**様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）**

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月 ２２ 日現在

機関番号：１４３０１

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：２６８９３１３０

研究課題名（和文）前立腺癌の新規癌抑制遺伝子AESの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of new cancer-restraining gene AES of the prostate cancer

研究代表者

岡田　能幸（Okada, Yoshiyuki）

京都大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：６０７３９２９１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,300,000円

研究成果の概要（和文）：AESの発現レベルはヒト前立腺癌の臨床病期に逆相関していた。前立腺癌細胞株LNCaPにAESを強制発現させると細胞増殖は抑制し、逆にAESをノックダウンさせると細胞増殖は促進した。AESはARやNotchシグナルの転写活性を抑制すると考えられた。ARが無い前立腺癌細胞株のDU145とPC3にAESを強制発現させると細胞増殖には影響させずに、局所浸潤や骨及びリンパ節への転移を抑制した。

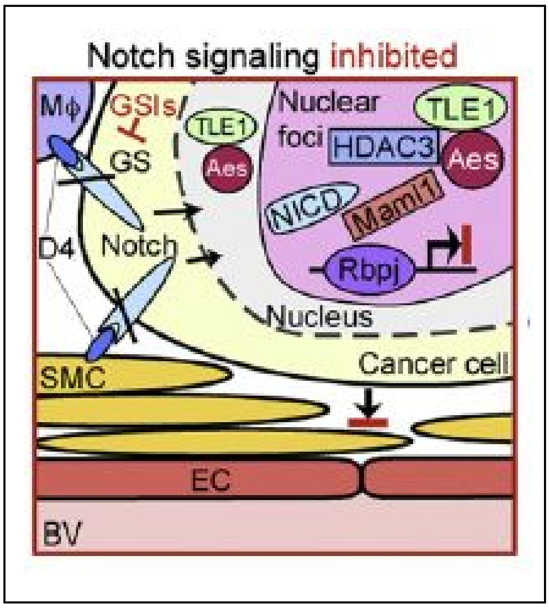
研究成果の概要（英文）：Expression levels of AES were inversely correlated with clinical stages of human PCa. Exogenous expression of AES suppressed the growth of LNCaP cells, whereas the AES knockdown promoted it. We also found that AES suppressed transcriptional activities of AR and Notch signaling. Notably, AES overexpression in AR-defective DU145 and PC3 cells reduced invasion and metastasis to lymph nodes and bones without affecting proliferation in culture.

研究分野：前立腺癌

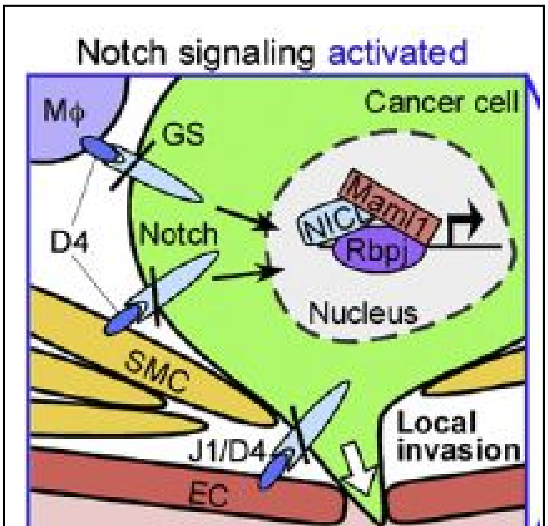
キーワード：AES　前立腺癌

## １．　研究開始当初の背景

前立腺癌は欧米では死亡率が高い癌である。本学遺伝薬理学教室では大腸癌においてAES がNotch シグナル伝達をブロックして転移を抑制する事を報告した（Sonoshita et al. Cancer Cell 2011 下記図は論文から引用)。また、マウス及びヒトにおいて大腸癌の原発巣よりも肝臓転移巣において AES の発現が優位に低下していており、Notch シグナルを阻害することで大腸癌の転移に対する予防あるいは治療の戦略になりうることが示唆された。




⇓　AES　loss




さらに本研究室との共同研究によって、前立腺癌でも生検標本を用いた免疫染色上 AES の発現低下は組織学的悪性度との間に有意な相関を示すことが明らかとなった。具体的には AES の発現が無い患者群は AES を発現している患者に比べて、骨転移が多い傾向にあった。(52% vs 33%)さらに AES を発現していない前立腺癌患者群は AES を発現している前立腺癌患者より優位に転移が多かった(67% vs 42%)。一方で、AES の発現と血清 PSA 値及びグリソンスコアには優位な相関は認められなかった。
さらに Oncomine のデータベースを用いた解析からも、前立腺癌の転移症例では AES 発現が低下している事が確認された。以上より AES が前立腺癌の悪性化や転移能との関連が示唆された。

## ２．研究の目的

本研究では AES が前立腺癌の悪性化を抑制するという仮説を立て、その分子機構の解明を通じて前立腺癌の転移を標的とした新たな治療戦略を目指した。

## ３．研究の方法

本研究では AES の増殖・転移抑制機能を検証するために、以下の計画で研究を進める予定であった。

① 前立腺癌細胞株を用いて、AES の発現を変化させる事でその増殖能や転移浸潤能の変化を検 証する（in culture)。

②上記の AES の発現を変化させた細胞株を用いて、免疫不活化マウスに移植を行いその転移能の変化を検証する。また AES の下流にあるターゲットの解析を行う（in vivo)。

③ 前立腺上皮細胞特異的な Pten ノックアウトに基づく前立腺癌マウスモデルを用いて、さらに AES を複合的にノックアウトする事で、腫瘍発生や進展に与える影響を解析し Aes の前立腺癌における機能を検証する。具体的には Probasin-Cre マウスと PTEN-flox マウスを交配させて、前立腺上皮細胞特異的に PTEN をノックアストさせ、さらに AES ノックアウトマウスを掛け合わせることで表現蚊型を解析する。

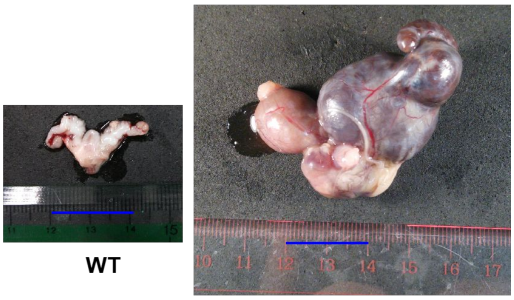
④治療薬として AES ペプチドを合成し、その増殖・転移抑制効果を検証する。

## ４．研究成果

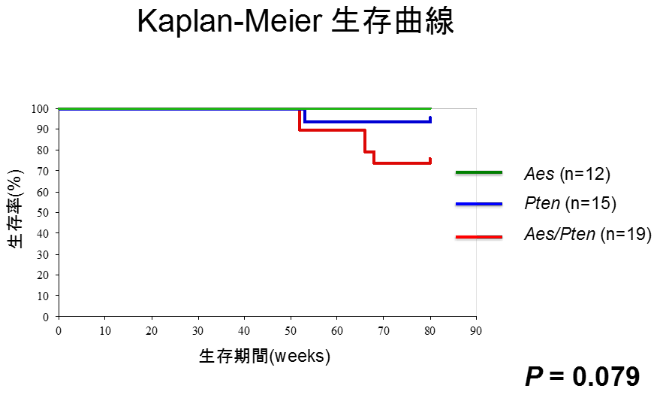
① AES の発現は前立腺癌の臨床病期と逆相関することがわかった。次に前立腺癌細胞株 LNCaP に対して AES を強制発現させると細胞増殖は抑制された。また LNCaP の AES をノックダウンさせると増殖は促進した。アンドロゲンレセプター(以下 AR)を発現していない前立腺癌細胞株 DU145 及び PC3 において AES を強制発現させても細胞増殖には影響しなかった。また DU145 と PC3 において AES を強制発現されるとマトリゲルインベージョンアッセイにおいて細胞浸潤能は 50-70%低下させることがわかった。さらに LNCaP、DU145、PC3 の 3 種の前立腺癌細胞株において AES を強制発現させると Notch reporter activity が 70-90%抑制させることがわかった。AES を強制発現させると Notch シグナルの代表的な転写因子である HES1 の mRNA を 70%低下させることがわかった。
以上より、AES は前立腺癌細胞における Notch シグナルにおける転写活性および細胞浸潤能を低下させることが示唆された。さらに AES は AR 活性の抑制を介して、前立腺癌の増殖に影響することが示唆された。

② PC3 を免疫不全マウスの左心室に注入すると骨転移を形成する。今回、AES を強制発現させた PC3 を左心室に注入すると優位に骨転移が減少した。一方、AES を強制発現した PC3 をマウスの大腿骨髄に注入しても、腫瘍形成能に優位な差は認めなかった。以上より、AES はマウスモデルにおいて前立腺癌細胞の転移を抑制する可能性が示唆された。

③ マウスの前立腺特異的に PTEN をノックダウンさえると前立腺癌が発生する。(下写真)




AES/PTEN のダブルノックアウトマウスは PTEN のシングルノックアウトよりも前立腺重量が 1.5～2 倍ほど大きかった。さらに AES/PTEN ダブルノックアウトマウスは PIN の出現範囲が大きく、Ki-67 を発現した細胞も単位面積当たり 2 倍ほど多かった。以上より AES/PTEN ダブルノックアウトマウスにおいて前立腺上皮細胞の増殖能が促進されていることが示唆された。今回、PTEN/AES をダブルノックダウンさせると前立腺癌の局所浸潤が増加した。さらに AES/PTEN ダブルノックアウトマウスは 10 匹中 7 匹(70%)にリンパ節転移を認めたが、PTEN のシングルノックアウトマウスは 7 匹中 1 匹(14%)しかリンパ節転移を認めなかった。さらに AES/PTEN ダブルノックアウトマウスでは MMP9 が多く発現しており、PTEN シングルノックアウトマウスよりも悪性度の高い表現型を示すマウスであることが示唆された。
また AES/PTEN ダブルノックアウトマウスは AES あるいは PTEN シングルノックアウトマウスよりも生存期間が短い傾向にあった。(下図参照)




④ 今後、AES ペプチドの投与実験を計画している。

### 結語

AES は AR や Notch シグナル経路を介して、前立腺癌の腫瘍増殖及び転移に対して重要な役割を担っている。

## 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 4 件）

1:Sunada T, Kobayashi T, Shibasaki N, Okada Y, Negoro H, Terada N, Yamasaki T, Matsui Y, Inoue T, Kamba T, Ogawa O.
A Case of Rapidly Progressive Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer : Durable Control by Early Induction of Carboplatin and Paclitaxel. Hinyokika Kiyo. 2015 Sep;61(9):369-73.

2:Goto T, Terada N, Inoue T, Kobayashi T, Nakayama K, Okada Y, Yoshikawa T, Miyazaki Y, Uegaki M, Utsunomiya N, Makino Y, Sumiyoshi S, Yamasaki T, Kamba T, Ogawa O.
Decreased expression of lysophosphatidylcholine (16:0/OH) in high resolution imaging mass spectrometry independently predicts biochemical recurrence after surgical treatment for prostate cancer. Prostate. 2015 Dec;75(16):1821-30. doi: 10.1002/pros.23088. Epub 2015 Sep 1.

3:Sunada T, Kobayashi T, Shibasaki N, Okada Y, Negoro H, Terada N, Yamasaki T, Matsui Y, Inoue T, Kamba T, Ogawa O.
Pelvic lymph node dissection in robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy: safety and adequacy in introductory series. Hinyokika Kiyo. 2015 Mar;61(3):89-93.

4:Maeno A, Terada N, Uegaki M, Goto T, Okada Y, Kobayashi T, Kamba T, Ogawa O, Inoue T.
Up-regulation of miR-582-5p regulates cellular proliferation of prostate cancer cells under androgen-deprived conditions. Prostate. 2014 Dec;74(16):1604-12. doi: 10.1002/pros.22877. Epub 2014 Aug 29.

〔学会発表〕（計 3 件）

1.岡田 能幸,牧野 雄樹,植垣 正幸,宮崎 有,後藤 崇之,吉川 武志,小林 恭,寺田 直樹,井上 貴博,神波 大己,園下 大将,武藤 誠,小川 修
「前立腺癌の新規癌抑制遺伝子Amino-Enhancer of Split/AES の機能解析」
第 103 回日本泌尿器科学会総会
2015 年 4 月(石川県金沢市)

2.岡田 能幸, 園下 大将,小林 恭,柿崎 文彦,植垣 正幸,宮﨑 有,後藤 崇之,坂元 宏匡,寺田 直樹,井上 貴博,神波 大己,小川 修,武藤 誠
「前立腺癌において悪性化抑制遺伝子Amino-Enhancer of Split/AES の機能解析」
第 25 回泌尿器科分子・細胞研究会
2016 年 2 月 27 日(大阪府大阪市)

3.岡田能幸, 園下 大将,小林 恭,柿崎 文彦,植垣 正幸,宮﨑 有,後藤 崇之,坂元 宏匡,寺田 直樹,井上 貴博,神波 大己,小川 修,武藤 誠
「前立腺癌において悪性化抑制遺伝子Amino-Enhancer of Split/AES の機能解析」
第 104 回日本泌尿器科学会総会
2016 年 4 月 23 日(宮城県仙台市)

〔その他〕
ホームページ等
http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp/

６．研究組織
(1)研究代表者
岡田　能幸（OKADA, Yoshiyuki）
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：６０７３９２９１