プラスミドベクターを作成し (図)、それにより前立腺特異的 *SND1* 発現トランスジェニックマウスを作成した。マウスは慈恵医大動物実験研究施設内で飼育した。



② 前立腺特異的 *SND1* 発現トランスジェニックマウスにおける前立腺癌発生の検討

18 月齢のトランスジェニックマウスおよびコントロールマウスから前立腺を摘出し、病理切片を作製、前立腺癌の発生を検討した。また、免疫染色により前立腺特異的 *SND1* 発現を検討した。

③ トランスジェニックマウスにおける *SND1* 発現に伴う分子変化の検討

*SND1* 発現に伴う、分子学的変化を検討する

ために、SND1 発現トランスジェニックマウスおよび同月齢の正常雄マウスから前立腺を摘出し、RNA を抽出、マイクロアレイを施行した。計 41252 種類のプローブで解析を行い、正常とトランスジェニックマウスにおける mRNA の発現変化が大きい分子をピックアップし、real time PCR を行い、その発現変化を確認した。

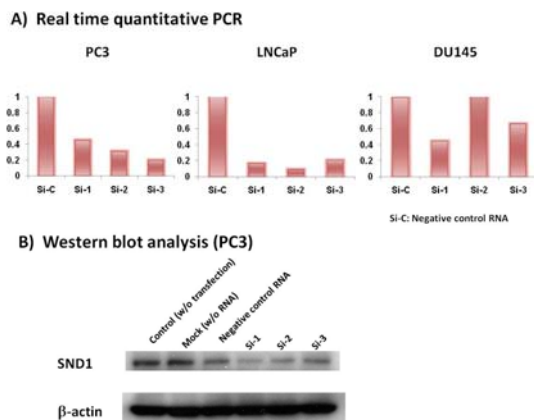
#### 4. 研究成果

(1) SND1 ノックダウンに伴う細胞増殖変化の検討

①ヒト前立腺癌細胞株における siRNA による SND1 ノックダウンの検討

SND1 を標的とした siRNA(Si-1, Si-2, Si-3)による SND1 発現前立腺癌細胞株(PC3, LNCaP, DU145)に対する SND1 のノックダウン効率を検討した。トランスフェクト 2 日後のノックダウン効率を real-time PCR および Western blot 法で SND1 発現の低下を確認した (図 1)。安定したノックダウンが得られた PC 3 をその後の検討に用いた。

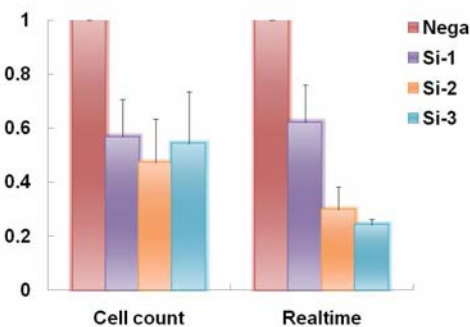
図 1



②SND1 ノックダウンによる細胞増殖能の変化の検討

PC3 を siRNA (Si-1, Si-2, Si-3)により SND1 ノックダウンを行い、3 日後の SND1 ノックダウン効率を real time PCR 法にて、細胞増殖能の変化を Cell count 法により検討した。SND1 ノックダウンにより細胞増殖は抑制された (図 2)。

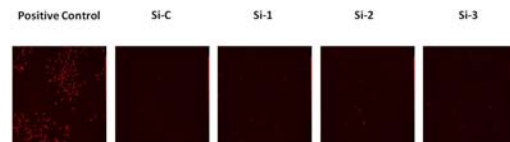
図 2



③SND1 ノックダウンによるアポトーシスの検討

PC3 を siRNA(Si-1, Si-2, Si-3)により SND1 のノックダウンを行い、3 日後に TUNEL アッセイを行った。有意なアポトーシスの誘導は観察されず、細胞増殖抑制はアポトーシスを介さない機序が示唆された (図 3)。

図 3

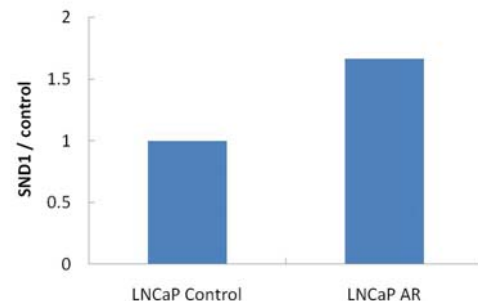


(2) 前立腺特異的 SND1 発現トランスジェニックマウスの作成による SND1 機能の検討

①前立腺特異的 SND1 発現トランスジェニックマウスの作成

前立腺特異的 SND1 発現プラスミドベクターにより前立腺特異的 SND1 発現トランスジェニックマウスを作成した。プラスミドによる前立腺特異的 SND1 の発現はアンドロゲンレセプター発現前立腺癌細胞株 LNCaP にトランスフェクションし、real time PCR 法を用いて検討した (図 4)。

図 4

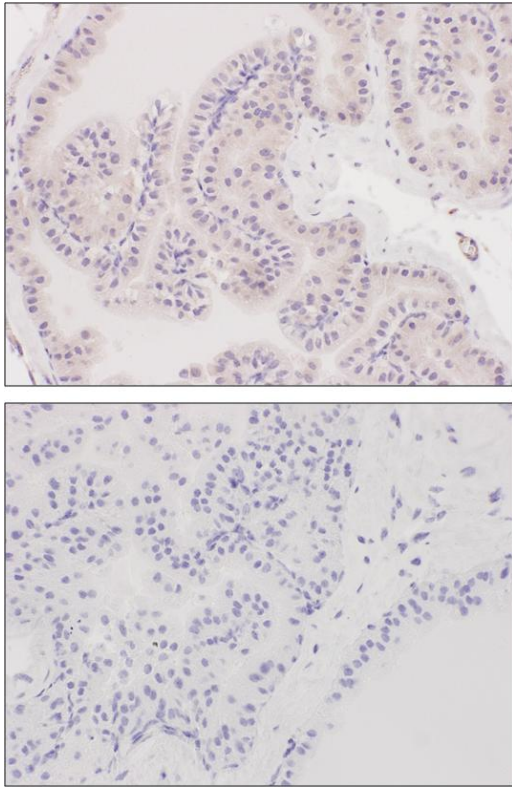


トランスジェニックマウスは計 3 系統作製され、慈恵医大動物実験施設内で継代されている。

②前立腺特異的 SND1 発現トランスジェニックマウスにおける前立腺癌発生の検討

18 月齢のトランスジェニックマウスおよびコントロールマウスから前立腺を摘出し、病理切片を作製、前立腺癌の発生を検討した。トランスジェニックマウスに前立腺癌の発生は確認できなかった (図 5)。一方、免疫染色により前立腺特異的 SND1 発現を確認した。

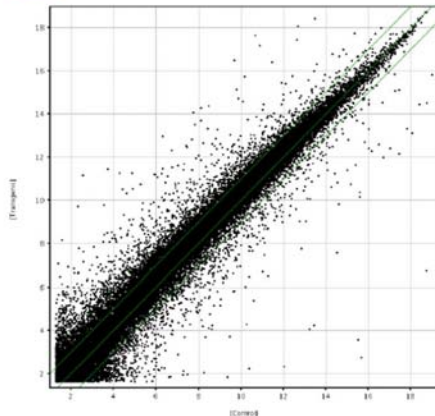
図 5



③トランスジェニックマウスにおける SND1 発現に伴う分子変化の検討

SND1 発現に伴う、分子学的変化を検討するために、SND1 発現トランスジェニックマウスおよび同月齢の正常雄マウスから前立腺を摘出し、RNA を抽出、マイクロアレイを施行した。計 41252 種類のプローブで解析を行い、正常とトランスジェニックマウスにおける mRNA の発現変化が大きい分子をピックアップし、real time PCR を行い、その発現変化を確認した。

【遺伝子発現の全体図 (Scatter Plot)】  
今回使用しましたarrayの解析対象Probe数は 41252 です。これらのRaw値をX軸:Control, Y軸: Transgenic にプロットした図が以下になります。



変化幅の上位遺伝子

(b) x 2.0			(c) x 0.5		
ProbeName	normalized	GeneSymbol	ProbeName	normalized	GeneSymbol
A_52_P569897	6.510566	LOC546006	A_51_P353162	-12.4303	Svs5
A_52_P311725	6.355051	Spink5	A_51_P331288	-7.38779	Akr1b7
A_51_P230267	5.882429	H2-Q10	A_52_P278375	-5.85285	Ms4a5
A_52_P416086	5.82185	Wfdc3	A_52_P544060	-5.75488	Ren1
A_51_P182631	5.69075	Mug1	A_51_P511000	-5.66784	C130090K23Rk
A_52_P602147	5.642744	Myh4	A_52_P295140	-5.66136	Glb1l3
A_51_P230269	5.419108	H2-Q10	A_52_P544251	-5.52546	A630095E13Rk
A_51_P224164	5.131953	Sic26a4	A_51_P362069	-5.40608	9530003J23Rk
A_52_P515629	5.130653	Opr83	A_52_P39505	-5.23031	EG317677
A_51_P261737	5.129848	Pdzk1	A_52_P94941	-5.16188	Gsdm1
A_51_P365516	4.899787	CF584628	A_51_P314107	-5.07054	Gsdm1
A_51_P211436	4.886034	Opr83	A_52_P192285	-4.95077	Ren2
A_51_P415395	4.847949	3300001A09Rk	A_51_P316673	-4.86303	2210407C18Rk
A_51_P329722	4.705302	S430419D17Rk	A_51_P462708	-4.77318	Wfdc15b
A_51_P241499	4.685256	Abo	A_51_P316661	-4.70659	Ren1
A_52_P583097	4.674972	EG244911	A_51_P300657	-4.64515	Nefh
A_51_P401828	4.578396	Mug2	A_52_P237176	-4.4903	Kiss1
A_52_P294663	4.488677	Sbp	A_52_P454640	-4.41509	LOC100037259
A_51_P169795	4.464743	Sbpl	A_51_P136781	-4.36731	Prllprp1
A_51_P502798	4.443871	D93002F11Rk	A_52_P114260	-4.32172	C1r

これらの結果から、SND1 発現に伴い、Spink5, Wfdc3, Mug1, Myh4 などの発現が増大する一方、Ms4a5, Ren1, Glb1l3, Gsdm1, Kiss1 などの発現が低下している事がわかった。これらの分子は前立腺癌の発癌に関係がある分子と考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 高弘 (KIMURA TAKAHIRO)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00307430