The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	前立腺癌治療創薬におけるPCA-1の分子標的としての評価
Author(s)	小池, 和央
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57956
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【10】

氏　　名	小　池　和　央（こ いけ かず ひさ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　２３７５３　号
学位授与年月日	平成22年３月23日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学　位　論　文　名	前立腺癌治療創薬におけるPCA-1の分子標的としての評価
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　山元　　弘 （副査） 教　授　中川　晋作　　教　授　堤　　康央　　教　授　藤尾　　慈

論　文　内　容　の　要　旨

我々は，前立腺癌の新たな治療標的分子の探索を目的として，前立腺癌術後病理組織の癌部と非癌部より抽出したmRNAを用いて，蛍光ディファレンシャル・ディスプレイ解析を実施した．その結果，癌部において高発現する遺伝子として，prostate cancer antigen-1 (PCA-1) のクローニングに成功した．PCA-1に対する抗体を作製し，前立腺癌病理組織の免疫組織化学染色を実施したところ，70例中63例においてPCA-1の高発現が確認された．また前癌病変とされる前立腺上皮内腫瘍においてもPCA-1の高発現が認められたことから，PCA-1と細胞癌化との関連性が推測された．また，前立腺癌確定診断時のバイオプシー検体においてPCA-1のより高発現が認められた症例ほど，内分泌療法抵抗性前立腺癌へ移行するまでの期間が短いことも明らかになり，PCA-1が内分泌療法抵抗性前立腺癌発症において重要な役割を担っている可能性が推測された．内分泌療法抵抗性前立腺癌には，現在有効な治療法が確立されておらず，新たな治療薬の開発が切望されている．そこで，本研究では前立腺癌，特に内分泌療法抵抗性前立腺癌におけるPCA-1の治療標的分子としての可能性について検討した．

ホルモン非依存性増殖を示す前立腺癌細胞株DU145およびPC3におけるPCA-1の機能を解析する目的で，PCA-1に対する2種類のsiRNAを合成し，DU145細胞およびPC3細胞にトランスフェクションした．その結果，いずれのsiRNAのトランスフェクションによっても，PCA-1のmRNAおよびタンパク質レベルでのノックダウンが確認された．さらに，PCA-1 siRNAのノックダウンにより，前立腺癌細胞株にアポトーシスが誘導されることが明らかとなった．一方，PCA-1 siRNAはヒト正常前立腺上皮細胞株PNT2にまったく影響を与えないことも示した．つまり，PCA-1の欠損は，正常前立腺上皮細胞にとっては致命的でないことが推測される．また，PCA-1の前立腺癌細胞におけるさらなる役割の解析を目的として，足場非依存性増殖について検討した．足場非依存性増殖は癌細胞のみが持つ特性のひとつで，正常細胞は足場がない状態では生存・増殖できないことが知られており，足場非依存性増殖の検討は古くから細胞の癌化の検証に用いられてきた．また，足場非依存性増殖は，癌細胞の転移や浸潤に重要な役割を果たしていることが知られている．そこで，PCA-1の足場非依存性増殖に与える影響を検討した．その結果，PCA-1 shRNAを用いてPCA-1の発現を抑制することにより足場非依存性増殖が低下し，逆にPCA-1を高発現することにより足場非依存性増殖の亢進が認められた．さらに，PCA-1 siRNAを用いても，ノックダウン効率の調整によりアポトーシスは誘導されず，足場非依存性増殖の低下が認められた．以上のことから，PCA-1の発現抑制は，正常前立腺上皮細胞に影響を与えず，前立腺癌細胞に対してのみアポトーシスの誘導や，足場非依存性増殖の低下を示した．これら*in vitro*の解析において，PCA-1が前立腺癌の治療標的分子となることが示された．

そこで，次にPCA-1の発現抑制によるアポトーシス誘導や足場非依存性増殖低下作用がどのようなシグナル伝達経路を介しているかについて検討した．Phosphoinositide 3-kinase/Aktシグナル伝達経路は細胞の生存や増殖に関わり，多くの癌細胞で活性化されている．また，その経路の抑制により癌細胞に対してアポトーシスが誘導されたり，足場非依存性増殖の低下が報告されている．実際にAktに対するsiRNAを用いることで，DU145細胞に対してアポトーシス誘導作用や足場非依存性増殖の低下を認めた．そこで，PCA-1もこの経路を介して，それぞれの表現型を示している可能性が推測されたため，PCA-1低発現細胞およびPCA-1過剰発現細胞におけるAktのリン酸化について検討した．その結果，PCA-1の低発現により，Aktのリン酸化が抑制され，逆にPCA-1の高発現によりAktのリン酸化が促進されていることが明らかとなった．また，リン酸化されることによりキナーゼとして働くAktのキナーゼ活性がPCA-1の発現抑制により減弱していることも確認した．以上のことから，PCA-1の発現調節により認められる表現型は，Aktのリン酸化を介したキナーゼ活性調節に起因する可能性が示唆された．しかし，PCA-1のAktリン酸化調節機構に関しては，未だ不明な点も多く，今後より詳細な解析が必要となる．

次に*in vivo*においてPCA-1が内分泌療法抵抗性前立腺癌の治療標的分子となる可能性についても検討した．ヌードマウスの皮下にPCA-1低発現前立腺癌細胞株を移植すると，コントロール細胞と比べ腫瘍成長が顕著に抑制された．また，DU145細胞を用いた*xenograft*モデルにおいて，PCA-1 siRNAを投与することにより，腫瘍成長が顕著に抑制された．以上のことから，PCA-1は*in vivo*においても前立腺癌の治療標的分子となる可能性が強く示された．

PCA-1は，大腸菌のメチル化DNA/RNA脱メチル化酵素AlkBと高い相同性を有し，実際に*in vitro*においてメチル化DNA/RNAの脱メチル化活性を発現することが明らかになっている．そこで，PCA-1の発現調節により認められる表現型にPCA-1の酵素活性が必須かどうかを検討した．まずはじめに，PCA-1の酵素活性が減弱することが報告されているPCA-1変異体 (PCA-1 D193A) を発現するDU145細胞を作製した．その細胞に対して，PCA-1 mRNAの非翻訳領域を認識するsiRNAをトランスフェクションすることにより，内因性PCA-1の発現抑制により認められるアポトーシスや足場非依存性増殖の低下について検討した．その結果，PCA-1 D193A発現はPCA-1 siRNAによるアポトーシスを抑制したが，足場非依存性増殖の低下は抑制しなかった．このことから，PCA-1の酵素活性は足場非依存性増殖には重要な役割を担っているが，アポトーシス誘導には関与しないことが考えられた．しかし，PCA-1の発現抑制により認められる2つの表現型はAktシグナルを介していると推測されるため，酵素活性の重要性を判断するには，本研究で得られた知見だけでは十分とは言えない．今後，PCA-1によるAktリン酸化制御機序の解明が必要となる．

以上の結果から，本研究では，PCA-1の高発現が前立腺癌の発症や悪性化に関与するという発見に加えて，これまでほとんど治療薬のなかった内分泌療法抵抗性前立腺癌を標的とした治療創薬へと繋がる可能性を示唆した．

論文審査の結果の要旨

前立腺癌の新たな治療標的分子の探索を目的として、前立腺癌術後病理組織の癌部と非癌部より抽出した mRNA を用いて蛍光ディファレンシャル・ディスプレイ解析を実施し、癌部において高発現する新規な遺伝子として prostate cancer antigen-1 (PCA-1) をクローニングした。PCA-1 に対する抗体は、70例中63例の前立腺癌に反応し、また前癌病変とされる前立腺上皮内腫瘍にも反応した。前立腺癌確定診断時のバイオプシー検体において、PCA-1 が高発現する症例ほど、内分泌療法抵抗性前立腺癌へ移行するまでの期間が短いことも明らかにし、PCA-1 と細胞癌化との関連性が推測できた。

次いで前立腺癌、特に内分泌療法抵抗性前立腺癌におけるPCA-1の治療標的分子としての可能性に

ついて検討した。PCA-1 に対する2種類の siRNA は、PCA-1 の mRNA およびタンパク質レベルでの発現をノックダウンし、前立腺癌細胞株にアポトーシスが誘導されることを明らにした。一方ヒト正常前立腺上皮細胞株では、siRNA はまったく影響を与えないことも示した。さらに PCA-1 の前立腺癌細胞における役割を解析するために足場非依存性増殖について検討したところ、PCA-1 shRNA の導入は足場非依存性増殖を抑制し、逆に PCA-1 を高発現することにより足場非依存性増殖の亢進が認められた。以上のことから PCA-1 の発現抑制は、正常前立腺上皮細胞に影響を与えず、前立腺癌細胞に対してのみアポトーシスの誘導や足場非依存性増殖の低下を示すことが明らかになった。またこれら *in vitro* の解析は、PCA-1 が前立腺癌の治療標的分子となることを示した。次に、PCA-1 の発現抑制によるアポトーシス誘導や足場非依存性増殖低下作用のシグナル伝達経路を検討し、Phosphoinositide 3-kinase/Akt 経路が働いていること、また Akt の抑制はアポトーシス誘導作用や足場非依存性増殖の低下を示すことを示した。また PCA-1 の低発現により Akt のリン酸化が抑制され、逆に PCA-1 の高発現により Akt のリン酸化が促進されていることも明らかにした。

次に *in vivo* において PCA-1 が内分泌療法抵抗性前立腺癌の治療標的分子となる可能性について検討し、前立腺癌細胞の *xenograft* モデルで、PCA-1 siRNA は腫瘍成長を顕著に抑制することを示した。以上のことから、PCA-1 は *in vivo* においても前立腺癌の治療標的分子となる可能性が強く示唆された。PCA-1 は大腸菌のメチル化 DNA/RNA 脱メチル化酵素 AlkB と高い相同性を有し、*in vitro* でメチル化 DNA/RNA の脱メチル化活性を発現する。そこで PCA-1 の発現調節により認められる表現型に PCA-1 の酵素活性が必須かどうかを検討した。PCA-1 の酵素活性が減弱する PCA-1 変異体 (PCA-1 D193A) を発現する前立腺癌細胞では、内因性 PCA-1 の発現抑制により認められるアポトーシスが抑制された。

以上、PCA-1 の高発現が前立腺癌の発症や悪性化に関与するという発見に加えて、これまでほとんど治療薬のなかった内分泌療法抵抗性前立腺癌を標的とした治療創薬へと繋がる可能性を示唆した。よって本研究は、大阪大学博士学位（薬学）に値するものと判断した。