

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670688

研究課題名(和文) ショウジョウバエを用いた前立腺癌増悪制御因子の探索

研究課題名(英文) A genetic screen in Drosophila for regulators of human prostate cancer progression.

研究代表者

上田 紗弥(伊藤紗弥)(UEDA, Saya(ITO, Saya))

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90534511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では前立腺癌の増悪制御メカニズムの解明を目的とし、ショウジョウバエの前立腺相同器官を用いた遺伝学的手法により前立腺癌の増悪制御を担う新たな因子の探索・同定を試みた。その結果、前立腺癌の細胞増殖・遊走促進に寄与する数種の遺伝子を見出した。一連の研究により、本研究で構築したショウジョウバエ前立腺癌モデルは前立腺癌増悪制御メカニズムを理解する上で有用な手法であることが示された。今後、同定した遺伝子を標的とした創薬・治療など臨床分野への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To uncover the mechanism by which human prostate cancer progresses, we performed a genetic screen for regulators of human prostate cancer progression using the Drosophila accessory gland, a functional homolog of the mammalian prostate. Cell growth and migration of secondary cells in the adult male accessory gland were found to be regulated by Drosophila homologues of regulators of human prostate cancer progression. Using this screening system, we identified three genes that promoted growth and migration of secondary cells. The human homologues of these candidate genes were expressed in human prostate cancer cells and promoted replication and invasiveness in these cells. These findings suggest that the development of the Drosophila accessory gland and human prostate cancer cell growth and invasion are partly regulated through a common mechanism. The screening system using the accessory gland can be a useful tool for uncovering the mechanisms of human prostate cancer progression.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 癌転移モデル ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

アンドロゲン依存性前立腺癌はアンドロゲンレセプター(AR)を介したアンドロゲン依存的な遺伝子発現亢進により増悪することが知られている。一方、アンドロゲン非依存性前立腺癌は治療抵抗性であり、増悪メカニズムの解明は臨床上非常に重要であると考えられる。

アンドロゲン依存性前立腺癌の増悪を制御する AR は前立腺の器官形成にも関与することが知られている。そこで申請者らは、前立腺の器官形成に関わる AR 以外の転写因子がアンドロゲン非依存性前立腺癌の増悪を亢進するのではないかと推測した。PAX2 は器官形成制御を担う PAX ファミリーに属する転写因子であり、前立腺の発生・分化に関わることが報告されている。申請者らは、前立腺癌において PAX2 が正常前立腺細胞と比較し有為に高発現しており、癌細胞の増殖を顕著に亢進することを確認した。従って、PAX2 を介した遺伝子発現制御機構の解析が、アンドロゲン非依存性前立腺癌の増悪制御機構の理解に繋がると考えた。

2. 研究の目的

本申請では、アンドロゲン非依存性前立腺癌の進行制御メカニズムの解明を目的とし、癌細胞の増殖・浸潤を制御する因子を探索する。癌の増悪制御因子の探索にはショウジョウバエで構築した前立腺癌モデル系を用いる。同定した候補因子はそのヒトホモログをヒト前立腺癌細胞において機能解析し、癌の増悪制御メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエにおける前立腺癌モデル系の構築

当初の研究計画ではヒト PAX2 のトランスジェニックショウジョウバエ系統を用い、前立腺様組織の過形成表現形を指標としたスクリーニングを行う予定であった。しかしながら、ヒト PAX2 をショウジョウバエにおいて過剰発現させると致死に至ることが判明した。そこで、前立腺様組織を構成する secondary cells の細胞増殖・分化・遊走を指標としたスクリーニング系の構築を試みた。

(2) ショウジョウバエ前立腺癌モデル系を用いた癌増悪制御因子の探索

前立腺様組織で特に発現の高い遺伝子のノックダウン系統 25 種と構築した前立腺癌モデル系を用いて、細胞増殖・遊走する細胞数を変動させる遺伝子変異の探索を行った。

(3) 同定した癌増悪制御因子のヒト前立腺癌細胞における機能解析

アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞を用いて、スクリーニングで同定した遺伝子のヒトホモログの機能解析を行った。第一に、同定した遺伝子 3 つを各々ノックダウンし、細胞増殖・浸潤に及ぼす影響を検討した。第二に、同定した遺伝子産物の分子機能解析を行った。具体的方法は、タンパク精製・免疫沈降・ChIP assay・qPCR を用いた RNA の定量等種々の生化学的解析を用いて行った。

(4) マウス個体を用いた癌増殖・転移制御能の検討

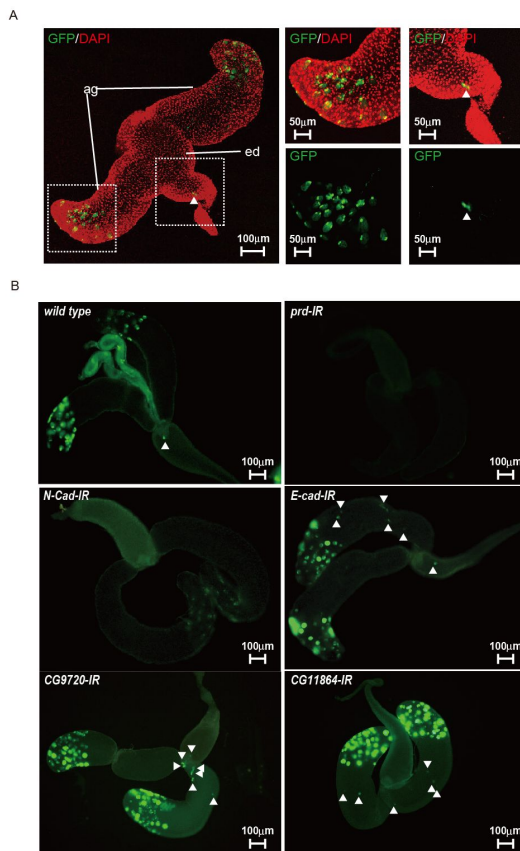
ヌードマウスにアンドロゲン非依存性前立腺癌培養細胞を皮下移植し腫瘍生着後にアテロコラーゲンを用いてノックダウンを行うことで、目的遺伝子の前立腺癌細胞増殖能の検討を行う。また、ノックダウン細胞が luciferase 発光で可視化可能な系を用い、IVIS を用いた他臓器への転移能を検討する。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエにおける前立腺癌モデル系の構築

前立腺様組織の secondary cells の一部は雌との交配依存的に交配器方向に遊走する性質を持つことが知られている。実際に、羽化直後に交配させて 10 日経過した雄の約 35% の個体で、GFP 蛍光でラベルした secondary cells の遊走が観察された(Fig.1A)。ヒトの前立腺癌細胞浸潤を制御する既知因子(N-cadherin, E-cadherin, PAX2)のショウジョウバエホモログのノックダウン系統において secondary cells の全細胞数・遊走細胞数を計測した結果、全て系統において細胞数に変動が見られた(Fig.1B)。従って、secondary cells の細胞増殖・遊走を制御するシステムは前立腺癌転移制御システムと類似していることが示唆された。

Ito et al., Figure 1



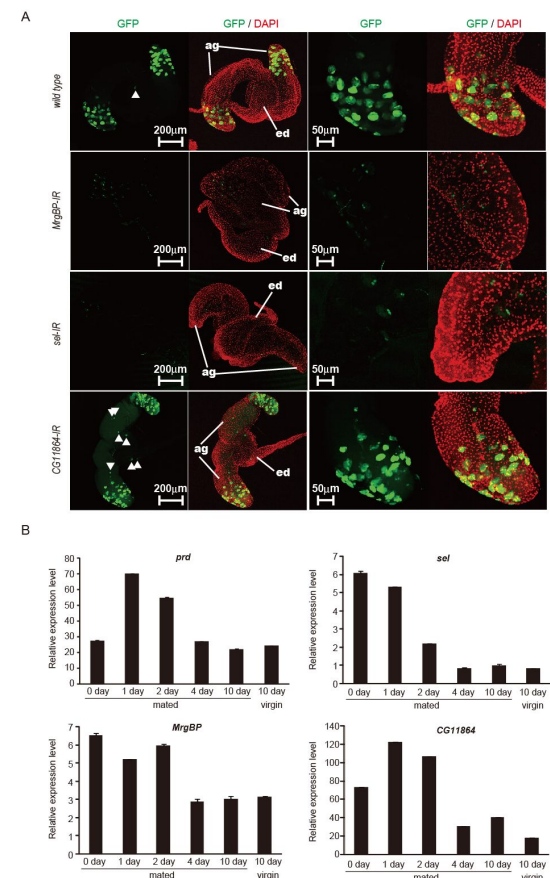
(2) ショウジョウバエ前立腺癌モデル系を用いた癌増悪制御因子の探索

前立腺様組織で特異的に高発現している 25 遺伝子のノックダウン系統を用いて細胞増殖・遊走に影響を及ぼす遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、secondary cells の増殖・遊走に変化を及ぼす数種の遺伝子を同定した(Table 1)。

Symbol	Name	Annotation ID	WIG-Fly Stock ID	(I) cell number		(II) migration	
				decrease	normal	>2 cells	0 cells
Aph-4	Alkaline phosphatase 4	CG1482	1462R-2	-	1/1	-	1/1
Arndt11	Armenin B11	C09608	996R-1	2/2	-	-	2/2
gdb	glass bottom boat	C05662	5562R-3	-	6/6	1/6	4/6
scf	supercalling factor	C09148	8148R-2	3/4	1/4	2/4	2/4
scf	scf	CG12919	12919R-2	13/19*	6/19	3/19	16/19
βCop	β-coatamer protein	C05223	6223R-2	1/4	3/4	2/4	1/4
C05882	C05882	5882R-1	3/13	10/13	-	1/13	12/13
C04484	C04484	4484R-4	2/19	11/19	2/19	11/19	10/19
wnt	wnt	CG7225	7225R-1	2/3	1/3	-	2/3
C05112	C05112	5112R-1	2/3	1/3	-	2/3	
C04623	C04623	4623R-3	-	3/3	-	3/3	
Dpl1	Dodeca-satellite-binding protein 1	C05170	5170R-1	5/5*	-	-	1/5
KdelR	KDEL receptor	C05183	5183R-1	1/3	2/3	-	3/3
CG13172	CG13172	13172R-2	-	4/4	-	1/4	3/4
CG17271	CG17271	17271R-1	2/2	-	-	-	2/2
CG11864	CG11864	11864R-2	6/28	22/28	1/28*	1/28	16/28
Nes2b	Nesman-Pick type C-2b	C03193	3193R-3	5/10	5/10	2/10	8/10
PH44dNE2	proyl-4-hydroxylase-alpha NE2	C09720	9720R-2	6/11	5/11	0/11*	5/11
CG1416	CG1416	1416R-1	2/9	7/9	2/9	7/9	
CG1316	CG1316	1316R-1	-	6/8	3/8	1/8	4/8
Sm29F	Serin 29F	C08137	8137R-2	1/3	2/3	-	3/3
bas	basar	CG11705	11705R-2	-	8/8	3/8	3/8
TRAM	TRAM	CG1642	1642R-3	1/1	-	-	1/1
Oxy	Oxy	CG7830	7830R-1	-	3/3	2/3*	1/3
MrgBP	MrgBP	CG13746	13746R-2	1/13*	-	1/11	10/11
prd	prd	C06176	6176R-1	11/23*	12/23	4/23	1/23
E-cad	shqigan	C03722	3722R-2	1/12*	4/12	2/12	6/12
Discar	Cadherin-11	C07100	7100R-3	8/9*	1/9	1/9	4/11 (35%)
wild type	wild type				1/11	-	4/11 (35%)

ノックダウン系統における細胞増殖・遊走の変動が著しい 3 種の遺伝子に関し前立腺様組織における発現を定量した結果、3 遺伝子ともに羽化・交配後最も発現量が高く、その後減少傾向にあった(Fig.2)。従って、これら遺伝子が成虫前立腺様組織の組織発生・分化制御に関与することが推測された。

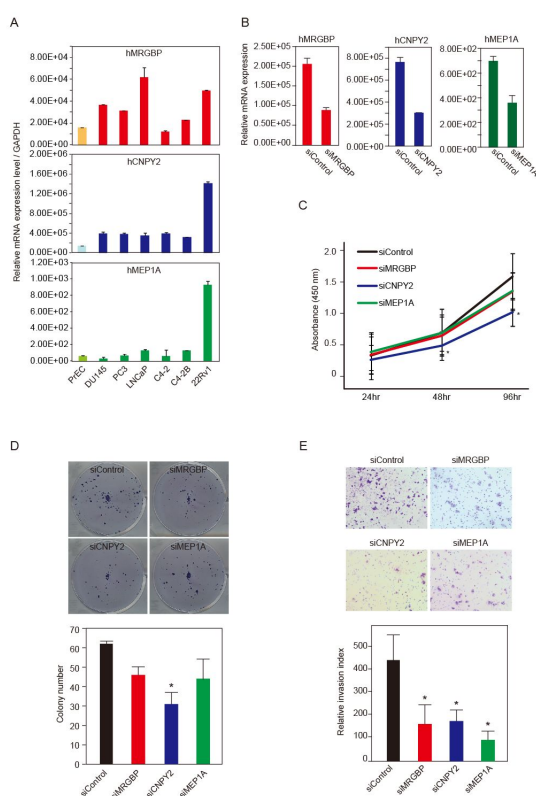
Ito et al., Figure 2



(3) 同定した癌増悪制御因子のヒト前立腺癌細胞における機能解析

ショウジョウバエを用いたスクリーニングにより同定した3種の遺伝子のヒトホモログ(MRGBP, CNPY2, MEP1A)は、いずれもヒト正常前立腺細胞に比較し癌細胞において優位に高発現していた(Fig.3A)。各々の遺伝子をノックダウンし細胞増殖・浸潤能を検討した結果、CNPY2が細胞増殖を促進し、MRGBP, CNPY2, MEP1Aが細胞浸潤を促進することが判明した(Fig.3B-D)。

Ito et al., Figure 3



CNPY2に関して機能解析を行ったところ、前立腺癌の増悪促進因子の一つアンドロゲンレセプター(AR)のタンパク分解を阻害する役割があることを見出した。すなわち、CNPY2はAR発現のタンパクレベルでの制御を介して前立腺癌の増悪を促進する可能性が示唆された。

(4) マウス個体を用いた癌増殖・転移制御能の検討

CNPY2の癌増殖促進能を個体レベルで検証するため、アンドロゲン非依存性癌細胞を

去勢した雄マウスに皮下移植し、アテロコラーゲンをを用いて CNPY2 siRNA を導入した。コントロール群に比較し、CNPY2 ノックダウン群における腫瘍成長の減弱が見られ、CNPY2 が前立腺癌の細胞増殖促進を担うことが個体レベルで示された。転移能に関しては、CNPY2 ノックダウン細胞を樹立している段階であり、今後検討する予定である。

本研究では、前立腺癌の増悪制御を担う数種の因子を見出した。これら因子に関するさらなる機能解析が前立腺癌増悪制御メカニズムの解明に繋がると考えられる。さらに、マウス個体を用いてこれら因子の生理作用を検証することで、前立腺癌の新たな治療標的分子の発見等、臨床分野への応用が期待される。

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3件)

1. Ueda T, Ito S, Shiraishi T, Kulkarni P, Ueno A, Nakagawa H, Kimura Y, Hongo F, Kamoi K, Kawauchi T, Miki T, Hyper-expression of PAX2 in human metastatic prostate tumors and its role as a cancer promoter in an in vitro invasion model, *Prostate*, 査読有, 73, 13, (2013), 1403-1412, doi: 10.1002/pros.22687.
2. Ito S, Ueda T, Ueno A, Nakagawa H, Taniguchi H, Hongo F, Kamoi K, Okihara K, Kawauchi A, Miki T, Paired box 2 upregulates androgen receptor gene expression in androgen-independent prostate cancer., *FEBS J.*, 査読有, 281, 19, (2014), 4506-4518, doi: 10.1111/febs.12959.
3. Ito S, Ueda T, Ueno A, Nakagawa H, Taniguchi H, Kayukawa N, Miki T, A

genetic screen in Drosophila for regulators of human prostate cancer progression.,

Biochem Biophys Res Commun, 査読有, 451, 4, (2014), 548-555, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.015.

〔学会発表〕(計9件)

1. 伊藤紗弥、上田崇、上野彰久、中河秀生、谷口英史、本郷文弥、鴨井和実、沖原宏治、河内明宏、三木恒治, アンドロゲン非依存性前立腺がんにおいて PAX2 は AR 遺伝子の発現を亢進する, 第 36 回日本分子生物学会, 2013.12.3, 神戸
2. 伊藤紗弥、上田崇、木村泰典、岩田健、本郷文弥、沖原宏治、鴨井和実、河内明宏、三木恒治, PAX2 up-regulates androgen receptor gene expression in an androgen-independent prostate cancer cell line, 第 72 回日本癌学会総会, 2013.10.5, 横浜
3. 伊藤紗弥、上田崇、木村泰典、岩田 健、本郷文弥、沖原宏治、鴨井和実、河内明宏、三木恒治, アンドロゲン非依存性前立腺がんにおいて PAX2 は AR 遺伝子の発現を亢進する, 第 101 回泌尿器科学会学術集会, 2013.4.26, 北海道
4. 上田崇、伊藤紗弥、大石正勝、木村泰典、中村晃和、納谷佳男、本郷文弥、邵 仁哲、三神一哉、河内明宏、三木恒治, Hyper-expression of PPA in human metastatic prostate tumors and its promoter activity by an in vitro invasion model, 第 101 回泌尿器科学会学術集会, 2013.4.26, 北海道
5. Hongo F, Ueda T, Ito-Ueda S, Oishi M, Nakamura T, Naya Y, Miki T, Detection of S-nitrosylated protein in renal cell cancer, The 104th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2013.4.10, Washington, DC, USA
6. Takaha N, Sowa Y, Takeuchi I, Ueda T,

Ito-Ueda S, Kimura Y, Iwata T, Nakamura T, Hongo F, Kamoi K, Okihara K, Kawauchi A, Miki T, High mobility group protein AT-hook 1 (HMGA1) is associated with the development of androgen independence and docetaxel-resistance in prostate cancer cells, 2013 Annual Meeting of American Urological Association, 2013.5.5, San Diego, CA, USA

7. 伊藤紗弥、上田崇、上野彰久、中河秀生、谷口英史、本郷文弥、鴨井和実、沖原宏治、三木恒治, アンドロゲン非依存性前立腺癌における PAX2 を介した AR 遺伝子発現の亢進, 第 102 回日本泌尿器科学会総会, 2014. 4. 26, 神戸
8. 伊藤紗弥、上田崇、上野彰久、中河秀生、谷口英史、本郷文弥、鴨井和実、沖原宏治、三木恒治, PAX2 upregulates androgen receptor gene expression in androgen-independent prostate cancer, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014. 9. 25, 横浜
9. 伊藤紗弥、上田崇、上野彰久、中河秀生、谷口英史、粥川成優、三木恒治, ショウジョウバエを用いたヒト前立腺癌増悪制御因子の遺伝学的スクリーニング, 第 37 回日本分子生物学会, 2014. 11. 27, 横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kpum-urology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 紗弥(伊藤 紗弥) UEDA, Saya(ITO, Saya))

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究
院)・助教

研究者番号: 90534511

(2) 研究分担者

三木 恒治 (MIKI, Tsuneharu)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研
究院)・教授
研究者番号: 10243239

上田 崇 (UEDA, Takashi)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研
究院)・助教
研究者番号: 50601598