

去勢抵抗性前立腺癌における OCT1 の機能解析
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系泌尿器科学専攻

山本 慎一郎

修了年 2019 年

指導教員 高橋 悟

【緒言】

アンドロゲンおよびアンドロゲン受容体 (androgen receptor: AR) を介したアンドロゲンシグナル経路が前立腺癌の増殖・進行に重要な役割を果たしている。進行性前立腺癌に対するホルモン療法は有効な治療法だが、次第にホルモン療法が効かなくなる去勢抵抗性前立腺癌 (castration resistant prostate cancer: CRPC) となってしまうことが問題である⁽¹⁾。Octamer transcription factor 1 (OCT1)は生体内に広く存在するが、前立腺においては AR と協調して転写因子として働く。これまでの前立腺癌における OCT1 の機能解析では、AR 陽性前立腺癌細胞である LNCaP 細胞において最も高発現の OCT1 標的遺伝子が acyl-coenzyme A synthetase 3 (ACSL3)であることや⁽²⁾、ACSL3 が前立腺癌細胞内でのテストステロン合成を介して前立腺癌の進展に働くことが報告されているが⁽³⁾、CRPC における OCT1 の働きは明らかではなかった。

【目的】

本研究では OCT1 による CRPC の進行に関わる分子作用機序の解明を目的とする。OCT1 による前立腺癌進行に関わる分子作用機序の解析は、これまで AR 陽性前立腺癌細胞 LNCaP 細胞において行われてきた。本研究では CRPC のモデル細胞として 22Rv1 細胞を用いて OCT1 の機能を解析した。

【方法】

1 細胞と細胞培地、材料

ヒト前立腺癌細胞株として、CRPC モデル細胞 22Rv1 細胞と AR 陽性前立腺癌細胞 LNCaP 細胞、AR 陰性前立腺癌細胞 DU145 細胞を American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)から購入した。細胞培養は 37°C、5% CO₂ 条件下で、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS, JPH Bioscience) を添加した RPMI 1640 培地 (Sigma, St Louis, MO, USA) にて行った。

2 Small interfering RNA (siRNA)

siRNA は Sigma Genosys (Tokyo, Japan)より購入した。トランスフェクションには Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いた。

3 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay

96 ウエルディッシュの各ウエルに 22Rv1 細胞を入れ、24 時間後に siRNA をトランスフェクションした。37°C で培養後に Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA) を付加し、microplate reader (Mithras LB 940; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) の absorbance 490 nm にて測定した。

4 Cell migration assay

フィブロネクチン処理をした Cell Culture Insert with an 8.0- μ m pore size PET filter (Falcon, NY, USA) を用いて、48 時間培養後にメタノール固定及びギムザ染色を行い、pore を通過した細胞数を蛍光顕微鏡 (Nikon eclipse TE 2000-U; Nikon, Tokyo, Japan) $\times 100$ 視野にて撮影、検討した。

5 Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

細胞よりトータル RNA を ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて溶解、抽出した。1 本鎖 cDNA は PrimeScript RT reagent kit (Takara, Kyoto, Japan) を用いて mRNA より逆転写合成した。qRT-PCR は ABI Step One (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて行い、試薬は KAPA SYBR green mix (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA) を使用して、遺伝子発現量を定量化した。

6 Western blot analysis

細胞からの蛋白抽出液の回収は whole cell lysate を lysis buffer (50 mM Tris-HCl, [pH8.0], 150 mM NaCl, 1.0% NP40, protease inhibitor cocktail) にて溶解して回収した。それぞれの蛋白を 8% SDS-polyacrylamide gel で電気泳動し、Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) に転写させた。メンブレンは PierceTM ECL Plus Western Blotting Substrate (Life

Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いて発色させた。

7 マイクロアレイ解析

22Rv1 細胞より抽出した RNA を用いて、Clariom S Arrays HT, human (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)によりマイクロアレイを行った。

8 統計学的解析

実験結果は Student's t 検定を用いて評価した。 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

【結果】

1 OCT1 発現抑制の CRPC 細胞への影響

まず、CRPC モデル細胞 22Rv1 細胞で AR 陽性前立腺癌細胞 LNCaP 細胞に比較し、OCT1 が高発現であることを western blot analysis を行い示した。

OCT1 の CRPC 細胞内での機能を解析するため、siRNA を用いて OCT1 の発現を特異的に抑制する実験を行った。いずれの siOCT1 をトランスフェクションした場合も、OCT1 の蛋白レベルでの発現量が顕著に抑制された。次に、siOCT1 を用いて MTS assay と migration assay を 22Rv1 細胞に対して実施したところ、OCT1 の発現を抑制することで細胞増殖能および細胞遊走能が有意に抑制された。

2 CRPC 進展に関わる OCT1 の直接的な標的遺伝子の同定

マイクロアレイ解析を行い、CRPC での発現上昇が予想される OCT1 標的遺伝子候補を 14 遺伝子抽出した。次に 14 遺伝子について OCT1 による発現制御を qRT-PCR により検討した。その結果、5 つの遺伝子群で、siOCT1 により mRNA レベルでの発現量が有意に減少することを確認した。これらの遺伝子を OCT1 AR targeting gene group (OATG)とした。

3 OCT1 標的遺伝子発現抑制の CRPC モデル 22Rv1 細胞への影響

5 つの OATG のうちこれまでに前立腺癌での機能解析の報告がない 4 つの遺伝子につき前立腺癌細胞内での機能を解析するため、それぞれの発現を特異的に抑制する siRNA を用いて、MTS assay と migration assay を 22Rv1 細胞に対して実施した。それぞれの遺伝子を抑制することで、細胞増殖能を有意に抑制させる遺伝子を 1 つ、細胞遊走能を有意に抑制する遺伝子を 3 つ確認した。

【考察】

1 CRPC モデル細胞における OCT1 の役割

本研究ではまず、AR 陽性の CRPC モデル細胞として 22Rv1 細胞を用い、AR 陽性の LNCaP 細胞に比較し OCT1 が高発現であることを明らかにし、OCT1 の高発現が去勢抵抗性獲得に働く可能性を想定した。次に、22Rv1 細胞において OCT1 の発現を抑制することで、細胞増殖能および細胞遊走能が抑制されることを示し、CRPC においても OCT1 が腫瘍の増殖、進展を促進する可能性が

示唆された。これらのことから、本研究では 22Rv1 細胞を用いて、OCT1 の CRPC における機能を解析することとした。

2 CRPC の進展に関わると想定される OCT1 標的遺伝子の抽出

22Rv1 細胞、LNCaP 細胞はいずれも AR 陽性前立腺癌細胞株であり AR に依存して増殖する⁽⁴⁾。しかしながら、LNCaP 細胞はアンドロゲン除去処理により増殖を抑えることができるのに対して⁽⁵⁾、CRPC モデル細胞である 22Rv1 細胞ではこの処理は十分に有効ではない⁽⁶⁾。そのため、22Rv1 細胞で高発現の遺伝子のうち、LNCaP 細胞に比較して高発現の遺伝子を CRPC 進展における重要な OCT1 標的遺伝子の候補になり得ることを想定した。

3 OCT1 標的遺伝子の前立腺癌における働き

新たに見出した 5 つの OATG は、細胞分裂においてはモータータンパクや動原体蛋白として微小管を制御することで働くことが示唆されており、細胞の遊走に関しても微小管の運動を介して作用している可能性も考えられる。

4 今後の研究の展望

今回、AR および OCT1 が CRPC 細胞内で細胞周期に関わる遺伝子の発現を制御することが明らかとなったが、CRPC 細胞内での役割や細胞分裂、細胞周期の解析を行うことで新たな治療法の開発や治療標的となり得ることが考えられた。

【引用文献】

1. Scher HI, Halabi S, Tannock I, Morris M, Sternberg CN, Carducci MA, Eisenberger MA, Higano C, Bubley GJ, Dreicer R, Petrylak D, Kantoff P, Basch E, Kelly WK, Figg WD, Small EJ, Beer TM, Wilding G, Martin A, Hussain M; Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 1148-59
2. Obinata D, Takayama K, Fujiwara K, Suzuki T, Tsutsumi S, Fukuda N, Nagase H, Fujimura T, Urano T, Homma Y, Aburatani H, Takahashi S, Inoue S. Targeting OCT1 genomic function inhibits androgen receptor signaling and castration-resistant prostate cancer growth. *Oncogene*. 2016; 35, 6350-8
3. Migita T, Takayama KI, Urano T, Obinata D, Ikeda K, Soga T, Takahashi S, Inoue S. ACSL3 promotes intratumoral steroidogenesis in prostate cancer cells. *Cancer Sci*. 2017; 108, 2011-21
4. Watson PA, Arora VK, Sawyers CL. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015; 15: 701-11
5. Nicholson B, Gulding K, Conaway M, Wedge SR, Theodorescu D. Combination antiangiogenic and androgen deprivation therapy for prostate cancer: a promising therapeutic approach. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 8728-34
6. Li Y, Chan SC, Brand LJ, Hwang TH, Silverstein KA, Dehm SM. Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res*. 2013; 73: 483-9