

令和元年6月4日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16783

研究課題名(和文) 前立腺癌の去勢抵抗性獲得機序としてのARによるCCL2制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of CRPC mediated by CCL2 during suppression of AR signaling

研究代表者

野原 隆弘 (NOHARA, Takahiro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：20733372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌に対してはアンドロゲン受容体シグナルをさらに標的とする新規治療薬が承認されているが、最終的にはいずれも治療抵抗性となるため、新たなメカニズムで前立腺癌細胞の活性を制御する必要がある。CCL2はアンドロゲン受容体シグナルが抑制されると分泌され、前立腺癌細胞を活性化するため、去勢抵抗性前立腺癌のメカニズムの一つとして重要なシグナルと考えられる。本研究でアンドロゲン受容体が細胞外小胞(エクソソーム)を介してCCL2を活性化する機序の一旦を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンドロゲン受容体シグナルの遮断を治療とする限り前立腺癌の根治は難しい。アンドロゲン受容体シグナルの遮断から前立腺癌の増悪をもたらすシグナルを同定し、ターゲットとして治療しなければ新たな展開は得られない。前立腺癌における最重要分子アンドロゲン受容体が、多数の癌の増悪因子として報告されているCCL2をmicro RNAを介して制御しているという新奇メカニズムが明らかになれば合理的かつシンプルな治療ターゲットとなると考えられる。これまでのアンドロゲン高感受性をよりどころとした去勢抵抗性前立腺癌の治療体系を根本的に見直す必要があるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Blockade of androgen-androgen receptor signaling inhibited prostate cancer cell proliferation even during castration-resistant stage; however, it finally fails and a novel treatment strategy is needed to develop. CCL2 is secreted by blockade of androgen-androgen receptor signaling, suggesting that CCL2 contributes to the development of castration-resistance. We clarified a part of the mechanism that androgen-androgen receptor signaling activates CCL2 mediated by exosomal signaling.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 アンドロゲン受容体 エクソソーム マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌細胞はアンドロゲン依存性に増殖することから、進行前立腺癌に対してはアンドロゲン受容体 (androgen receptor: AR) シグナルをブロックする全身治療、アンドロゲン除去療法 (androgen-deprivation therapy: ADT) が標準的な治療法として確立しており、生存期間の延長が期待できる。しかし、ほとんどの症例で ADT が効かない去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer: CRPC) となる。CRPC に対しては高感受性となった AR をさらに標的とする新規治療薬が承認されているが、最終的にはいずれも治療抵抗性となるため、新たなメカニズムで前立腺癌細胞の活性を制御する必要がある。近年、各種癌の進展・増悪に様々な免疫機構が関与していることが明らかとなってきた。ケモカインは白血球などに作用し、遊走を促す物質として同定されたが、癌の進展にケモカインそのものが直接関与していることも明らかとなってきている。中でも、CCL2 は前立腺癌微小環境において前立腺癌細胞に直接作用し、増殖・浸潤・転移を促進すると報告されており、治療ターゲットとして注目されているケモカインの一つである。我々の研究室では ADT によって AR シグナルが阻害されると、前立腺癌組織からケモカイン CCL2 の分泌が亢進し、この CCL2 の autocrine/paracrine 作用によって前立腺癌細胞が活性化されるという現象を明らかにした (EMBO Mol Med. 2013;5:1383-401)。しかし、AR がどのようにケモカイン分泌を制御しているかということについてはほとんど明らかになっていない。CCL2 は AR のターゲット遺伝子ではなく、直接制御している可能性は少ない。そこで二つのメカニズムについて可能性を考えた。一つは CCL2 の発現を抑制する既知のシグナル経路を AR が活性化するというメカニズム、もう一つは CCL2 を抑制する micro RNA (いわゆる anti-oncomiR として) の発現を AR が活性化するというメカニズムである。

前者については STAT3 が CCL2 を誘導することと、AR のターゲットとして STAT3 の内因性インヒビターである PIAS3 の存在が報告されていたことから、これらの発現変化を検討したところ、このシグナルと CCL2 が連動していることが確認された (Cell Death Dis. 2013;4:e764)。しかし、STAT3 の活性化より先に CCL2 の分泌亢進が生じているという結果も得られ、このシグナル経路の作用は限定的であり、異なる CCL2 抑制経路がある可能性が考えられた。そこで後者の micro RNA を介するメカニズムについて着目した。

Micro RNA は mRNA に部分相補的に結合することで mRNA の翻訳を物理的に阻害し遺伝子発現を抑制する。コーディング遺伝子の蛋白質翻訳の少なくとも 30% は micro RNA によって制御されていると言われている。これまでにヒトでは 1000 以上の micro RNA が同定されているが、前立腺癌細胞において AR で誘導され、かつケモカインを抑制するものについては同定されていない。

また、非常に興味深いことに、前立腺癌組織内では AR の発現の異なる前立腺癌細胞間で相互に何らかの情報伝達が行われており、前立腺癌の遊走能や増殖能を高めているという結果を得ている (Anticancer Res. 2018;38:2045-2055)。本研究では、前立腺癌微小環境における性質 (AR の発現の程度) の異なる癌細胞同士の細胞間シグナル伝達的手段としてエクソソームに着目した。エクソソームは細胞から分泌される様々な分子を含んだ小胞で、分泌された細胞とは別の細胞に取り込まれることによって細胞間シグナル伝達が行われる。各種癌の進展においても極めて重要な役割を果たしていることが近年明らかになっている。エクソソームは多様な物質を含んでおり、micro RNA をも内包することができる。前立腺癌微小環境における細胞間シグナル伝達を介した AR による CCL2 制御機構においては、エクソソームに内包された micro RNA (exmiR) は合理的かつシンプルな伝達システムであり、CRPC のメカニズムの中心である可能性は十分にある。

2. 研究の目的

AR を発現している前立腺癌細胞株 C4-2B (negative control: NC) と、これらの AR をノックダウン (siAR) した細胞からエクソソームを回収しその中の micro RNA (=exmiR) を抽出し、網羅的 micro RNA 解析を行う。siAR 群で発現が低下する micro RNA と、CCL2 を制御することが報告されている micro RNA を照合し、標的 micro RNA とする。この段階では多数の候補が残ると考えられる。

複数の候補の pre-micro RNA を C4-2B-siAR および C4-2B-siAR にトランスフェクトし RNA を抽出し、micro RNA の過剰発現を確認する。さらにこれらの培養上清の CCL2 濃度を測定し、CCL2 分泌が十分抑制されることを確認し、さらに候補を絞り込む。

目的の micro RNA が同定できたら、その機能やメカニズムを様々な角度から明らかにする。

このように、本研究ではエクソソームに内包される遺伝子発現制御物質としての micro RNA に焦点を当て、AR が制御する CCL2 を介した CRPC 誘導のメカニズムについて前立腺癌細胞株を用いて解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) AR を発現しているヒト去勢抵抗性前立腺癌細胞株 C4-2B から C4-2B-siAR および C4-2B-NC

を作成し、whole cell での AR 蛋白発現をウェスタンブロットにて比較した。

- (2) C4-2B-siAR および C4-2B-NC の培養上清からエクソソームを抽出しエクソソームマーカーにてその存在を確認した。
- (3) ELISA により前立腺癌細胞あたりのエクソソーム個数を定量した。
- (4) AR によって制御される (positive/negative) micro RNA を検索し、発現を確認した。
- (5) miScript PCR Array によって C4-2B-siAR および C4-2B-NC の exmiR を比較し、データベースおよび文献的に検索したものととの整合性を検証した。

4. 研究成果

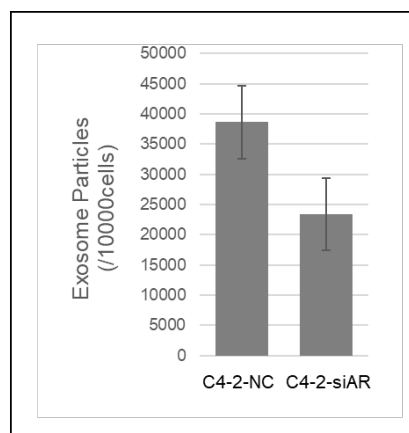
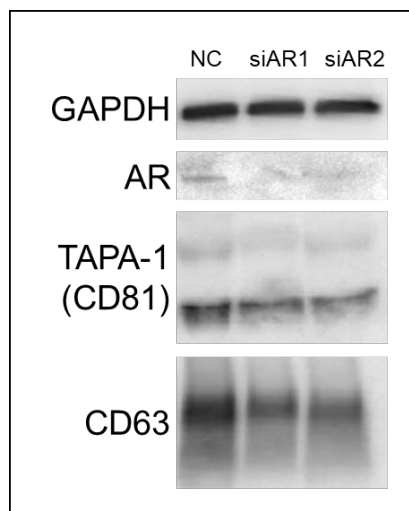
AR 陽性の C4-2B の AR を small interference RNA を用いてノックダウンしその上清中のエクソソーム抽出を試みた。ウェスタンブロットにて whole cell での AR 蛋白が 2 つの C4-2B-siAR で抑制されていることを確認した (siAR1 および siAR2)。C4-2B-siAR および C4-2B-NC の培養上清からエクソソームを抽出しエクソソームマーカー TAPA-1 および CD63 にて、エクソソーム由来であること確認した。これらは十分量の発現が認められ、AR の抑制の有無によってエクソソーム蛋白量には大きな差がないことも明らかとなった (右上図)。

次に、抽出したエクソソームを精製し、C4-2B の培養数 10000 個あたりのエクソソームを計算した。約 20000-40000 個/10000C4-2B 細胞のエクソソームが確認された (右下図)。ケモカインを抑制しうる micro RNA をデータベースから複数抽出し、まず候補として miR-21 と miR-221 を拾い上げた。miR-21 は AR の活性によって発現が亢進する micro RNA、miR-221 は AR の活性によって発現が低下する micro RNA として報告されている。これらの発現を C4-2B-siAR と C4-2B-NC で比較したところ、miR-21 は C4-2B-siAR で若干の発現の亢進が認められたが、miR-221 は C4-2B-siAR で発現の低下が認められなかった。

miR-21 を重要な候補として一旦保持しておくとともに、miScript PCR Array によって C4-2B-siAR および C4-2B-NC の exmiR を半網羅的に比較し新たな、より関連が示唆される exmiR の検出を試みた。miScript PCR Array では miR-21 の大きな発現変化が認められず、miR-34c-5p、miR-3662、miR-3666、miR-449a の発現低下が認められた (下左表)。一方で、発現亢進したもの (これらも間接的に CCL2 など下流への影響がある可能性がある) も 4 つ認められた (下右表)。

さらに CCL2 遺伝子から結合しうる micro RNA を TargetScanHuman 等の検索データベースシステムを利用し検索したところ、複数の micro RNA が確認された。これらが CCL2 の発現に影響を及ぼす可能性が示唆され、今後のターゲットとする予定である。今後 CCL2 の発現に影響を及ぼすかどうか引き続き検討していく。

AR シグナルの遮断を治療とする限り前立腺癌の根治は難しい。AR シグナルの遮断から前立腺癌の増悪をもたらすシグナルを同定し、ターゲットとして治療しなければ新たな展開は得られない。前立腺癌における最重要分子 AR と、多数の癌の増悪因子として報告されている CCL2 が micro RNA を介して AR 発現が異なる癌細胞間でリンクしているという新奇メカニズムが明らかになれば合理的かつシンプルな治療ターゲットとなると考えられる。これまでのアンドロゲン高感受性をよりどころとした CRPC の治療体系を根本的に見直す潜在性を有する独創的研究と位置付けている。もともと内因性物質である micro RNA は副作用の少ない治療薬として非常に有望であり、早期に臨床応用へ近づけることが可能であると考えている。



発現低下 exmiR	相対比	発現亢進 exmiR	相対比
miR-34c-5p	-44.2	miR-101-3p	4.6
miR-3662	-87.6	miR-27a-3p	5.9
miR-3666	-16.8	miR-31-5p	7.1
miR-449a	-55.6	miR-455-5p	38.2

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Izumi K, Shigehara K, Nohara T, Narimoto K, Kadono Y, Mizokami A. Both High and Low Serum Total Testosterone Levels Indicate Poor Prognosis in Patients with Prostate Cancer. Anticancer Res. 2017;37:5559-5564. 査読有、DOI: 10.21873/anticancerres.11988

〔学会発表〕(計 0 件)

6 . 研究組織

研究協力者氏名：泉 浩二

ローマ字氏名：IZUMI, Kouji

所属研究機関名：金沢大学

部局名：附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 80646787

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。