

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号： 12701
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592034
 研究課題名（和文）前立腺がんスフェロイド形成に関与する遺伝子の機能解析と治療への応用
 研究課題名（英文） Functional analysis of prostate cancer spheroid-forming related genes and its clinical application
 研究代表者
 渡邊 昌俊（WATANABE MASATOSHI）
 横浜国立大学・工学研究院・教授
 研究者番号：90273383

研究成果の概要（和文）：本研究は、スフェロイドという環境における *plk2* を含む発現が増強された遺伝子群の基礎的解析及び治療への応用展開を図ることが目的である。その中でも *Plk2* 遺伝子に着目し、RNAi を利用して、その発現を抑制することで、前立腺がん細胞株 DU145 のスフェロイド形成への影響等を含めた同遺伝子の機能解析を目的とした。これら遺伝子群は、スフェロイド成長の抑制あるいは抗がん剤併用による抗がん剤の効果増強を確認した。

研究成果の概要（英文）：Some genes including the *Plk2* were extracted as a candidate gene related with spheroid formation. We analyzed effects of the *Plk2* on the spheroid characterization and anticancer drug resistance in DU-145 spheroids by suppressing *plk2* with RNAi. The results indicate that the *Plk2* may be involved in suppression of tumor growth and acquisition of anticancer drug resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：前立腺癌、スフェロイド、siRNA

1. 研究開始当初の背景

前立腺がんの基礎・臨床上的研究課題は、ホルモン不応性獲得および浸潤・転移能である。不応性獲得および浸潤・転移により前立腺がん患者に不幸な結末をもたらすことになるが、前立腺がんが局所で制御されるなら、予後も変わりうる。癌の浸潤・転移過程は、がん細胞が作り出す微小環境下で生存をはか

る細胞集合体で関与する場合、周囲の間質を含む微小・局所環境との相互作用が生じている場合などがあると考えられる。スフェロイド培養はこのように局所、特に無血管がん細胞モデルとして考えられ、我々は一般的に使用される 2 次元培養とスフェロイド培養における前立腺がん株の遺伝子発現の違いを明らかにした。

2. 研究の目的

腫瘍微小環境を表すと言われる LNCaP 前立腺がんスフェロイドにおける *plk2* を含む発現が増強された遺伝子群が抽出され、これら遺伝子群の基礎的解析及び治療への応用展開を図る。具体的には、(1)LNCaP 以外の細胞株における *plk2* 関与の検討、(2)*plk2* 遺伝子の機能解析、(3)他の抗がん剤と siRNA(*plk2*)の組み合わせで、抗がん剤効果の検討、(4)他の候補遺伝子の siRNA を用いて、同様の解析を行い臨床への応用展開を図ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)細胞株および2次元培養とスフェロイド培養：がん細胞株(LNCaP、DU-145、A549)を通常の2次元培養および細胞非接着培養器を用いたスフェロイド培養を行った。

(2)siRNAを用いた抽出遺伝子の発現抑制：抽出された遺伝子(*plk2*、*SEPTIN6*等)をそれぞれのsiRNAにて、発現を抑制した。

(3)抽出遺伝子の機能解析：siRNA処理時、非処理時におけるスフェロイド形成能(大きさ、細胞数、形態)、cell viability、細胞接着遺伝子の発現をRT-PCRあるいはReal-time PCRにて解析した。フローサイトメトリーを用いて、抗がん剤あるいは併用時のapoptosisを測定した。

4. 研究成果

(1)スフェロイドにおける*plk2*遺伝子のノックダウン効率：10あるいは100nM siRNA(*plk2*)を細胞播種時、3日目に導入し、再度各細胞株のスフェロイド形成および同遺伝子ノックダウン効率を解析した。両濃度で、7日目において70-80%のノックダウン効率を得た。

(2)スフェロイド形成に対する*plk2*遺伝子の関与：LNCaP前立腺がん細胞株スフェロイドと同様にDU-145前立腺がん細胞株スフェロイドは*plk2*遺伝子をノックダウンする事により体積は有意な減少を認めた(図1)。また、スフェロイド周囲が粗雑になり、細胞がこぼれ落ちる像を認めた。一方、A549細胞株のスフェロイドの体積は減少するが、有意差は認めなく、また細胞がこぼれ落ちる像も少なかった。*Plk2*遺伝子はスフェロイド形成に関与するが、細胞株によりその程度は異なると考えられた。

(3)抗がん剤(docetaxel:DTX)とsiRNA(*plk2*)を併用した時のスフェロイドへの影響：図2に示すようにDTXを単剤として加えた時より効果が上がるも、siRNA濃度には左右されなかった。これらはsubG1期の細胞が増加し、apoptosisが誘導されている事を確認した。一方、A549スフェロイドの場合は単剤と併用の間に差は認められなかった。

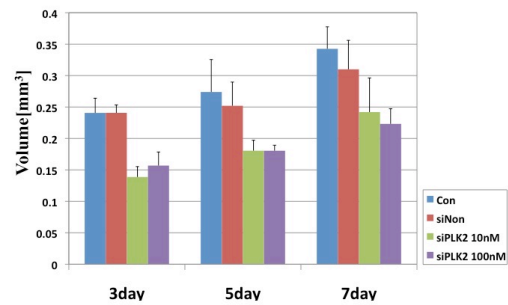


図1 各条件によるスフェロイド体積の経時変化

(4)DU-145 スフェロイドにおける接着関連遺伝子発現の解析：siRNA(*plk2*)添加、あるいは非添加スフェロイドにおいて、際籐の接着に重要な遺伝子、E-cadherin と Integrin $\alpha 5$ の発現を比べるも、有意な変化は認められなかった。*Plk2* 遺伝子のノックダウンによる薬剤感受性の上昇は他の接着遺伝子や薬剤排泄にかかわる遺伝子の関与の可能性が考えられた。

(5)他の抽出遺伝子群(*SEPTIN6*、*ACPP*、*NF1*)のスフェロイド形成および抗がん剤の感受性について：*SEPTIN6*および*NF1*では、siRNAによるノックダウンにてスフェロイド成長の抑制および併用による抗がん剤効果増強を認めた。*ACPP*では、併用による抗がん剤効果増強のみを確認した。このようにスフェロイドに特異的な遺伝子を抽出したが、その働きはここにより異なると考える。

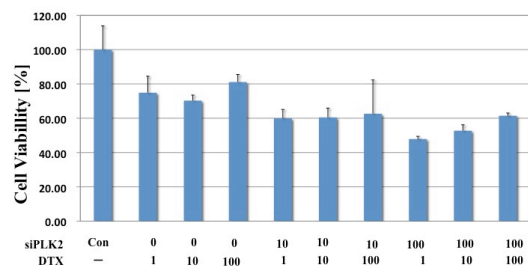


図2 DU-145 スフェロイドにおける siRNA(*plk2*)と DTX の効果について

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 12 件)

(1) D.Kami, S.Takeda, Y.Itakura, S.Gojo, M.Watanabe, and M.Toyoda. Application of the Magnetic Nanoparticles to Gene

- Delivery. Int. J. Mol. Sci. 査読有 12, 3705-3722, 2011 DOI 10.3390/ijms12063705
- (2) D.Kami, S.Takeda, M.Hatsune, M.Toyoda, Y.Itakura, S.Gojo, S.Kyo, A.Umezawa, M.Watanabe Efficient transfection method using deacylated polyethylenimine-coated magnetic nanoparticles. J. Artif. Organs 査読有 14, 215-222, 2011 DOI 10.1007/s10047-011-0568-6
- (3) 一町直樹, 栗岡大輔, 河井一明, 葛西宏, 松本幹治, 渡邊昌俊. 各種ナノ粒子の細胞への影響: 細胞特異性とその応用. 粉体工学学会誌 査読有 48, 145-151, 2011
- (4) 一町直樹, 佐藤明子, 栗岡大輔, 米田操, 広川佳史, 白石泰三, 渡邊昌俊. 前立腺癌化学療法における磁性体ナノ粒子の併用効果の基礎研究. 査読無 24, 1267-1269, 2011
- (5) D.Kurioka, A.Takagi, M.Yoneda, Y.Hirokawa, T.Shiraishi, M.Watanabe. Multicellular spheroid culture models: Applications in prostate cancer research and therapeutic Journal of Cancer Science and Therapy, 査読有 3(3), 60-65, 2011. DOI 10.4172/1948-5956.1000059
- (6) M.Watanabe. Editorial Comment on Article (Maspin expression in renal cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic parameters). Urology, 査読有 76, e3, 2010. DOI 10.1016/j.urology.2010.01.074
- (7) M.Sugimoto, T.Shiraishi, H.Tsunemori, T.Demura, Y.Saito, T.Kamoto, Y.Kakehi. Pathological findings at radical prostatectomy in Japanese prospective active surveillance cohort. Jpn J Clin Oncol, 査読有 40, 973-979, 2010. DOI 10.1093/jjco/hyq082
- (8) K.Kuroiwa, T.Shiraishi, O.Ogawa, M.Usami, Y.Hirano, S.Naito; Clinicopathological Research Group for Localized Prostate Cancer Investigators. Discrepancy between local and central pathological review of radical prostatectomy specimens. J Urol 査読有 183, 952-957, 2010 DOI 10.1016/j.juro.2009.11.02
- (9) 荒木里香, 三崎盛治, 町野由佳, 中山茂穂, 渡邊昌俊, 渡辺典子, 成瀬光栄 長期経過中に多彩な合併症を呈した McCune-Albright syndrome の 1 例. ホルモンと臨床 査読無 58, 192-197, 2010
- (10) M.Yoneda, Y.S. Hirokawa, A.Ohashi, K.Uchida, D.Kami, M.Watanabe, T.Yokoi, T.Shiraishi, S.Wakusawa. RhoB enhances migration and MMP1 expression of prostate cancer DU145. Exp. Mol. Pathol. 査読有 88, 90-95, 2009 DOI 10.1016/j.yexmp.2009.09.010
- (11) T. Osada, N. Kakazu, M. Watanabe, H. Yamane, T. Yagi. The chromosomal constitution of postmitotic neurons, assessed by neuronal nuclear transfer into oocytes and in ES cell lines derived from them. Cytogenet Genome Res. 査読有 125, 201-212, 2009 DOI 10.1159/000230004
- (12) 渡邊昌俊 ナノ粒子メディシン 医学のあゆみ 査読無 230, 493, 2009
- [学会発表] (計 11 件)
- (1) M.Watanabe, D.Kurioka, Y.Hamanaka, H.Ishiguro, H.Uemura, Y.Kubota, T.Shiraishi. Tumor microenvironment and prostate cancer: Effects of adipocytes on prostate cancer development and progression. An AACR International Conference on New Horizons in Cancer Research. Dec.13-16, 2011, Delhi, India.
- (2) 菅原健太郎, 讃良茂浩, 米田操, 広川佳史, 白石泰三, 高木陽光, 渡邊昌俊. 前立腺がんスフェロイドの抗癌剤抵抗性への plk2 遺伝子の関与について. 第 70 回日本癌学会 2011 年 10 月 5 日, 名古屋国際会議場, 名古屋市
- (3) 渡邊昌俊. 腫瘍と腫瘍微小環境. 化学工学会第 43 回秋季大会シンポジウム 2011 年 9 月 15 日, 名古屋工業大学, 名古屋
- (4) 渡邊昌俊, 広川佳史, 白石泰三. ヒト前立腺癌細胞の 3 次元培養における抗癌剤抵抗性の獲得機構について 2011 年 4 月 28 日~30 日, 第 100 回日本病理学会総会, パシフィコ横浜, 横浜
- (5) M.Watanabe, A.Takagi, Y.Hirokawa, T.Shiraishi. A prostate cancer spheroid related gene and chemotherapy. 102nd Annual Meeting of AACR, April 5, 2011, Orland, Florida.
- (6) 米田操, 渡邊昌俊, 高木陽光, 広川佳史, 白石泰三. 前立腺がんスフェロイド形成にかかわる遺伝子の解析 2010 年 9 月 22 日~24 日 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪国際会議場, 大阪
- (7) 渡邊昌俊, 広川佳史, 加藤貴彦, 鈴木啓悦, 市川智彦, 杉村芳樹, 白石泰三. 1 炭素代謝に関わる遺伝子多型と前立腺癌のリスクについて 2010 年 9 月 22 日~24 日 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪国際会議場, 大阪
- (8) 渡邊昌俊, 中野洋, 村田哲也, 白石泰

三. 前立腺癌における1炭素単位転移機構関連酵素遺伝子多型の解析
2010年9月11日 第57回日本臨床検査医学会学術集会 京王プラザホテル, 東京

- (9) 森田城次, 上大介, 米田操, 広川佳史, 白石泰三, 渡邊昌俊 前立腺癌スフェロイドの解析 2009年10月1日~3日 第68回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜, 横浜
- (10) 渡邊昌俊, 上大介, 広川佳史, 白石泰三 ヒト前立腺癌細胞の3次元培養における抗癌剤抵抗性の獲得とその機構について 2009年5月1日~3日 第98回日本病理学会総会 京都国際会館, 京都
- (11) 上大介, 渡邊昌俊, 長嶋洋治, 青木一郎 ヒト前立腺癌細胞と脂肪細胞との相互作用について 2009年5月1日~3日 第98回日本病理学会総会 京都国際会館, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 昌俊 (WATANABE MASATOSHI)
横浜国立大学・工学研究院・教授
研究者番号: 90273383

(2) 研究分担者

白石 泰三 (Shiraishi Taizo)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 30162762

