

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18142

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺がんに対するアセチル化HMGB1を標的とした新規診断治療法の確立

研究課題名(英文) Roles of acetylated HMGB1 secreted from cancer cells in CRPC

研究代表者

後藤 景介 (Goto, Keisuke)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：30784251

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)：非ヒストンクロマチン結合タンパク質であるHMGB1は、通常核内に存在するが特定の条件下において細胞質内に移行し、シグナル分子として細胞外へ分泌され癌の増殖等に関わるとされる。前立腺癌において HMGB1の高発現例は前立腺全摘除術後の予後が悪かった。siRNA導入実験より、HMGB1が前立腺癌細胞の増殖に関わることがわかった。前立腺周囲脂肪組織(PPAT)における HMGB1 レベルを測定したところ、グリソンスコアが高い前立腺癌症例で有意に高かった。これらの結果から、がん微小環境で分泌された HMGB1 が PCa の進行に重要な役割を担っていることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺周囲脂肪組織中のサイトカインの発現が前立腺癌の悪性度と関連することはこれまでにない発見であり、前立腺癌におけるがん微小環境との関連を明らかにするための重要な結果であると考えられる。また、HMGB1の関与するシグナルは前立腺癌のみならず他臓器の腫瘍においても同様に存在すると考えられ、本研究で得られた知見は他のあらゆる癌腫へ応用可能である。

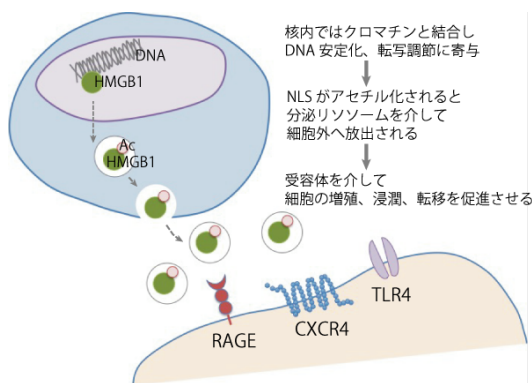
研究成果の概要(英文)：High mobility group protein box 1 (HMGB1), a non-histone chromatin binding protein, is normally present in the nucleus. Under certain conditions, HMGB1 is in the cytoplasm and secreted into the extracellular space as the signal molecule. Overexpression of HMGB1 was significantly associated with pT stage, Gleason score. The patients with higher cytoplasmic HMGB1 had significantly worse prognosis after radical prostatectomy. HMGB1 silencing significantly reduced cell proliferation in PCa cells. To assess roles of secreted HMGB1 in cancer microenvironment, HMGB1 levels in periprostatic adipose tissue (PPAT) in patients who underwent radical prostatectomy was investigated. HMGB1 levels in PPAT were significantly higher in cases with higher Gleason score. These results suggested that HMGB1 was associated with PCa progression and cell proliferation, and secreted HMGB1 in cancer microenvironment had significant roles in PCa progression.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：HMGB1 Prostate cancer Cancer microenvironment

1. 研究開始当初の背景

転移を有する進行性前立腺がんに対しては主に内分泌療法が行われるが、多くの症例で去勢抵抗性前立腺癌となり治療が奏功しなくなることが非常に大きな問題である。内分泌療法により組織学的には前立腺組織内で腺管が萎縮し前立腺癌細胞がアポトーシスに陥り、間質ではリンパ球を主体とする炎症細胞浸潤をきたすとされているが、その後の去勢抵抗性獲得の詳細な分子機構は未だ不明な点が多い。**High mobility group box 1 (HMGB1)** とは非ヒストン性の核蛋白であり、通常は核内でクロマチン結合因子として DNA の構造安定化に寄与する蛋白である。ところが HMGB1 中にある核内局在配列 (NLS) がアセチル化されると細胞質へ局在を変え、分泌リソソームを介して細胞外へ分泌される。細胞外の HMGB1 はシグナル伝達分子として TLR4、CXCR4 や RAGE などと結合して細胞増殖や浸潤、転移を促進させることが知られている。HMGB1 は損傷を受けた細胞から放出される DAMPs (Damage associated molecular pattern molecule) と呼ばれる蛋白の代表的分子であり、細胞外に放出された HMGB1 は受容体を介して NF- κ B シグナルを活性化させ炎症や免疫応答に重要な役割を持つとされる。HMGB1 により活性化されるシグナル経路はがんにおいても細胞増殖や浸潤、転移に関連すると考えられており、様々な癌腫において HMGB1 の発現が免疫組織化学あるいは定量 PCR を用いて検討され腫瘍促進的な作用が報告されている (Oncotarget 7(31): 50417, 2016、Oncotarget 8(38): 64534, 2017) が、HMGB1 の局在には言及されていない。



2. 研究の目的

HMGB1 (High mobility group box 1) は通常は核内に存在し、DNA の構造安定化や転写制御に関わっている蛋白であるが、HMGB1 の核内局在配列 (NLS) にあるリジン残基がアセチル化されることで細胞質内へ局在を移し、分泌リソソームにより細胞外へ分泌される。細胞外の HMGB1 はマクロファージなどの炎症細胞を局所へ引き寄せることや、TLR4、CXCR4 や RAGE を受容体として細胞増殖、遊走、血管新生に関与することが知られている。このような HMGB1 の細胞質内あるいは細胞外におけるはたらきは、炎症やがんの増殖に関わると言われており、このことから細胞質内の HMGB1 の発現が前立腺癌において去勢抵抗性獲得と関連しているのではないかとこの着想に至った。

本研究では前立腺がん病理組織検体や血清サンプルを材料として免疫組織化学あるいは ELISA 法を用いて HMGB1 の発現を評価、解析するよう計画した。

前立腺がんにおける HMGB1 の発現と局在変化を調べ、細胞質内すなわちアセチル化 HMGB1 が去勢抵抗性獲得と関連し、前立腺がんの新たな治療標的やバイオマーカーとなりうるかを明らかにし、新たな診断・治療法の確立に結びつけたい。

3. 研究の方法

[1] 免疫組織化学を用いた前立腺がんにおける HMGB1 発現解析

前立腺がん組織検体を材料に HMGB1 の発現を免疫組織化学にて評価する。細胞質内への HMGB1 の発現と組織学的悪性度 (グリソンスコア) や他の臨床的事項との関連を調べるとともに、内分泌療法後の予後との関連を解析し、HMGB1 の分泌が内分泌療法抵抗性と関連するかを明らかにする

[2] HMGB1 阻害下での前立腺がん細胞の増殖能、運動能の解析

ピルビン酸エチル (Ethyl pyruvate; EP) 投与した細胞において、培養上清中の HMGB1 が減少することと、他方で核内へ HMGB1 が蓄積することが確認されており (Oncotarget 8(16): 22649, 2017)、EP を用いることで HMGB1 の細胞外への分泌を阻害することができる。そこで、HMGB1 の細胞外への分泌が細胞増殖能および運動能に影響するかを調べるために前立腺がん細胞株 LNCaP、DU145 に EP を加えて HMGB1 の分泌を阻害し、細胞増殖能、細胞運動能を検討する。

[3] 前立腺周囲脂肪中の HMGB1 の発現解析

前立腺周囲脂肪 (periprostatic adipose tissue; PPAT) が前立腺癌の悪性度と関連していることが知られているため、PPAT 中の HMGB1 が何らかの影響があると想定し、PPAT から抽出した RNA を材料に qPCR 法で HMGB1 の発現量を調べた。

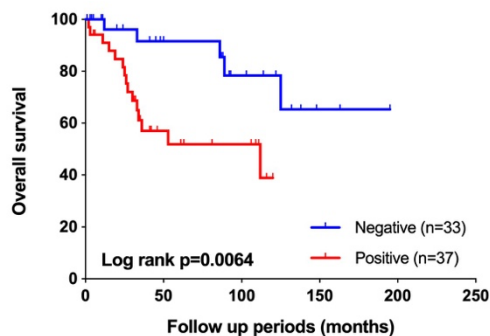
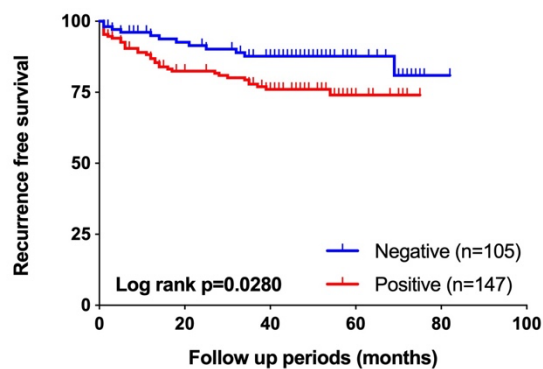
4. 研究成果

[1] 前立腺がんにおける HMGB1 の発現解析

前立腺癌において HMGB1 の高発現例は 252 例中 105 例 (41.3%) で認められ、pT ステージ

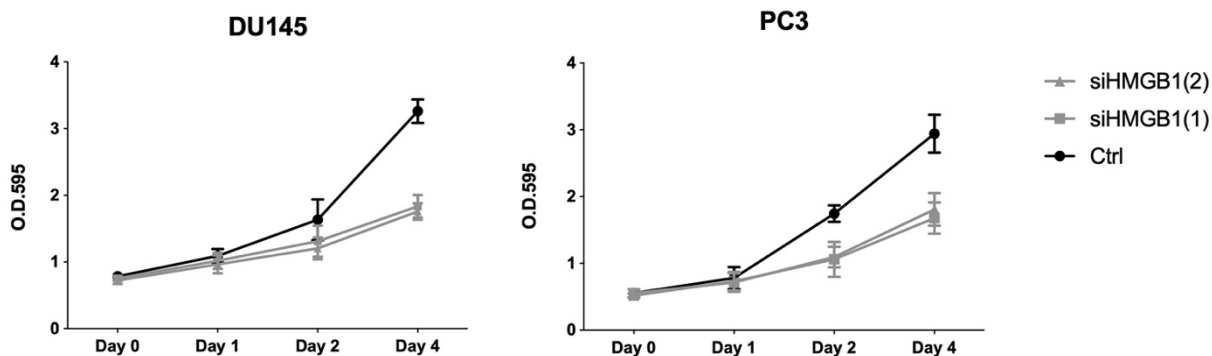
($p < 0.0001$)、グリソンスコア ($p = 0.002$)、リンパ管浸潤 ($p < 0.001$)、精嚢浸潤 ($p < 0.001$)、および ERG 遺伝子再構成 ($p = 0.004$) と有意な関連を示した。また、HMGB1 高発現例は前立腺全摘除術後の予後が有意に悪かった ($P = 0.028$)。転移性前立腺癌 70 例においても HMGB1 高発現例 ($N = 37$) は有意に予後不良であった。去勢抵抗性前立腺癌の生検組織を用いて免疫組織化学を行ったところ、20 例中 15 例 (75%) で HMGB1 の高発現が認められ、去勢抵抗性前立腺癌においては発現が増すことがわかった。

		IHC for HMGB1			p-value
		Negative	Positive	(%)	
pT stage	pT2	95	104	52.3	< 0.001
	pT3	10	43	81.1	
Gleason grade group	1-3	95	111	53.9	< 0.001
	4-5	10	36	78.3	
Extraprostatic extension	EPE0	87	86	49.7	< 0.001
	EPE1	10	39	79.6	
	EPEx	8	22	73.3	
Lymphovascular invasion	ly0	103	125	54.8	< 0.001
	ly1	2	22	91.7	
Vascular invasion	v0	96	118	55.1	< 0.012
	v1	9	29	76.3	
Seminal vesicle invasion	sv0	104	129	55.4	< 0.001
	sv1	1	18	94.8	
ERG rearrangement	Negative	83	133	62.4	0.004
	Positive	22	14	38.1	



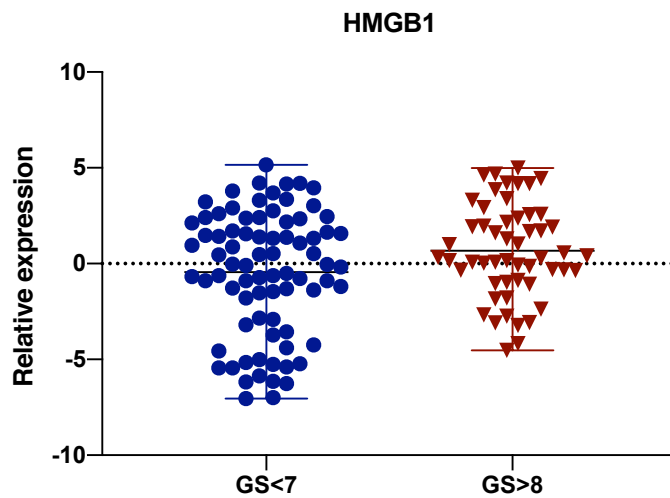
[2] 細胞増殖実験

siRNA 導入実験より、HMGB の発現を抑制させると細胞増殖が抑制された。また、培地に EP を添加して細胞増殖への影響を見たところ、EP は濃度依存性に前立腺癌細胞の増殖を抑制した。



[3] 前立腺周囲脂肪中の HMGB1 の発現解析

前立腺周囲脂肪組織 (PPAT) における HMGB1 レベルを測定したところ、グリソンスコアが高い前立腺癌症例で有意に高かった。これらの結果から、がん微小環境で分泌された HMGB1 が PCa の進行に重要な役割を担っていることが示唆される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Goto Keisuke, Honda Yukiko, Ikeda Kenichiro, Takemoto Kenshiro, Higaki Toru, Hayashi Tetsutaro, Kobatake Kohei, Nakamura Yuko, Sekino Yohei, Inoue Shogo, Awai Kazuo, Yasui Wataru, Teishima Jun	4. 巻 11
2. 論文標題 Tumor heterogeneity evaluated by computed tomography detects muscle-invasive upper tract urothelial carcinoma that is associated with inflammatory tumor microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-93414-2	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 Xue Jiaming, Patergnani Simone, Giorgi Carlotta, Suarez Joelle, Goto Keisuke, Bononi Angela, Tanji Mika, Novelli Flavia, Pastorino Sandra, Xu Ronghui, Carocchia Natascia, Dogan A. Umrhan, Pass Harvey I., Tognon Mauro, Pinton Paolo, Gaudino Giovanni, Mak Tak W., Carbone Michele, Yang Haining	4. 巻 117
2. 論文標題 Asbestos induces mesothelial cell transformation via HMGB1-driven autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 25543 ~ 25552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2007622117	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤 景介
2. 発表標題 CTテクスチャー解析を用いた筋層浸潤上部尿路上皮癌診断とHMGB1に誘導される腫瘍関連マクロファージの浸潤、腫瘍内微小環境の評価
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤 景介、関野 陽平、林 哲太郎、藤井 慎介、安井 弥、亭島 淳
2. 発表標題 分泌型HMGB1の前立腺癌における発現・機能解析
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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