

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670707

研究課題名(和文) PTEN/Atg7 DK0マウス前立腺癌におけるオートファジー機能解析の研究

研究課題名(英文) Functional analysis of autophagy in PTEN/Atg7 double knockout mouse prostate cancer

研究代表者

植村 天受 (UEMURA, Hirotsugu)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：90213397

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)：Cre-LoxPのシステムにより開発したPSA-Cre PTEN homo欠失マウスモデルを用いて、Autophagy必須遺伝子ATGを前立腺組織でのみノックアウトさせたPSA-Cre PTEN/Atg-7ダブルノックアウトマウスを作製し、前立腺癌の発癌・進行過程におけるAutophagyの作用について検討した。Autophagyの促進がアポトーシス抑制と関連すること、また、PTEN欠失前立腺癌マウスにおいて、Autophagy欠失により、生存期間が延長することが確認できた。

研究成果の概要(英文)：We had previously developed a conditional knockout mouse model in which homozygous deletion of PTEN lead to the stage-specific development of invasive adenocarcinoma. To determine the effect of defective autophagy on prostate cancer progression, we generated prostate-specific conditional double knockout mice harboring both inactivated PTEN and ATG7, a key regulator for the formation of autophagosomes. We show that inhibition of autophagy by the conditional inactivation of ATG7, a gene essential for autophagosome formation, does not contribute to tumor initiation. We also show that simultaneous inactivation of ATG7 significantly suppresses PTEN-deficient prostate cancer progression and improves survival.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：オートファジー 前立腺癌 マウスモデル ノックアウトマウス PTEN Cre-LoxPシステム 去勢抵抗性がん Atg7

1. 研究開始当初の背景

オートファジー (Autophagy) とは、自己の細胞質の一部をオートファゴソーム (Autophagosome) と呼ばれる生体膜 (隔離膜) で包み込み、リソソーム (Lysosome) に輸送して融合しオートリソソーム (Autolysosome) となってリソソーム内にある種々の分解酵素によって完全に分解 (消化) する、細胞内分解機構である。分解されたアミノ酸や分解物は再びタンパク合成などに再利用される。一般に Autophagy が起きるのは細胞が栄養飢餓状態に陥った時であるが、これは生存を維持するために生体に必須なタンパクなどのリサイクルを行うための自食現象である。Autophagy は細胞の生存維持に貢献している一方で、Autophagy 細胞死も存在し、ヒトの神経疾患や発癌との関連が明らかになっている (Nature 402:672, 1999)。たとえば前立腺癌では Autophagy 関連分子 Atg6 (Beclin 1) の発現量が低下しており、ATG ノックアウトマウスでは発癌率が異常に高いことが報告されている (J.Clin.Invest 112:1809, 2003)。これはおそらく、Autophagy 細胞死の破綻が発癌に関係しているのではないかと推察される。近年の Autophagy と癌細胞に関する研究は飛躍的に進展しているが、Autophagy の癌細胞における作用は極めて複雑で、時には癌の細胞死に促進的に働くが、時には全く逆の働きをする場合もあり、十分に解明されているわけではない。また、癌種 (臓器) によっても働きが異なることも研究者を困惑させる点である。最近の報告では、Autophagy の誘導あるいは抑制により、癌細胞の細胞死が多く確認されており、化学療法や放射線療法に対する抵抗性獲得にも関与していると考えられている。このような事実に基づいて、Autophagy 細胞死は癌治療のターゲットとなりうる考えられ、細胞死を誘導する分子標的薬や抗癌剤の開発研究が世界中で行われている。前立腺癌における Autophagy の研究は、十分に進んでいるとは言えずコンセンサスの得られたエビデンスの構築途上といえる。前立腺癌の発生・進展過程において PTEN を癌抑制因子とする、PI3K-Akt-mTOR pathway は中心的なシグナル伝達経路であり、この経路の分子をターゲットにした研究は、前立腺癌 特に CRPC の治療戦略として理にかなっている。一方、Autophagy のシグナル pathway をみても、mTOR は、Autophagy 誘導の中心的な調節因子であ

り、PI3K-Akt シグナルや MAPK-Erk シグナルによる mTOR の活性化によって Autophagy を抑制し、AMPK (AMP ATP) や p53 シグナルによる mTOR の不活性化によって Autophagy を促進する。また、自己成分を取り込んだ二重膜形成 (オートダゴソーム) には Autophagy 関連遺伝子産物の Atg 複合体や Atg-LC3 複合体の作用が必須である。このように、前立腺癌の中心的シグナル経路と Autophagy シグナル経路は深く関連しており、これまでに Autophagy の異常 (たとえば Beclin-1 突然変異) で前立腺癌が生じることが発見されている。最近の報告では、前立腺癌において活性化されている Src キナーゼが去勢抵抗性獲得、化学療法抵抗性や転移に関与しており、Src 阻害薬の PP2 や saracatinib によって前立腺癌細胞に Autophagy が誘導される。また、Autophagy 阻害薬のクロロキンや Atg7siRNA による Pharmacologic な抑制は Src 阻害薬による Autophagy 細胞死を助長する。このように Autophagy は前立腺癌において活性化されており、Autophagy の阻害は効果的な治療戦略になる可能性がある。

2. 研究の目的

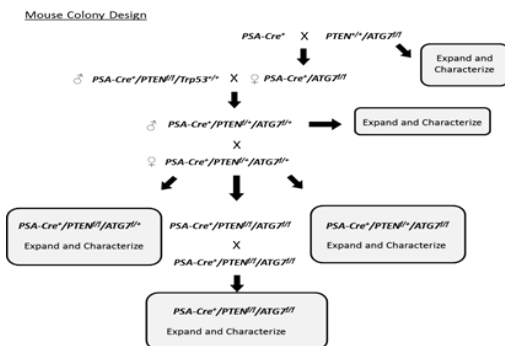
我々は syngeneic な自然発生前立腺癌の動物モデル確立に着手し、conditional gene targeting 法を用いて、前立腺組織でのみ PTEN 遺伝子をノックアウトした *PTEN flox/PSA-Cre* の遺伝子改変 (GEM) マウスモデルを開発した。この GEM homo マウスでは PIN を経て 15 週齢で 100% 前立腺癌が発生し、成熟後去勢術により去勢抵抗性癌になる極めて有用な動物モデルである。一方、細胞内浄化や栄養素供給作用で知られる Autophagy は近年急速に研究が進み、選択的 Autophagy の重要性が明らかになり、種々の癌では促進薬・阻害薬による臨床試験も行われている。本研究では、この前立腺癌発生 GEM マウスの前立腺組織において Atg-7 をノックアウトすることで前立腺特異的 Autophagy KO マウスを作製し、PTEN homo 欠失による前立腺癌の自然発癌や進展過程において、Autophagy がどのように関与し作用するかについて検証することを目的とする。

3. 研究の方法

1. PSA プロモーターによる前立腺特異的 PTEN/Atg7 ダブルノックアウトマウスの作製

我々が PTEN conditional gene targeting にて確立した、前立腺特異的 PTEN ノックア

ウツマウスと同じ手法、Cre-LoxP システムを用い、*PTEN*^{+/+}/*Atg7*^{fl/fl} マウス (順天堂大学医学部より供与) と *PSA-Cre*⁺ マウスを交配することにより、*PSA-Cre*⁺/*Atg7*^{fl/fl} マウスを作製する。我々が確立した *PSA-Cre*⁺/*PTEN* homo deletion マウスと交配させ、*PSA-Cre*⁺/*PTEN*^{fl/fl}/*Atg7*^{fl/fl} (*PTEN*, *ATG* ともにヘテロ欠失型) を確立し、ヘテロ型同士との交配により、*PSA-Cre*⁺/*PTEN*^{fl/fl}/*Atg7*^{fl/fl} (*PTEN* homo *ATG7* hetero deletion)、*PSA-Cre*⁺/*PTEN*^{fl/fl}/*Atg7*^{fl/fl} (*PTEN* hetero *ATG7* homo deletion)、*PSA-Cre*⁺/*PTEN*^{fl/fl}/*Atg7*^{fl/fl} (*PTEN*, *ATG7* homo deletion) の 3 表現型 Colony ができ、それぞれについて病理組織学的に経時変化と増殖・進行に関係する分子について Characterize する。続いて各表現型において生後 10 週齢で去勢術を施行し CRPC モデルを確立し、同様に組織学的変化と関連分子について Characterize する。また、各表現型におけるラージスケール (n=30-40) による生存期間の確認と転移臓器の確認についても行い、PI3K-Akt 経路の分子標的阻害薬や抗アンドロゲン薬などの治療研究にとって有効であるか確認する。



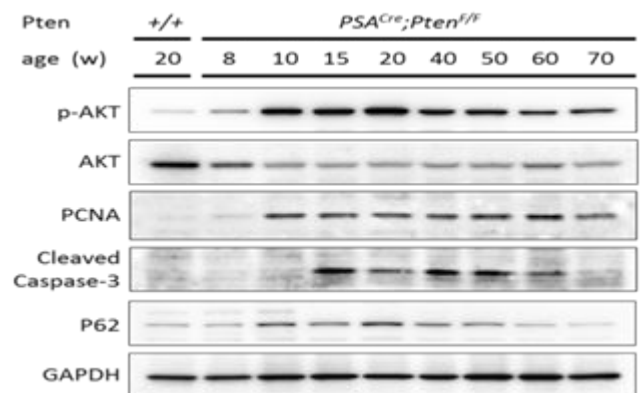
2. *PTEN*^{fl/fl}/*Atg7*^{fl/fl}/*PSA-Cre* マウス前立腺発癌モデルにおける発現解析

我々は *PSA-Cre* *PTEN* homo 欠失マウスにおいて Akt/p-Akt, 細胞分裂, アポトーシス, Autophagy の indicator である p62 について検討した。次に *PSA-Cre* *Atg7* homo KO マウスおよび ***PTEN/Atg7* DKO** マウスにおいても全く同様の発現解析を行い、Autophagy の PI3K-Akt pathway に対する作用について検証した。

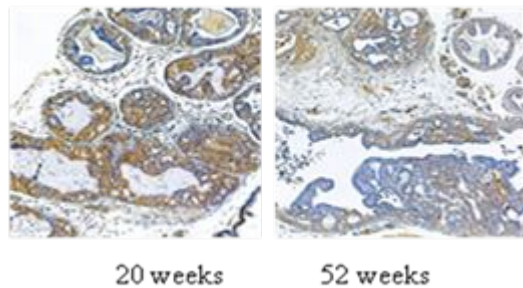
4. 研究成果

PSA-Cre *PTEN* homo 欠失マウスにおける Akt/p-Akt, 細胞分裂, アポトーシス, Autophagy の indicator である p62 についての検討: 下図に示す如く、各分子の発現は

Wild-type と *PTEN* 不全マウスの間で異なるだけでなく、各 time point において経時的な変化を示した。p62 の発現低下は Autophagy の促進を意味し、Autophagy の促進がアポトーシス抑制と関連することが分かった。

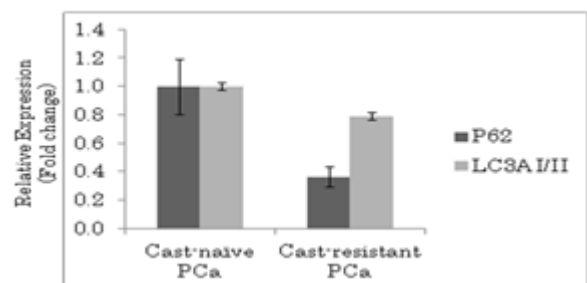
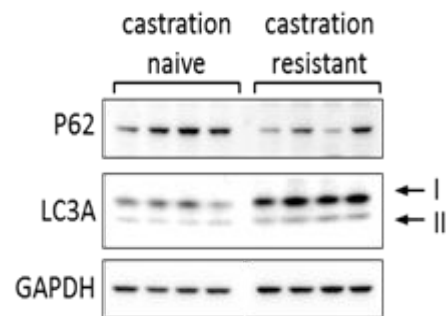


P62 IHC Expression



PSA-Cre *PTEN* homo 欠失 CRPC マウスにおける発現解析

p62, LC3A I/II の発現低下が認められ (下図), Autophagy が増進していた。



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2件)

. De Velasco MA, Kura Y, Yoshikawa K, Nishio K, Davies BR, Uemura H. Efficacy of targeted AKT inhibition in genetically engineered mouse models of PTEN-deficient prostate cancer. *Oncotarget*. 2016 Feb 21. doi: 10.18632/oncotarget.7557. [Epub ahead of print] (査読有)

. De Velasco MA, Tanaka M, Yamamoto Y, Hatanaka Y, Koike H, Nishio K, Yoshikawa K, Uemura H. Androgen deprivation induces phenotypic plasticity and promotes resistance to molecular targeted therapy in a PTEN-deficient mouse model of prostate cancer. *Carcinogenesis*. 2014 Sep;35(9):2142-53. doi: 10.1093/carcin/bgu143. Epub 2014 Jul 1. (査読有)

[学会発表](計12件)

1. 畑中祐二、デベラスコ マルコ、倉 由吏恵、山本豊、沖貴士、清水信貴、吉村一宏、野澤昌弘(近大)、吉川和宏(愛知医科大)、西尾和人(近大ゲノム)、植村天受(近大)
前立腺癌に対するオ - トファジ - 阻害薬CQと分子標的薬の併用療法について
第74回日本癌学会学術総会、名古屋コンgresセンター(名古屋)、2015.10.10
2. 植村天受、倉 由吏恵、清水信貴、吉村一宏、野澤昌弘(近大)、吉川和宏(愛知医科大)、西尾和人(近大ゲノム)、デベラスコ マルコ(近大・近大ゲノム)
マウス前立腺癌モデルを用いたAKT阻害薬AZD 5356の抗腫瘍効果
第74回日本癌学会学術総会、名古屋コンgresセンター(名古屋)、2015.10.9

3. 杉本 公一、デベラスコ マルコ、倉 由吏恵、山本 豊、畑中 祐二、沖 貴士、清水信貴、野澤昌弘、吉村一宏(近大)、吉川和宏(愛知医科大)、西尾和人(近大ゲノム)、植村天受(近大)

PTEN欠損電立腺癌マウスモデルにおけるオ - トファジ-阻害薬CQによる長期治療効果について

第74回日本癌学会学術総会、名古屋コンgresセンター(名古屋)、2015.10.9

4. 倉 由吏恵、デベラスコ マルコ、安藤直美、福島恵美子(近大)、Davies B.R., Huzdar D (アストラゼネカ)、山本 豊、畑中祐二、沖 貴士、清水信貴、吉村一宏、野澤昌弘(近大)吉川和宏(愛知医科大学)、西尾和人(近大ゲノム)、植村天受(近大)

Chloroquine demonstrates limited effectiveness in an autochthonous preclinical model of prostate cancer
AACR, フィラデルフィア, 2015.4.20

5. 吉川 和宏(愛知医科大)、デベラスコ マルコ、倉 由吏恵、安藤直美、福島恵美子、山本 豊、畑中祐二、沖 貴士、清水信貴、吉村一宏、(近大)、西尾和人(近大ゲノム)、植村天受(近大)

Effects of long-term chloroquine chemotherapy in a preclinical model of PTEN-deficient prostate cancer

AACR, フィラデルフィア, 2015.4.20

6. 吉川和宏(愛知医大)、デベラスコ マルコ(近大・近大ゲノム)、倉由吏恵、畑中祐二、山本豊、清水信貴、吉村一宏、野澤昌弘(近大)、西尾和人(近大ゲノム)、植村天受(近大)

PTEN欠損 マウス前立腺がん由来細胞株の樹立

第73回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(横浜)、2014.9.27

7. デベラスコ マルコ(近大・近大ゲノム)、倉由吏恵、畑中祐二、山本豊、清水信貴、吉村一宏、野澤昌弘(近大)、吉川和宏(愛知医科大)、西

尾和人(近大ゲノム)、植村天受(近大)
オ - トファジ - と前立腺癌発生-進展に関する関係について、 PTEN/Atg-7 KO前立腺癌マウスを作製し、検討した
第73回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(横浜)、2014.9.26
8.デベラスコ マルコ(近大・近大ゲノム)、倉由吏恵、安藤直美、福島恵美子、畑中祐二、山本豊、清水信貴、吉村一宏、野沢昌弘(近大)、吉川和弘(愛知医科大学)、西尾和人(近大ゲノム)、植村天受(近大)
前立腺癌におけるオートファジーの生物学的意義
第102回日本泌尿器科学会総会、神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル(神戸)、2014.4.24
9.倉由吏恵(近大)、デベラスコ マルコ(近大・近大ゲノム)、安藤直美、福島恵美子、畑中祐二、山本豊、清水信貴、野沢昌弘、吉村一宏、(近大)、吉川和宏(愛知医科大学病院細胞治療センター)、西尾和人(近大ゲノム)、植村天受(近大)
前立腺癌におけるSTAT3転写活性抑制効果の検討
第102回日本泌尿器科学会総会、神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル(神戸)、2014.4.24
10.デベラスコマルコ(近大・近大ゲノム)、倉由吏恵、安藤直美、福島恵美子、畑中祐二、山本豊、清水信貴、吉村一宏、野澤昌弘(近大)、吉川和宏(愛知医科大学)、西尾和人(近大ゲノム)、植村天受(近大)
The role of autophagy in prostate tumorigenesis and its therapeutic implications
AACR, San Diego,CA, 2014.4.8
11.吉川和宏(愛知医科大学)、デベラスコ マルコ(近大・近大ゲノム)、倉由吏恵、安藤直美、福島恵美子、畑中祐二山本豊、清水信貴、吉村一宏、野澤昌弘、(近大)、西尾和人(近大ゲノム)、植

村天受(近大)
Establishment and charactertzation of cell lines derived from a murine model of PTEN-deticient prostate
AACR, San Diego,CA, 2014.4.7
12.デベラスコマルコ(近大・近大ゲノム)、倉由吏恵、安藤直美、福島恵美子、畑中祐二、山本豊、清水信貴、吉村一宏、野沢昌弘(近大)、吉川和宏(愛知医科大学)、西尾和人(近大ゲノム)、植村天受(近大)
Co-targeting the P13K and androgen receptor signal pathways in castration resistant prostate cancer
AACR, San Diego,CA, 2014.4.6
〔図書〕(計0件)
〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：
取得状況(計0件)
名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：
〔その他〕
ホームページ等
6.研究組織
(1)研究代表者
植村 天受 (UEMURA Hirotugu)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：90213397
(2)研究分担者
()
研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：