

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390373

研究課題名(和文) ショウジョウバエモデルを用いた前立腺癌の新規治療標的因子の探索

研究課題名(英文) Screen for novel therapeutic target of prostate cancer patient using drosophila as model.

研究代表者

河内 明宏 (Kawauchi, Akihiro)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：90240952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌の増悪メカニズムの解明および新規治療標的の同定を目的にPAX2の前立腺癌における機能解析、ショウジョウバエを用いた前立腺癌増悪因子のスクリーニングを行った。その成果として(1) 正常部位、原発巣と比較して転移巣においてPAX2が高発現することが判明し、PAX2は転移促進に機能する可能性が考えられた。(2) マイクロアレイ解析の結果、PAX2の標的遺伝子としてAR、HGFを同定した。(3)同定した因子のヒトホモログがヒト前立腺癌細胞の増殖・浸潤を制御することが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, our objective is to clarify the function of PAX2 in metastatic prostate cancer using prostate cancer cell lines and to identify novel regulators of human prostate cancer cell invasion and growth using the Drosophila accessory gland as a model. In human prostate cancers, PAX2 was hyper-expressed in metastatic cancers, but was expressed at lower levels in non-metastatic cancers. We identified the AR and HGF as target genes of PAX2 by DNA microarray analysis. PAX2 associated with the promoter of AR and HGF and regulated the expression level of AR and HGF through DNA demethylation or histone acetylation.

We identified several novel candidate genes regulating invasion and cell growth of secondary cells in drosophila. We found that the human homologues of three of the Drosophila candidate genes regulated invasion and growth of human prostate cancer cells.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 PAX2 ショウジョウバエ AR HGF

1. 研究開始当初の背景

(1) アンドロゲン非依存性前立腺癌の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。癌の増悪メカニズムを理解する上で器官形成を担う因子の機能解析は非常に重要と考えられる。前立腺の器官形成を担う因子としてアンドロゲンレセプター(AR)がよく知られているが、PAX2 という因子が AR より早期の段階で作用することが報告されている。PAX2 の前立腺癌における機能は不明な点が多い。

(2) PAX2 のハエホモログ Paired(Prd)はショウジョウバエ雄の附属腺(accessory gland)の細胞増殖と機能分化に必要であり、変異体雄の附属腺は委縮し、射精不全による不妊を示す。accessory gland はヒト前立腺と機能的に相同な器官として知られており、2種類の二核性細胞から構成される。これらの附属腺細胞は、精液中に accessory gland proteins (Acps) を分泌する。雌の生殖器内に輸送された Acps は、交尾拒否行動の誘発、貯精・産卵の促進などを引き起こす。

2. 研究の目的

上記より PAX2 は前立腺器官形成及び前立腺癌発生において重要な機能を有し、その作用点は前立腺発生において AR より早期に作用する因子であると考えられた。

本研究では(1)PAX2 の前立腺癌における機能解析を行うこと、(2)ショウジョウバエにおけるヒト前立腺相同組織 accessory gland をモデルとして用いて新規前立腺癌増悪制御因子のスクリーニングを行うこと、(3)同定した因子のヒト相同組織の機能解析を通じて前立腺癌増悪メカニズムの解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌細胞患者検体を用いて PAX2 の発現レベルを検討した。Johns Hopkins Hospital で手術または剖検を施行された患者の検体より正常部位、原発巣、転移巣を抽出し(Med Pathol 1993 6:201-7)、リアルタイム RT-PCR、免疫染色を行った。

(2) ヒト前立腺癌細胞株(22Rv1)において PAX2 ノックダウンを行い、マイクロアレイ解析を施行。標的遺伝子の探索、解析を行った。

(3) ショウジョウバエにおけるヒト前立腺相同組織である accessory gland の構成細胞 secondary cell 特異的に GFP 蛍光蛋白を発現するショウジョウバエを用いた(Esg^{ts}-GAL4, UAS-GFPnls ; act > CD2 > GAL4, UAS-FLP)。RNAi を発現するオス(NIG-FLY)と上記メスを 18 で交配し、次世代が羽化した後に 28.5 で培養した。その結果熱ショック依存的に前立腺特異的に RNAi と GFP が発現する。蛍光顕微鏡を用いて secondary cell の増殖・浸潤を GFP を指標に観察した。

(4) データベース上で secondary cell 特異的に発現する因子のノックダウンを行い、

secondary cell の増殖・浸潤制御因子のスクリーニングを行った。

(5) 上記スクリーニングで同定した因子のヒトホモログの機能解析をヒト前立腺癌細胞株を用いて行った

4. 研究成果

(1) 正常部位、原発巣と比較して転移巣において mRNA、蛋白レベルで PAX2 が高発現することが判明し、PAX2 は転移促進に機能する可能性が考えられた。(Figure.1)

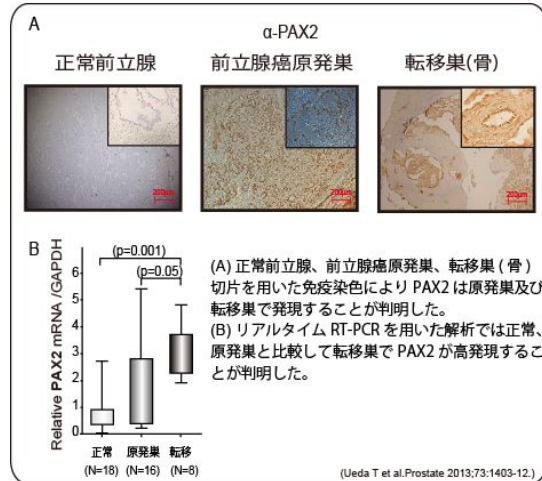


Figure 1

(2) マイクロアレイ解析の結果、PAX2 の標的遺伝子として AR、HGF を同定した。PAX2 は AR、HGF のプロモーター領域に結合し、DNA の脱メチル化やヒストンのアセチル化を介して AR や HGF の発現制御することが判明した。(Figure.2)

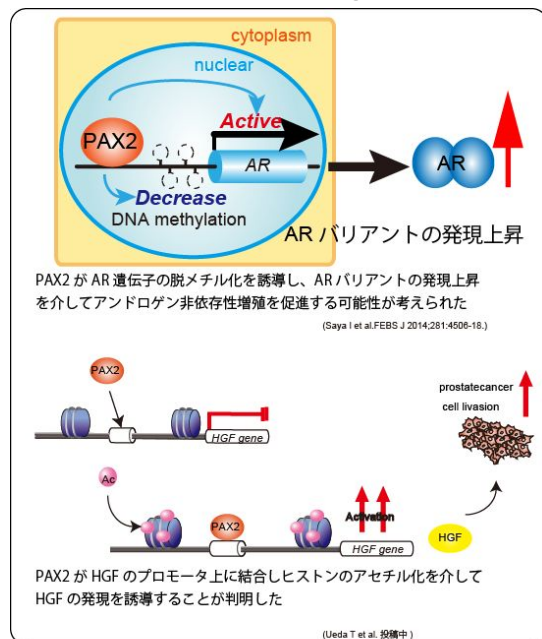


Figure 2

(3) ショウジョウバエを用いた前立腺癌増悪因子モデルの構築を行った(Figure 3)

ショウジョウバエを用いた前立腺癌増悪因子のスクリーニング

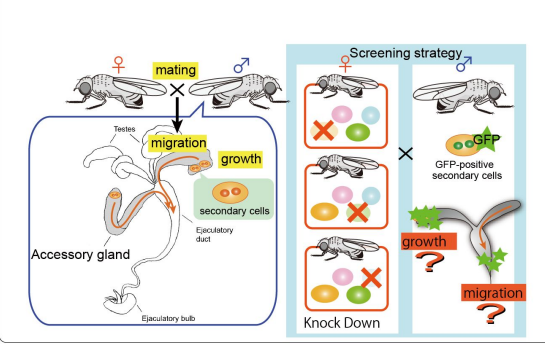


Figure 3

(4) 上記スクリーニングの結果 secondary cell 増殖・浸潤制御因子を同定した。(table1)

Symbol	Name	Annotation ID	NIG-Fly Stock ID	(I) cell number		(II) migration	
				decrease	normal	>2 cells	0 cells
Abp-1	Arboreal phosphatase 4	CG14872	14872B-2	-	1/1	-	1/1
Abp-111	Arboreal B11	CG58989	58989B-1	2/2	-	-	2/2
Abp	Arboreal bottom boat	CG58989	58989B-3	-	6/9	1/6	1/6
Act	Actin-binding factor	CG14341	14341B-2	3/4	1/4	-	2/4
Act	Actin	CG10218	10218B-2	13/19*	6/19	3/19	16/19
Acsp	Ac-scramblin protein	CG56224	56224B-2	1/4	3/4	2/4	1/4
Acsp2		CG56224	56224B-1	3/3	10/13	1/13	12/13
Acsp3		CG56224	56224B-3	2/3	11/13	2/13	10/13
Ahl	antennal heartless	CG57222	7222B-1	2/2	-	-	2/2
Acsp12		CG51174	1174B-1	2/3	1/3	-	3/3
Acsp19		CG56929	56929B-2	-	3/3	-	3/3
Akl	antennal-less	CG57222	7222B-1	2/2	-	-	2/2
Akl1	Dodeca-satellite-binding protein 1	CG51710	1710B-1	5/5*	-	-	1/5
Akl2	KDEL receptor	CG51871	1871B-1	1/3	2/3	-	3/3
Acsp172		CG51872	1872B-2	-	4/4	-	1/4
Acsp17221		CG517221	17221B-1	2/2	-	-	2/2
Acsp1884		CG41884	1884B-2	8/28	22/28	11/28*	16/28
Nes2b	Nemann-Pick type C-2b	CG51959	1959B-2	2/10	2/10	2/10	8/10
Nl46bN1	nodal-4 hydroxylase.alpha.NE2	CG59720	7200B-2	6/11	5/11	6/11*	5/11
Nl46bN2		CG41416	1416B-1	2/9	7/9	2/9	7/9
Nl46bN3		CG51310	1310B-1	-	8/9	3/9	1/8
Scp2b	Scp2b	CG58137	1374B-2	1/3	2/3	-	3/3
Scp2c	Scp2c	CG41742	1742B-2	-	8/9	3/9	3/8
FRAM	FRAM	CG51169	1169B-3	1/1	-	-	1/1
Udx	Uridylate Cytosolic transferase y subunit	CG57630	7630B-1	-	3/3	2/3*	1/3
MrgBP	MrgBP	CG13748	13748B-2	11/11*	-	1/11	10/11
mdf	mdf	CG57116	7116B-1	11/23*	12/23	4/23	18/23
E-cad	esh2lgan	CG57722	7722B-2	8/12*	4/12	2/12	6/12
N-cad	Caebren-N	CG7100	7100B-3	8/9*	1/9	1/9	8/9
mid-type					11/11	-	4/11 (36%)

Table1

(5) ショウジョウバエで同定した因子のヒトモログ MRGBP、CNPY2、MEP1A をヒト前立腺癌細胞においてノックダウンしたところ増殖、浸潤を抑制した(Figure 4)

以上よりショウジョウバエで同定した新規因子がヒト前立腺癌細胞でも増殖浸潤を抑制することが判明した。現在我々はモデルマウスを用いて同定した新規因子のさらなる機能解析を施行中である。

ヒト前立腺癌細胞における MRGBP、CNPY2、MEP1A の機能解析

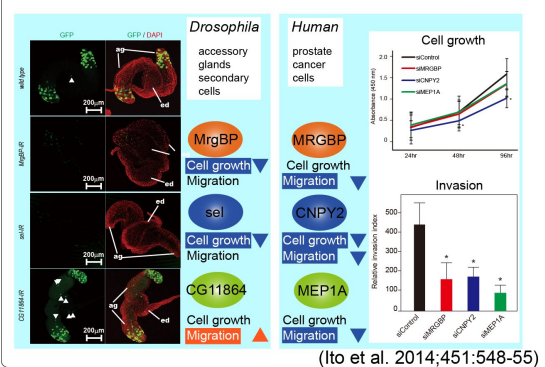


Figure 4

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Saya Ito, Takashi Ueda, Akihisa Ueno, Hideo Nakagawa, Hidefumi Taniguchi, Fumiya Hongo, Kazumi Kamoi, Koji

Okihara, Akihiro Kawauchi, Tsuneharu Miki

Paired box 2 upregulates androgen receptor gene expression in androgen-independent prostate cancer. **FEBS J** 査読有 281(19):4506-18 (2014)

2. Saya Ito, Takashi Ueda, Akihisa Ueno, Hideo Nakagawa, Hidefumi Taniguchi, Naruhiro Kayukawa, Tsuneharu Miki

A genetic screen in Drosophila for regulators of human prostate cancer progression, **Biochem Biophys Res Commun** 査読有 451(4) 548-555 (2014)

3. Takashi Ueda, Saya Ito, Takumi Shiraiishi, Prakash Kulkarni, Akihisa Ueno, Hideo Nakagawa, Yasunori Kimura, Fumiya Hongo, Kazumi Kamoi, Akihiro Kawauchi, Tsuneharu Miki

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), 1403-1412 (2013)

[学会発表](計 4 件)

第 103 回日本泌尿器科学会

ショウジョウバエモデルを用いた前立腺癌細胞浸潤促進因子のスクリーニング
上田崇、伊藤紗弥、上野彰久、中河秀生、谷口英史、大石正勝、中村晃和、納谷佳男、本郷文弥、鴨井和実、沖原宏治、三木恒治
2015/4/18、金沢

第 73 回日本癌学会総会

PAX2 hyper-expression promotes prostate cancer progression through AR gene upregulation.
上田崇、伊藤紗弥、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
2014/9/25、横浜

第 102 回日本泌尿器科学会

前立腺組織分化制御因子 PAX2 の前立腺癌における分子機能解析
上田崇、伊藤紗弥、白石匠、Kulkarni Prakash, 上野彰久、中河秀生、谷口英史、大石正勝、中村晃和、納谷佳男、本郷文弥、河内明宏、三木恒治
2014/4/24、神戸

第 72 回日本癌学会総会

Hyper-expression of PAX2 in human metastatic prostate tumors and its promoter activity by an in vitro invasion model.
上田崇、伊藤紗弥、上野彰久、中河秀生、大石正勝、中村晃和、納谷佳男、本郷文弥、河内明宏、三木恒治
2013/10/5、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河内 明宏 (KAWAUCHI, Akihiro)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：90240952

(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

冲原 宏治 (OKIHARA, Kouji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)准教授

研究者番号：80285270

上田 紗弥 (伊藤紗弥)(UEDA, 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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：