

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09581

研究課題名(和文) 前立腺癌の悪性度に関わる幹細胞マーカーSSEA-4の役割

研究課題名(英文) Functional analysis of stem cell marker SSEA-4 in prostate cancer cells

研究代表者

須田 哲司 (SUDA, Tetsuji)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40423347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Stage-specific embryonic antigen-4(SSEA-4)は、マウス初期胚で発見されたガンゲリオンドで、幹細胞の同定に利用されている。近年、SSEA-4は多くの高悪性度の固形癌で発現し、抗がん剤耐性との関連も報告されている。一方我々は、SSEA-4が前立腺癌の浸潤や生化学的再発、ホルモン療法抵抗性に関連することを報告してきた。本研究では、SSEA-4の生物学的な機能を解明するため、前立腺がん細胞株でSSEA-4合成酵素のST3GAL2遺伝子をノックアウトした。その結果、様々なシグナル伝達経路や癌に関与する多数の遺伝子発現が変化し、2種類の抗がん剤の耐性能が低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SSEA-4は高悪性度の固形癌で発現し、抗がん剤耐性やホルモン療法耐性と関連する。我々が、前立腺癌細胞株において、SSEA-4合成酵素のST3GAL2遺伝子をノックアウトしたところ、ノックアウト細胞株では2種類の抗がん剤に対する耐性能の低下を示した。これはST3GAL2の制御により、抗がん剤を減量でき、少ない有害事象で同程度の抗腫瘍効果を発揮できる可能性がある。また、比較的長期に抗がん剤を使用できると考えられ、予後延長が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4), which was originally found in mouse early embryo, has been used as a marker for identification of stem cells. In recent years, SSEA-4 has been reported to be expressed in highly malignant solid cancer cells. SSEA-4 was also associated with anti-cancer drug resistance in breast cancer and osteosarcoma. In prostate cancer, we showed that SSEA-4 was linked to the malignant potential such as invasion and biochemical recurrence after radical prostatectomy. Moreover, expression of SSEA-4 was associated with hormone resistance and greatly enhanced in castration-resistant prostate cancer cells. To clarify the biological function of SSEA-4 in prostate cancer cells, we knocked out SSEA-4 synthase ST3GAL2 gene. We found that ST3GAL2 knockout caused expression changes of many genes involved in various signaling pathways and cancers etc., and phenotypically resistance to two anti-cancer drugs were decreased in ST3GAL2 knockout clones.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：SSEA-4 ST3GAL2 前立腺癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は以前、腎癌転移巣において、Stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4) が高発現することを報告した。その後、SSEA-4 は高悪性度の膠芽腫や膀胱癌で高頻度に発現し、抗がん剤耐性となった乳がん細胞や骨肉腫で発現が増加することも報告されている。前立腺癌細胞株では、SSEA-4 の生物学的機能は上皮間葉転換 (EMT) や間葉系マーカー発現に関連することが報告された。一方我々は、前立腺癌の組織標本における SSEA-4 の発現が、1) 癌の浸潤 (pT3) や術後の生化学的再発と相関する、2) 去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) 組織に著明に高発現する、3) アンドロゲン受容体発現と逆相関することを明らかにした。

前立腺癌は進行すると、最終像としての CRPC となり、CRPC へ移行後の生存期間の中央値は約 3 年と限られている。したがって、CRPC の更なる生存期間の延長には、新たなアプローチが必要である。初期胚のような未分化細胞で SSEA-4 が発現し、EMT、術後再発や薬剤耐性と関連するなど、がん幹細胞としての特徴を示したことから、SSEA-4 を高発現する CRPC はがん幹細胞を多く含むと考えられる。したがって、SSEA-4 ならびにその合成酵素 ST3GAL2 を治療標的とすれば、CRPC の治療へとつながり、多くの難治癌に共通するがん幹細胞の普遍的な治療への道を切り開くと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、CRPC に高発現する SSEA-4 の機能を明らかにするため、CRISPR-Cas9 により前立腺癌細胞株の SSEA-4 合成酵素である ST3GAL2 遺伝子をノックアウト (KO) し、ST3GAL2 発現細胞株と ST3GAL2-KO 細胞株とで、増殖能、抗がん剤感受性等を比較する他、トランスクリプトームやパスウェイ解析を行い、ST3GAL2 関連分子や SSEA-4 と相互作用する分子を明らかにする。それらの関連分子の同定から、前立腺癌の悪性進展における SSEA-4 の生物学的役割を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ST3GAL2 ノックアウト (KO) 細胞株の作製

前立腺癌細胞株 DU145 に対し、CRISPR-Cas9 システムを用いた遺伝子変異の挿入と puromycin 薬剤耐性遺伝子発現カセットの相同組換えにより puromycin 耐性 ST3GAL2-KO 細胞株を樹立する。

#### (2) ST3GAL2 により機能制御される蛋白の同定

ST3GAL2-KO 細胞株と親株の mRNA をエクソームシーケンス解析により網羅的な比較解析を行い、細胞内の SSEA-4 関連分子を同定し、データベースに基づくシグナルネットワークを明らかにする。また、SSEA-4 関連分子の中から、悪性進展に関わる蛋白に対して、前立腺癌細胞株を用いた解析により検証し、機序を解析する。

#### (3) 前立腺癌患者血清中における SSEA-4 関連分子の解析

前立腺癌患者の血清を用い、SSEA-4 関連分子の血中分泌レベルと臨床病理学的所見との関連性を解析し、臨床病理学的な悪性進展との関連性を検証する。

#### (4) ST3GAL2-KO 細胞の細胞生物学的特徴解析

ST3GAL2-KO 細胞の増殖速度、抗がん剤感受性等を親株と比較検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) ST3GAL2-KO 細胞株の樹立

SSEA-4 発現を抑制するため、その合成酵素であるシアル酸転移酵素 ST3GAL2 の KO 細胞株を作製した (図 1)。DU145 に対し ST3GAL2 gRNA と puromycin 耐性遺伝子を co-transfection し、puromycin 耐性クローンを樹立した。ST3GAL2 遺伝子領域に puromycin 遺伝子が挿入されていることを RT-PCR にて確認後、ダイレクトシーケンスを行い、ST3GAL2 遺伝子変異 (c.1231\_1234del (NCBI RefSeq: NM\_006927.4)) を明らかにした。これらの両方の変異をもつクローンは SSEA-4 を特異的に認識するモノクローナル抗体 RM1 を用いた薄層クロマトグラフィー (HPTLC) -免疫染色により SSEA-4 が合成されていないことを確認し、ST3GAL2-KO 細胞株とした (図 2. クローン 13, 83)。

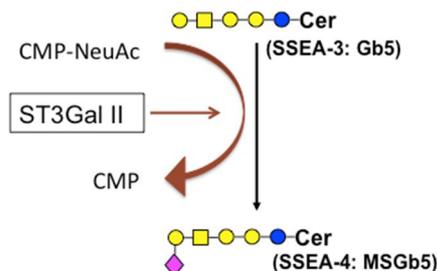


図 1. SSEA-4 の糖転移酵素

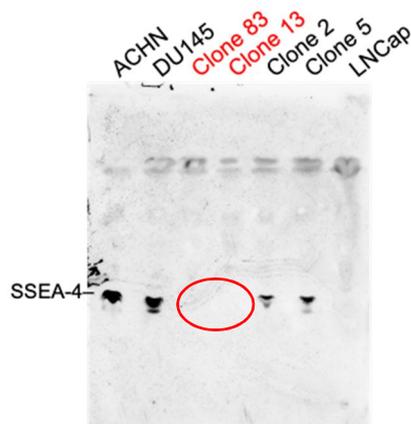


図 2. HPTLC による SSEA-4 発現

(2) ST3GAL2 により機能制御される蛋白の同定

ST3GAL2 により機能制御される分子を明らかにするため、ST3GAL2-KO 細胞株と親株による全エクソームシーケンス解析を行った。発現変動遺伝子解析 (Differentially Expressed Genes analysis) の結果、DU145 と比較して、ST3GAL2-KO 細胞株 クローン 13 は Fold change  $|Fc| \geq 2$  かつ  $p < 0.05$  の時、発現増加した遺伝子が 80、減少した遺伝子が 171。クローン 83 は増加した遺伝子が 179、減少した遺伝子が 236 認められた。これら 2 クローンに共通して増減 (増加 32、減少 90) が認められた遺伝子を ST3GAL2 と関連する candidate gene とした。また、これらの発現データを元に遺伝子オンロジーエンリッチメント解析 (Gene Ontology 解析) および KEGG パスウェイ解析を行い、発現変動遺伝子の中から、機能的関連のある遺伝子を絞り込み、さらに関連するシグナルカスケードを同定した。これらの結果から、ST3GAL2 はこれまでに報告のある上皮間葉転換のみならず、多くのシグナルカスケードにも関与していることが明らかとなった。

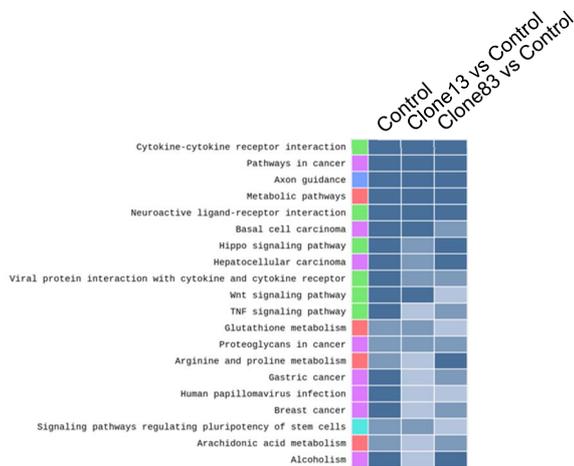


図 3 . KEGG パスウェイ解析

(3) 前立腺癌患者血清中における SSEA-4 関連分子の解析

ST3GAL2 欠損細胞株で発現低下が認められた遺伝子の中から、分化制御に関わる分泌蛋白に絞り込み、その中から IGF2 (Insulin Like Growth Factor 2)、PCSK1N (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1 Inhibitor) 蛋白に対する ELISA 検出系を構築した。CRPC、ホルモン感受性前立腺癌 (HSPC)、非担癌患者血清各 8 検体を用い、各蛋白の血中濃度を比較した結果、3 群間に差は認められなかった。今回の解析では患者の検体数が少ない上に、採血時期にも幅があり、今後、検体数を増やして臨床病理学的所見を含めた解析が必要である。

(4) ST3GAL2-KO 細胞株の生物学的特徴の解析

これまでの報告では、ST3GAL2 のノックダウンにより細胞接着性が低下することが報告されている。本研究においても、ST3GAL2 のノックアウトによりサイトカイン相互作用や癌関連蛋白の発現が変化することから、細胞増殖に影響を与えている可能性がある。そこで生細胞測定試験を用いて各クローンの細胞増殖速度を比較した。その結果、細胞増殖速度にはクローナルバリエーションが認められ、多くはその速度に親株との有意差が認められなかった (図 4)。次に、KO 細胞株 3 クローンと親株を用いて、7 つの抗

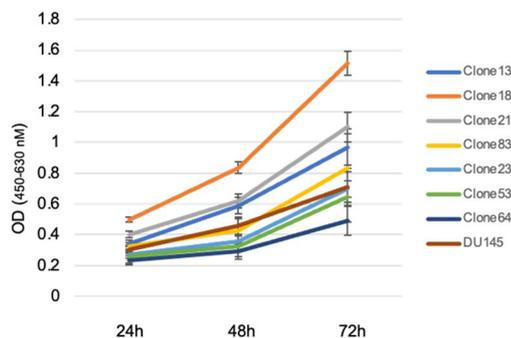


図 4 . 細胞増殖速度の比較

がん剤に対する薬剤感受性の違いをコロニーフォーメーションアッセイにより比較した。その結果、ドセタキセルとカバジタキセルにおいて欠損細胞株で有意に薬剤感受性が増加し、より低濃度の条件で増殖が抑制された (図 5, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.005$ )。

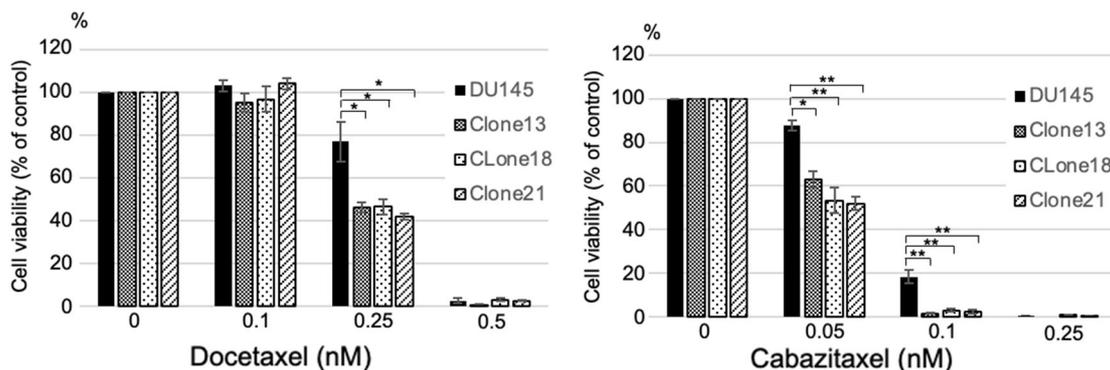


図 5 . コロニーフォーメーションアッセイによる薬剤感受性試験

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 HARADA JUNKI, MIYATA YASUYOSHI, TAIMA TAKENOBU, MATSUDA TSUYOSHI, MUKAE YUTA, MITSUNARI KENSUKE, MATSUO TOMOHIRO, OHBA KOJIRO, SUDA TETSUJI, SAKAI HIDEKI, ITO AKIHIRO, SAITO SEIICHI	4. 巻 41
2. 論文標題 Stage-specific Embryogenic Antigen-4 Expression in Castration-resistant Prostate Cancer and its Correlation With the Androgen Receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3327 ~ 3335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15120	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 Ashikari Asuka, Suda Tetsuji, Miyazato Minoru	4. 巻 14
2. 論文標題 Collagen type 1A1, type 3A1, and LOXL1/4 polymorphisms as risk factors of pelvic organ prolapse	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	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) 10.1186/s13104-020-05430-6	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 Matsumura Eiri, Kosuge Noritake, Nakanishi Shotaro, Suda Tetsuji, Sugawa Ai, Fujimura Tsutomu, Miyagi Ryota, Yoshimi Naoki, Saito Seiichi	4. 巻 252
2. 論文標題 Urine Lactoferrin as a Potential Biomarker Reflecting the Degree of Malignancy in Urothelial Carcinoma of the Bladder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 225 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.252.225	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 YUNO TSUTOMU, MIYATA YASUYOSHI, MATSUO TOMOHIRO, MUKAE YUTA, OTSUBO ASATO, MITSUNARI KENSUKE, OHBA KOJIRO, SUDA TETSUJI, SAITO SEIICHI, SAKAI HIDEKI	4. 巻 40
2. 論文標題 Relationship Between Stage-specific Embryonic Antigen-4 and Anti-cancer Effects of Neoadjuvant Hormonal Therapy in Prostate Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5567 ~ 5575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14569	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	齋藤 誠一  (SAITO Seiichi)  (80235043)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授   (18001)	

	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
研究協力者	仲西 昌太郎  (NAKANISHI Shotaro)		

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