

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10580

研究課題名(和文) 新組織切片培養で誘導された前立腺癌関連遺伝子の機能的解析と診断・治療への応用

研究課題名(英文) Functional analysis of the prostate cancer-related genes obtained from the new tissue culture system

研究代表者

渡邊 昌俊 (Watanabe, Masatoshi)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90273383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、スフェロイドに微小環境が加わった前立腺癌細胞の新組織切片培養で、発現が増強される遺伝子群よりKIF22遺伝子が抽出され、その機能的解析及び診断・治療への応用展開を目的とした。いずれの細胞株においても、細胞成長は抑制され、G2/M期に停止し、またアポトーシスも増加することが認められた。2Dおよびスフェロイド培養において、KIF22遺伝子に対するsiRNA併用による抗癌剤(ドセタキセル)の効果増強を確認することができた。これらの結果により、KIF22遺伝子の前立腺癌への関与および治療への応用の可能性を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, the prostate cancer-related genes were identified in the new tissue culture system. Among these genes showing enhanced expression in the new tissue culture system, the KIF22 gene was extracted as one of candidate genes related with prostate cancer behavior. In this study, we analyzed proliferation, apoptosis, and cell cycle of the prostate cancer cells (DU-145 and LNCaP) treated with KIF22 siRNA. The inhibition of KIF22 mRNA using siRNA affected cell proliferation in spheroids and monolayers of both cancer cell lines. This suppression also caused G2/M arrest and apoptosis in both cell lines. These results suggest involvement of the KIF22 gene in prostate cancer behavior.

研究分野：腫瘍病理、ナノメディシン

キーワード：前立腺癌 3次元培養 抗癌剤

1. 研究開始当初の背景

本邦の前立腺癌は、高齢化および社会生活の西洋化に伴い着実に上昇し、2020年にはその罹患数は男性の癌罹患数の第二位となり、米国と同様に社会的にも憂慮される癌である。研究代表者は分子病理学的手法を用いて、前立腺癌に関連する遺伝子変異を解析し、遺伝子変異の頻度差や欧米人と異なる変異様式を指摘し、このような遺伝子変異の差が前立腺癌の発生の人種差に連結すると報告した [Carcinogenesis, 18(7), 1355-8, 1997]。また、ホルモン不応性獲得において、アンドロゲンレセプター-遺伝子発現制御にメチル化が関与することなど前立腺癌関連遺伝子のエピジェネティクスな制御についても報告した [Lab Invest, 80(12), 1789-96, 2000; Lab Invest, 81(7), 1049-57, 2001; Int J Cancer, 106(3), 382-7, 2003; Cancer Sci, 94, 536-9, 2003 等]。

いずれの研究も、癌細胞が主体の前立腺癌細胞株の2次元培養による *in vitro* 系の利用が主体であった。しかしながら、癌細胞と周囲の微小環境との相互作用が癌の浸潤・転移の進展に重要な役割を担っていると考えられ、新たな培養系(組織切片培養およびスフェロイド培養)の前立腺癌研究への応用展開を図った[萌芽研究(平成19, 20年度), 基盤研究(C)(平成21-23年度)]。組織切片培養担体には、生体組織の微細構造と様々な生体分子が領域特異的に残存し、これらが領域特異的なシグナルを培養細胞に伝達出来ると考えられた。萌芽研究では、研究代表者は同培養系を前立腺癌の浸潤、播種、転移のモデルの可能性を見だし、組織切片培養担体は組織特異的な微小環境を保持していると報告した。スフェロイド培養は、特に無血管癌細胞モデルとして考えられている。研究代表者は前立腺癌細胞株のスフェロイド培養を利用して、増殖・アポトーシス、薬剤抵抗性などについて解析を行い、また前立腺癌細胞株の2次元培養とスフェロイド培養時の遺伝子発現の網羅的解析を行い、*Polo-like kinase 2 (Plk2)* 遺伝子を抽出した。前述の組織切片培養担体は組織特異的な微小環境を保持しているが、3次元構造の欠如があるため、スフェロイドと厚みを与えた組織切片担体を組み合わせた単純な前立腺癌細胞培養系を構築した。類似した培養系として、ヒト癌細胞株と異種/同種脳組織切片の培養は既に報告されている [Glia, 61, 1331-46, 2013; PLOS ONE, 7(9), e45559, 2012, 他]。スフェロイド培養(first selection)で発現が上昇した遺伝子群で、複数の遺伝子の発現を再解析した。

2. 研究の目的

本研究では、スフェロイドに微小環境が

加わった新組織切片培養における *KIF22* を含む発現が増強される遺伝子群が抽出され、これら遺伝子群の機能的解析及び診断・治療への応用展開を目的とした。具体的には、前立腺癌細胞における *KIF22* 遺伝子の機能的解析を目的とした。また、新組織切片培養は類似の培養系(脳腫瘍、乳癌)の報告があるが、長期の培養が難しい、異種間にかかわる反応など不明瞭な問題などがあり、系の構築を含む同方法の標準化も目的とした。

3. 研究の方法

前立腺癌細胞株における *KIF22* 遺伝子の機能的解析および新組織切片培養法の標準化を以下の方法で行った。

(1) siRNA を利用した前立腺癌細胞株 (DU145, LNCaP) における同遺伝子の機能解析: siRNA 処理時・非処理時における motility, cell cycle, invasion, wound healing migration assay を行った。また、前立腺癌細胞株 (DU145, LNCaP) のスフェロイド培養における、siRNA 処理時・非処理時のスフェロイド形態、増殖を解析した。

(2) *KIF22* 遺伝子と抗癌剤抵抗性についての解析 [Anticancer Res., 1A, 45-53, 2007]: 記述のように docetaxel に対する抗癌剤感受性を siRNA 処理時・非処理時のスフェロイドの形態および増殖を解析した。

(3) 癌細胞株 (DU145, A549) の新組織切片培養の標準化: 細胞接着阻害剤を塗布したウエルでスフェロイド培養した。一方、正常ラット組織の凍結組織を作製した後にミクロトームで一定の厚さに薄切し、スライド上に伸展させた。培養液が入った特殊なウエル内に、スライドを置き、スフェロイドを組織片上で培養の前実験を行った。今回はラット (F344) より得られた組織切片担体を作成した [Glia, 61, 1331-1346, 2013; Int J Clin Exp Pathol, 6, 546-560, 2013]。

4. 研究成果

(1) 前立腺癌細胞株における *KIF22* 遺伝子の機能解析: siRNA を用いて、細胞の *KIF22* 遺伝子の発現を抑制させた。いずれの細胞株においても、約70%程度のタンパクレベルでの発現抑制を確認した。2次元培養において、その細胞成長が有意に抑制される事が確認された。さらに、細胞周期およびアポトーシスについて解析した。いずれの細胞株においても、G2/M期に停止し、集積が起こり、またアポトーシスも増加することが認められた。一方、細胞の遊走能や浸潤能には影響が認められなかった。*KIF22* 遺伝子が属する kinesin superfamily は微小管に結合するモーターたんぱく質であり、同遺伝子と癌との関係の報告は1報のみである。少なくとも前立腺癌細胞株においては、細胞周期およびアポトーシスに関与することが明らかに出来た。

(2) *KIF22*遺伝子と抗癌剤抵抗性についての解析: *KIF22*遺伝子siRNAの処理の下での抗癌剤(ドセタキセル)の効果は、2Dおよびスフェロイド培養において、抗癌剤の効果増強を確認することが出来た。これらの結果により、*KIF22*遺伝子の前立腺癌への関与および治療への応用の可能性を示すことが出来た。

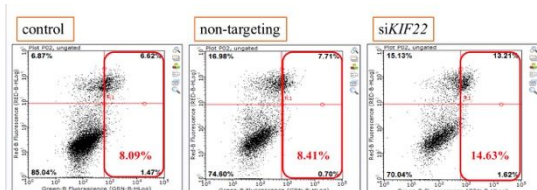


図 DU145細胞における*KIF22*遺伝子とapoptosisの関係

(2)癌細胞株の新組織切片培養の標準化:3から4日程度で作製されたスフェロイドを組織切片担体およびシランコーティング上でそれぞれ培養し、形態および変化を観察した。シランコーティング上での培養では、スフェロイドは1から2日以内に崩壊したが、組織切片担体上では、スフェロイドは緩やかに山状の構造に変化し、その状態を維持しながら培養することが出来た。スフェロイドの形成、構造維持には、培養条件およびE-cadherin, integrinなどの細胞接着因子が重要な役割を果たすが、組織切片担体という培養環境がスフェロイド構造維持に重要な役割を果たし、また生体に近似した3次元構造を維持した新しいin vitro培養系として発展する可能性を見出した。

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5件)

- 1) K.Ishii, S.Takahashi, Y.Sugimura, M.Watanabe. Role of stromal paracrine signals in proliferative diseases of the aging human prostate. *J.Clin.Med.*, 査読有, 6, 68-89, 2018.
- 2) K.Kojima, S.Takahashi, S.Saito, Y.Endo, T.Nittami, T.Nozaki, R.C.Sobti, M.Watanabe. Combined effects of Fe₃O₄ nanoparticles and chemotherapeutic agents on prostate cancer cells in vitro. *Appl. Sci.*, 査読有, 8, 134-150, 2018.
- 3) A.Iwasaki, K.Sakai, K.Moriya, T.Sasaki, D.R.Keene, R.Akhtar, T.Miyazono, S.Yasumura, M.Watanabe, S.Morishita, T.Sakai. Molecular mechanism responsible for fibronectin-controlled alterations in tissue stiffness in advanced chronic liver fibrogenesis. *J.Biol.Chem.*, 査読有, 291, 72-88, 2016.
- 4) H.Tone, S.Yoshioka, H.Akiyama, A.Nishimura, M.Ishimura, M.Nakatani,

T.Kiyono, M.Yoyoda, M.Watanabe, A.Umezawa. *Biomed. Res. Int.*, 査読有, 2016, 1-7, 2016.

- 5) Y.Ito, H.Ishiguro, N.Kobayashi, H.Hasumi, M.Watanabe, M.Yao, H.Uemura. Adipocyte-derived monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. *Prostate*, 査読有, 75, 1009-1019, 2015.

〔学会発表〕(計4件)

- 1) R.Sakamaki, S.Saito, T.Kitano, T.Nittami, J.Seo, A.Takagi, H.Ishiguro, H.Uemura, M.Watanabe. Functional analysis of the *KIF22* in human prostate cancer cells. American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2017年4月1日から4月5日, Washington DC.
- 2) 酒巻里菜, 斎藤春五, 丸山諒, 徐芝隠, 山本圭, 北野竜也, 新田見匡, 高木陽光, 石黒斉, 上村博司, 渡邊昌俊. 前立腺がんへの *KIF22* 遺伝子の関与について. 第75回日本癌学会学術総会, 2016年10月6日から10月8日, 横浜パンフィコ.
- 3) 北野竜也, 徐芝隠, 山本圭, 森田駿, 堀恭樹, 新田見匡, 高木陽光, 石黒斉, 上村博司, 渡邊昌俊. 前立腺がんの挙動への *plk2* 遺伝子の関与について. 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月8日から10月10日, 名古屋国際会議場.
- 4) 山本圭, 徐芝隠, 堀恭樹, 北野竜也, 森田駿, 小島佳奈子, 新田見匡, 石黒斉, 上村博司, 遠藤宣広, 渡邊昌俊. DU-145 前立腺癌細胞の挙動における *Zyxin* の機能的解析. 2015年10月8日から10月10日, 名古屋国際会議場.

〔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

渡邊 昌俊 (WATANABE, Masatoshi)
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号：90273383

(2) 研究分担者

白石 泰三 (SHIRAIISHI, Taizo)
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・
客員教授
研究者番号：30162762

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()