

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590463

研究課題名(和文) MID1 遺伝子を標的とした去勢抵抗性前立腺癌治療法確立のための機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of MID1 that may be a candidate as a therapeutic target for castration-resistant prostate cancer

研究代表者

高橋 智 (Takahashi, Satoru)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60254281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円

研究成果の概要(和文)：アンドロゲン依存性LNCaP細胞では、MID1発現量に相関してAR転写活性が増強したことから、MID1はARコアクチベーターである事が示唆された。アンドロゲン非依存性LNCaP-AI細胞で高発現しているCRYABもMID1と同様に、LNCaP細胞の浸潤能を促進することが明らかとなった。LNCaP-AI細胞におけるMID1をknockdownすると、CRYABの発現も低下するが、蛍光免疫染色では両者の核内における会合・結合を示唆する像はみられなかった。これらの結果から、MID1による前立腺癌浸潤能亢進機能は、CRYABを介したものである事が示唆されたが、その制御は直接的ではない事が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have established an androgen-independent (AI) subline from androgen-dependent LNCaP cells, and examined genes differentially expressed between LNCaP and LNCaP-AI by microarray analysis. We thereby found midline 1 (MID1) to be an upregulated gene in the latter. Knockdown of MID1 expression in LNCaP-AI cells resulted in significant suppression of invasion, and enforced expression of MID1 in LNCaP promoted an invasive capacity in the Matrigel chemoinvasion assay. MID1 also promoted AR transcriptional activity in gene dosage-dependent manner by luciferase reporter assay. CRYAB, one of upregulated gene in LNCaP-AI cells, promoted invasive ability and knockdown of it led to suppress invasion of prostate cancer cells in the same as MID1. However, interaction between MID1 and CRYAB did not confirmed by immunocytochemistry. These results suggest that MID1 is an AR coactivator and deeply involved in prostate cancer progression via CRYAB with an indirect manner.

研究分野：病理学

キーワード：前立腺癌 MID1/TRIM18

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌はホルモン依存性癌であり、1941年のHuggins & Hodgesの報告以来半世紀以上経過した今日においても、アンドロゲン除去を中心としたホルモン療法はヒトの前立腺癌治療の主流となっている。転移のある進行性前立腺癌でも初期のホルモン療法が80%以上の症例で有効であるが、その半数以上は5年以内にホルモン非依存性となり再発することが知られている。アンドロゲン非依存性形質を持つ去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC) になると予後不良であり、あらゆる治療に抵抗性で再燃後数年以内にほとんどの症例が死亡する。現在までの前立腺癌の基礎的研究、新薬・治療法の開発にもかかわらず、CRPCの予後はほとんど変化せず、前立腺癌治療において大きな問題となっている。前立腺癌においても現在までにアンドロゲン非依存性形質獲得に関わるメカニズムとしてアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子点突然変異、AR 遺伝子増幅、AR 関連コアクティベーター発現、AR プロモーター領域の高メチル化、IL6 高発現、HER2 高発現などが報告されている。しかしこれらの現象だけでは大多数の症例を説明することはできず、未だ解明されていない他のメカニズムが存在すると考えられている。我々は新たなメカニズムを探求する目的で、剖検により得られた CRPC 組織と前立腺摘出術から得られた限局性前立腺癌組織の2つをサンプルとして cDNA サブトラクションの1つである cDNA-Representational difference analysis (RDA)法を行った。その結果、CRPCで特異的に発現が低下している遺伝子として Lsm1, XBP-1 および Prostatein の3遺伝子を検出し、Lsm1 発現低下は浸潤能、転移能を促進し、XBP-1, Prostatein 発現と組織異型度は逆相関することが明らかにした (Takahashi S et al, Down-regulation of Lsm1 is involved in human prostate cancer progression. *Brit J Cancer*, 86:940-946, 2002; Takahashi S et al, Down-regulation of human X-box binding protein 1 expression correlates with tumor progression in human prostate cancers. *Prostate*, 50:154-161, 2002, Takahashi S et al, Down-regulated expression of prostatein in high-grade or hormone refractory human prostate cancers. *Prostate*, 54:187-193, 2003)。しかしアンドロゲン非依存性形質獲得メカニズムの一旦を担うような機能はこれらの遺伝子に見出すことはできず、むしろ比較した癌組織の組織分化度の差異を反映した結果となった。このように個体差の激しいヒト臨床検体を使用した場合には両者間の発現プロファイルがあまりにも異なるために、アンドロゲン非依存性獲得に関わる本質的な遺伝子を見極めることは非常に困

難であると推測された。このような問題点を克服するためにはアンドロゲンに対する反応性以外は極力近似した形質を示すサンプルを用いることが重要であることが示唆された。

### 2. 研究の目的

我々はアンドロゲン依存性形質のみが異なる前立腺癌細胞を得るために、アンドロゲン依存性増殖を示すヒト前立腺癌細胞 LNCaP を、チャコール処理してアンドロゲンなどのステロイドホルモン全般を除去した血清を含む培地と通常用いるアンドロゲン含有培地とを交互に処理することにより、アンドロゲン非依存性増殖能を獲得した LNCaP 細胞 (LNCaP-AI) を4株確立した。これらの LNCaP-AI 細胞はいずれも AR 発現、ジヒドロテストステロン (DHT) に対する反応性が保持されており、アンドロゲン含有培地で維持した場合には LNCaP 細胞と同様の増殖速度を示すのに対し、浸潤能は有意に亢進していることを明らかにしている。また、LNCaP, LNCaP-AI 細胞から抽出した RNA を用いてマイクロアレイによる網羅的解析を行い、特異的に発現変動を示す遺伝子群をすでに同定しているが、それらの個々の遺伝子がアンドロゲン非依存性獲得あるいは浸潤能亢進にどのように関連しているかについては不明な点が多い。現在我々は LNCaP 細胞に比較して LNCaP-AI 細胞で13倍高発現している Midline 1 (MID1) 遺伝子に注目している。MID1 は TRIM ファミリーに属する RING finger タンパクの1つで、E3 ユビキチンリガーゼ活性を有しており、先天異常である Opitz/BBB 症候群の責任遺伝子として知られている。今回の研究では MID1 がアンドロゲン非依存性形質獲得、浸潤能亢進にどのように関与しているかについてその分子メカニズムを解明し、去勢抵抗性前立腺癌治療の標的分子としての可能性について検討した。

### 3. 研究の方法

#### <抗体>

使用した抗体は以下の通りである。AR (Santa Cruz Biotechnology), PSA (DAKO), MID1 (Sigma), CRYAB (Stressgen), Actin (Sigma), Lamin A/C (Cell Signaling Technology).

#### <ベクター構築>

pCDNA3.1-myc-His バックボーンベクターに MID1/TRIM18 あるいは CRYAB 遺伝子の ORF を組み込み、それぞれの発現ベクターを構築した。また、TIP60, p300 については、OriGene Technologies から発現ベクターとしてそれぞれ pCMV6-KAT5, pCMV6-EP300 およびその対照として pCMV6 entry を購入した。

#### <レポーター・アッセイ>

レポーター遺伝子として PSA 遺伝子プロモ

ーター (6kb) を組み込んだ pGL3-PSA promoter、導入効率をみるための内部コントロールとして phRLTK を LNCaP あるいは LNCaP-AI 細胞に Nucleofector (Lonza Cologne AG) を用いて electroporation 法で遺伝子導入した。遺伝子導入後はチャコール処理した培地を用いて 96 ウェルで培養し、24 時間後に DHT を添加する群としない群を設けた後、24 時間後に Dual luciferase reporter assay system (Promega Co.) を用いて AR 転写活性に対する影響を検討した。

#### <CRYAB 発現安定株の樹立>

pcDNA3.1-myc-His-CRYAB を LNCaP 細胞に electroporation 法を用いて導入し、neomycin で selection 後に ring cloning 法で細胞を単離した。

#### <ケモインベージョン・アッセイ>

Biocoat Matrigel Invasion Chamber (Corning Inc.) を用いてアッセイを行った。チャンパー上層には 0.1% BSA 含有 RPMI1640 培地中に  $5 \times 10^5$  個の遺伝子導入細胞を、下層には fibronectin (10microg/ml) 含有培地を入れ、48 時間後に浸潤細胞数を計測した。

#### <ウエスタン解析>

LNCaP あるいは LNCaP-AI 細胞を RIPA バッファー (150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl (pH8.0), 0.2mM sodium orthovanadate, protease inhibitor (Complete cocktail)) に溶解後、SDS-PAGE に展開し、ニトロセルロースメンブレンに転写し、種々の抗体を用いて解析した。核成分、細胞質成分の分画には Nuclear/cytosol fractionation kit (BioVision) を使用した。

#### <蛍光免疫染色>

培養した LNCaP あるいは LNCaP-AI 細胞を培地を除去後、ホルマリンにて固定し、Tween 20 による permeabilization を行った後、各種抗体を用いて染色を行った。染色後は Keyence BZ-9000 を用いて検討した。

#### <組織アレイを用いた免疫組織染色>

無治療状態のヒト前立腺癌 48 例を搭載した組織アレイを、パラフィンブロック専用アレイヤー装置 (KIN-1 型、株式会社東屋医科器械) を用いて作成した。MID1 抗体を用いた免疫染色は、自動免疫染色装置 (BondMax, Leica) を用いて染色した。

## 4. 研究成果

MID1/TRIM18 を LNCaP 細胞に強制発現する際に、その発現量を変化させることで AR 転写活性がどのように変化するかを PSA プロモーターを組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターを用いて検討したところ、導入したベクター DNA 量に相関して AR 転写活性が DHT 存在下で増強する事が確認された。このことから MID1/TRIM18 は AR のコアクチベーターである可能性が示唆された。

Reymond らの総説 (EMBO J, 9:2140-2151, 2001) では MID1/TRIM18 は細胞質に存在するとされていることから、MID1/TRIM18 が実際に核内に移行する可能性について検討した。MID1/TRIM18 を強制発現させた LNCaP 細胞の細胞質および核分画タンパクを調整して MID1/TRIM18 発現をみると、核および細胞質に MID1/TRIM18 タンパク発現が観察され、その発現量は両者とも DHT 存在下で亢進することが観察された。また、蛍光免疫染色による検討においてもウエスタン解析と同様に、MID1/TRIM18 タンパクは核、細胞質に存在し、DHT 存在下では特に核内 MID1/TRIM18 発現量が増強する傾向が認められた。以上の結果から、MID1/TRIM18 タンパクは核内に移行することで AR 転写活性に対して促進的に働き、新規の AR コアクチベーターである事が示唆された。そこで、MID1/TRIM18 と他の転写因子との相互作用の有無について検討した。過去の報告では、MID1/TRIM18 と同じ TRIM ファミリー分子である TRIM24, TRIM68 は AR コアクチベーターとしての機能が明らかにされており、アセチルトランスフェラーゼ活性を有する TIP60, p300 と結合することで AR 転写活性を制御していることが知られている。そこで TIP60, p300 の発現ベクター、MID1/TRIM18 発現ベクター、PSA プロモーターレポーターと同時に LNCaP 細胞にトランスフェクションし、レポーターアッセイにより解析した。その結果、MID1/TRIM18 による TIP60, p300 転写活性増強効果は認められず、MID1/TRIM18 の AR コアクチベーターとしての機能は転写因子との相互作用によるものではない可能性が示唆された。

そこで、別のメカニズムを想定し、MID1/TRIM18 と同様に LNCaP 細胞に比較して LNCaP-AI 細胞で高発現 (11 倍) している alphaB-crystallin (CRYAB, HspB5) に着目した。その理由として、AR タンパクが核内移行する際に重要な役割を演ずる熱ショックタンパクの 1 つとして Hsp27 (HspB1) が知られているが、CRYAB は Hsp27 に類似した構造を有する熱ショックタンパクであることが挙げられる。MID1 と同様に、CRYAB を LNCaP 細胞に強制発現させることでその浸潤能は亢進し、LNCaP-AI 細胞における CRYAB を knockdown させることで、その浸潤能が抑制されることが明らかとなった。MID1/TRIM18, CRYAB を高発現している LNCaP-AI5, -AI8 細胞に siRNA をトランスフェクションすることにより MID1 を knockdown すると、それに連動して CRYAB の発現も低下することが確認された。しかしながら、これらの細胞において CRYAB 発現は DHT の存在下、非存在下に関わらず顕著な変動はみられず、蛍光免疫染色においても DHT 添加による CRYAB タンパクの核内移行は観察されなかった。また、MID1/TRIM18 と CRYAB の二重蛍光免疫染色

では両者の会合・結合を示唆する像はみられなかった。これらの結果から、MID1による前立腺癌浸潤能亢進機能は、その下流に存在するCRYABを介したものである事が示唆されたが、その制御は直接的ではなく、何らかの分子を介したものである事が考えられた。

無治療状態のヒト前立腺癌におけるMID1/TRIM18タンパク発現を免疫組織染色によって検討した結果、Gleason patternが高くなる、すなわち分化度が低くなるに従ってMID1/TRIM18発現量は有意に増加しており、悪性度が高い癌ではMID1/TRIM18発現が亢進していることが明らかとなった。しかしながらこれらのMID1/TRIM18陽性像はいずれも細胞質で観察され、核内における発現は明らかではなかった。

#### 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15件)

1. Etani, T., Suzuki, T., Naiki, T., Naiki-Ito, A., Ando, R., Iida, K., Kawai, N., Tozawa, K., Miyata, N., Kohri, K., Takahashi, S.: NCL1, a highly selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, suppresses prostate cancer without adverse effect. *Oncotarget*, 6: 2865-2878, 2015. (査読あり、<http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=3067>)
2. Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Kuno, T., Punfa, W., Long, N., Kato, H., Inaguma, S., Komiya, M., Shirai, T., Takahashi, S.: Establishment of a syngeneic orthotopic model of prostate cancer in immunocompetent rats. *J Toxicol Pathol*, 28: 21-26, 2015. (査読あり、[https://www.jstage.jst.go.jp/article/tox/28/1/28\\_2014-0050/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/tox/28/1/28_2014-0050/_pdf))
3. Naiki-Ito, A., Chewonarin, T., Tang, M., Pitchakarn, P., Kuno, T., Ogawa, K., Asamoto, M., Shirai, T., Takahashi, S.: Ellagic acid, a component of pomegranate fruit juice, suppresses androgen-dependent prostate carcinogenesis via induction of apoptosis. *Prostate*, 75: 151-160, 2015. (査読あり、DOI 10.1002/pros.22900)
4. Tozawa, K., Yasui, T., Umemoto, Y., Mizuno, K., Okada, A., Kawai, N., Takahashi, S., Kohri, K.: The pitfalls of robot-assisted radical prostatectomy: A comparison of positive surgical margins between robotic and laparoscopic surgery. *Int J Urol*, 21: 976-979, 2014. (査読あり、DOI 10.1111/iju.12492)
5. Naiki, T., Naiki-Ito, A., Asamoto, M., Kawai, N., Tozawa, K., Etani, T., Sato, S., Suzuki, S., Shirai, T., Kohri, K., Takahashi, S.: GPX2 overexpression is involved in cell proliferation and prognosis of castration-resistant prostate cancer. *Carcinogenesis*, 35: 1962-1967, 2014. (査読あり、DOI 10.1093/carcin/bgu048)
6. Sato, S., Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Komiya, M., Long, N., Kato, H., Sagawa, H., Yamashita, Y., Shirai, T., Takahashi, S.: Establishment of an invasive prostate cancer model in transgenic rats by intermittent testosterone administration. *J Toxicol Pathol*, 27: 43-49, 2014. (査読あり、DOI 10.1293/tox.2013-0052)
7. Tang, D., Kryvenko, O.N., Wang, Y., Trudeau, S., Rundle, A., Takahashi, S., Shirai, T., Rybicki, B.A.: Elevated 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-DNA adducts in benign prostate and subsequent risk for prostate cancer. *Int J Cancer*, 133: 961-971, 2013. (査読あり、DOI 10.1002/ijc.28092)
8. Pitchakarn, P., Chewonarin, T., Ogawa, K., Suzuki, S., Asamoto, M., Takahashi, S., Shirai, T., Limtrakul, P.: Ellagic acid inhibits migration and invasion by prostate cancer cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14: 2859-2863, 2013. (査読あり、DOI 10.7314/APJCP.2013.14.5.2859)
9. Kobayashi, D., Kawai, N., Sato, S., Naiki, T., Yamada, K., Tozawa, K., Kobayashi, T., Takahashi, S., Kohri, K.: Thermotherapy using magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate cancer bone metastasis in a novel rat model. *Prostate*, 73: 913-922, 2013. (査読あり、DOI 10.1002/pros.22637)
10. Long, N., Suzuki, S., Sato, S., Naiki-Ito, A., Sakatani, K., Shirai, T., Takahashi, S.: Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. *Cancer Sci*, 104: 298-303, 2013. (査読あり、DOI 10.1111/cas.12078)

11. Suzuki, S., Pitchakarn, P., Sato, S., Shirai, T., Takahashi, S.: Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses progression of prostate cancer via Rac1 dephosphorylation. *Exp Toxicol Pathol*, 65: 1035-1041, 2013. (査読あり、DOI 10.1016/j.etp.2013.03.002)
12. Suzuki, S., Shiraga, K., Sato, S., Punfa, W., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., Shirai, T., Takahashi, S.: Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Cancer Sci*, 104: 1711-1717, 2013. (査読あり、DOI 10.1111/cas.12292)
13. Naiki, T., Asamoto, M., Toyoda-Hokaiwado, N., Naiki-Ito, A., Tozawa, K., Kohri, K., Takahashi, S., Shirai, T. Organ specific Gst-pi expression of the metastatic androgen independent prostate cancer cells in nude mice. *Prostate*, 72: 533-541, 2012. (査読あり、DOI 10.1002/pros.21455)
14. Pitchakarn, P., Suzuki, S., Ogawa, K., Pompimon, W., Takahashi, S., Asamoto, M., Limtrakul, P., Shirai, T.: Kuguacin J, a triterpenoid from *Momordica charantia* leaf, modulates the progression of androgen-independent human prostate cancer cell line, PC3. *Fd Chem Toxicol*, 50: 840-847, 2012. (査読あり、DOI 10.1016/j.fct.2012.01.009)
15. Takahashi, S., Uemura, H., Seeni, A., Tang, M., Komiya, M., Long, N., Ishiguro, H., Kubota, Y., Shirai, T.: Therapeutic targeting of angiotensin II receptor type 1 to regulate androgen receptor in prostate cancer. *Prostate*, 72: 1559-1572, 2012. (査読あり、DOI 10.1002/pros.22505)
3. 高橋智、前立腺がん、第15回日本毒性病理学会教育セミナー、2014年11月15日、大阪市立大学医学部(大阪府大阪市)。
4. Kobayashi, D., Kawai, N., Sato, S., Etani, T., Naiki, T., Yamada, K., Ikegami Y., Ando, R., Naruyama, H., Kanemoto, K., Fukuda, K., Nagata, D., Akita, H., Hashimoto, Y., Tozawa, K., Mogami, T., Okamura, T., Takahashi, S., Kohri, K. Thermotherapy with magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate cancer bone metastasis in a novel rat model. *AUA Annual Meeting 2014*, May 18, 2014, Orlando, (USA).
5. Naiki, T., Asamoto, M., Naiki-Ito, A., Kawai, N., Ando, R., Etani, T., Tozawa, K., Kohri, K., Takahashi, S. Glutathione peroxidase 2 is a potential therapeutic molecule for castration-resistant prostate cancer. *AUA Annual Meeting 2013*, May 5, 2013, San Diego, (USA).
6. 高橋智、前立腺癌の病理組織学的診断～ Gleason 分類を中心に～、卒後教育プログラム「泌尿器科腫瘍：泌尿器がんの病理診断の基礎知識」、第101回日本泌尿器科学会総会、2013年4月26日、札幌プリンスホテル(北海道札幌市)。
7. Sato, S., Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., Asamoto, M., Shirai, T., Takahashi, S. Histone deacetylase inhibition has potential to suppress growth of androgen dependent and independent prostate cancer in vitro and in vivo. *AACR Annual Meeting 2013*, April 7, 2013, Washington DC, (USA).
8. 高橋智、前立腺がんの予防、市民公開講座「がん予防の最前線」、第19回日本がん予防学会、2012年6月23日、岐阜市文化産業交流センター(岐阜県岐阜市)。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高橋 智 (Takahashi Satoru)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：60254281

##### (2) 研究分担者

鈴木 周五 (Suzuki Shugo)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：60363933

〔学会発表〕(計8件)

1. Suzuki, S., Sato, S., Naiki-Ito, A., Kato, H., Kuno, T., Takahashi, S. Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis. *54th Annual Meeting of the Society of Toxicology*, March 25, 2015, San Diego, (USA).
2. Sato, S., Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., Kuno, T., Takahashi, S. Suppressive effect of HDAC inhibitor, OBP-801, on prostate cancer development, proliferation, and invasion in vivo. *USCAP Annual Meeting*, March 23, 2015, Boston, (USA).

佐藤 慎哉 (Sato Shinya)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号： 30464564

(3)連携研究者  
なし