

新規前立腺癌モデルを用いた細胞老化分泌現象抑制による治療探索的研究

獨協医科大学 埼玉医療センター 泌尿器科

大坂 晃由

1. 諸言

加齢とともに体内に蓄積した老化細胞は、さまざまな炎症性蛋白質を高発現して周囲に分泌する細胞老化随伴分泌現象（Senescence-associated secretory phenotype : SASP）を引き起こす。老化細胞では、DNA メチル化酵素やヒストンメチル化酵素の発現低下によってエピジェネティックな遺伝子発現抑制機構が破綻し、SASP 遺伝子の発現が誘導される。UTX（ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome）はヒト悪性腫瘍で変異を認めることが報告されている¹⁾。同定された変異はすべて機能欠失型変異であり、UTX は癌抑制遺伝子として機能していると考えられる。組織別の変異頻度解析では、UTX は、膀胱癌、前立腺癌、腎臓癌など泌尿器科系腫瘍で高頻度に変異を認めている（図 1）²⁾。

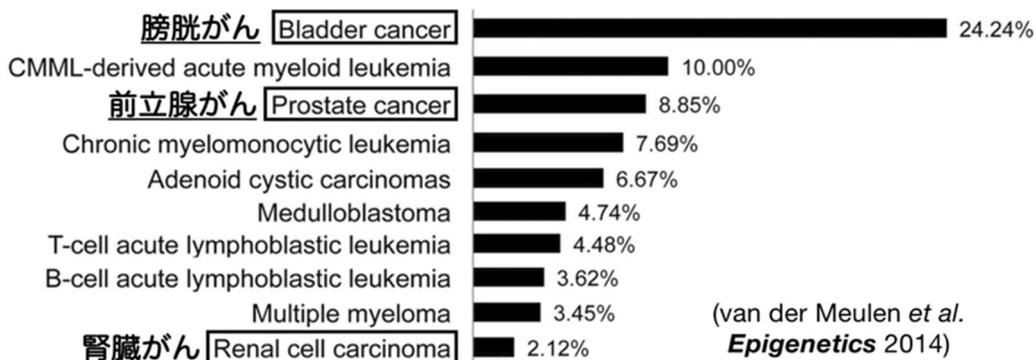


図 1 さまざまな腫瘍における UTX の変異頻

本研究では、新規前立腺癌発症モデルである DNA 脱メチル化酵素 UTX を前立腺特異的にノックアウトしたマウスを検証し、SASP が前立腺癌細胞の悪性化に関与しているのかを検討する。また、老化細胞の評価から、前立腺癌悪性評価のバイオマーカーとしての意義を検討し、臨床応用への可能性を探索する。

2. 方法

2.1 前立腺特異的 Utx 欠失マウスにおける SASP の検証

前立腺癌モデルマウスは、Utx cKO マウスに、前立腺特異的に Cre を発現する PbiCre マウスを掛け合わせるにより作製されている。前立腺特異的な Utx 欠失マウスを用いた検体からの標本は、共同研究者である東京女子医科大学実験動物研究所、先端生命医学専攻・疾患モデル研究分野の本田浩章先生から供与された。細胞老化とは、強い DNA 損傷を被った細胞で生体防御機構として作動する不可逆的細胞増殖停止状態である。しかし、細胞老化を起こしても細胞の代謝自体は活発であり、長く生存し続ける場合がある。そのような老化細胞から多くの分泌タンパク質が産生される現象が発見され、SASP と呼ばれている。老化細胞ではエピジェネティックな遺伝子発現抑制機構が破綻し、さまざまな SASP 遺伝子の発現が誘導される。老化細胞の病勢進行による変化は、老化マーカーとして老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼ (SA β -Gal) を用いて評価した。

2.2 老化細胞を治療標的とした前立腺癌動物モデルにおける治療効果の検討

老化細胞の除去には、前立腺癌組織を構築できるシステムを応用する。この方法の利点は、前立腺癌細胞を移植したマウスにおいて、蛍光顕微鏡下に容易に観察でき、腫瘍の増大、浸潤の有無、ホルモン応答性を客観的に検討できる。具体的には、P16ink4a 発現細胞を除去できる INKATTAC マウスの胎生 16 日目の胎児から尿生殖原基を採取し、強力な分化誘導能をもつ間葉系細胞を分離・培養する。生後 8 週以降の Utx 欠失マウス前立腺癌細胞を、コラーゲン中で間葉系細胞と混ぜ、SCID マウスの腎皮膜下に移植する。前立腺癌組織は腎皮膜下に再生され、これら前立腺癌細胞は GFP を発現させているために蛍光顕微鏡下に緑色蛍光を発する。移植された前立腺癌のホルモン感受性を検討するため、細胞が一定の増殖をみたうえで、除睾したマウスと除睾しないマウスで腫瘍の増殖・転移能に差を生じるか検討し、去勢抵抗性前立腺癌にいたる過程で発現する遺伝子を分子プロファイリングとアレイを用いて解析する。

3.結果

UTX は、メチル化されたヒストン H3 の 27 番目のリジン残基 (H3K27me) を脱メチル化する酵素として同定された³⁾。マウス Utx 遺伝子の exon 11-12 を loxP で挟んだコンディショナルノックアウト (cKO) マウスが作製されており、膀胱上皮特異的に Cre を発現する UpkIIICre マウスと掛け合わせて、膀胱上皮で Utx を欠失したマウスが作製されている (図 2)。このマウスは単独では膀胱癌を発症しなかったが、膀胱癌において UTX と高頻度に変異を合併するがん抑制遺伝子 p53 のノックアウトヘテロマウスと掛け合わせると膀胱上皮内癌を発症し、さらにタバコ由来の変異源である BBN (N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine) の投与により、筋層浸潤癌へと進展することが明らかとなった⁴⁾。本研究では、前立腺特異的な Utx 欠失マウスを作製し、前立腺で Utx を欠失したオスマウス (Utx^Δ, Uty⁺) では、脂肪食によるストレスから前立腺癌の発癌がみられた。前立腺がんは 8~9 週後に発

生し、前立腺癌の悪性度は Gleason grade 3~4 であった。また、p53KO マウスとの掛け合わせにおいて、より発癌が促進された。老化マーカーとして老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼ (SA β -Gal) を用いて免疫組織化学染色的に評価したところ、発癌に伴い SA β -Gal 陽性細胞の増加がみられた。これらの研究結果から、Utx 欠失マウスにおいて、SASP を介した癌の進展機構が推察される。また、炎症性サイトカインである IL-1、IL-6、IFN-beta、

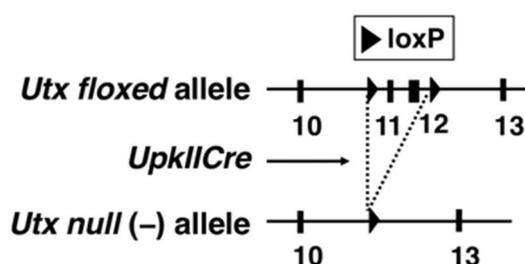


図 2 コンディショナルノックアウトマウスの作製

ケモカインである CXCL10、IL8、細胞外マトリックス分解酵素である MMP1、増殖因子である GMCSF、PDGF などがあるが、これらの発現を同マウスの前立腺組織を用いて免疫組織化学染色、Western blotting 法にて評価したところ、それらのいくつかに発現上昇がみられた。上述した前立腺癌組織を構築できる in vivo システムを用いて、現在検討を試みている。

4.考察

SASP 因子は、生体においては組織修復などの生理作用に関係する一方で、組織微小環境では癌の進展などのさまざまな不利益な病態を引き起こすこともわかってきたが、高齢者の罹患が多い前立腺癌ではほとんど解析されていない。前立腺癌動物モデルとしては、遺伝子改変モデルとして、probasin プロモーターでがんウイルス SV40 の T antigen を発現させる TRAMP マウス⁵⁾、およびがん抑制遺伝子 Pten を前立腺で欠損させたマウス⁶⁾がよく用いられている。われわれは同系統のマウスを用いて、去勢抵抗性獲得機構や細胞内アンドロゲン活性抑制剤の治療実験、発癌抑制薬の検討を行ってきた^{7,8)}。しかしこれまで、高率にヒト前立腺癌にて変異がみられるヒストン修飾因子を標的とした前立腺癌モデルはない。前立腺癌は、加齢とともに発症率が上昇するところから、DNA メチル化やヒストンの化学修飾変化など、いわゆるエピジェネティックな調節機構の異常が関与している。本研究の知見を介して、前立腺癌、特に SASP の抑制による前立腺癌の増殖や浸潤、悪性化を抑制する新規治療戦略の確立を目指す研究は独創的であり、臨床的意義が高い。将来的には、体内から老化細胞を除去する senolytic 薬をスクリーニングし、老化細胞が前立腺癌における治療標的となる可能性を検討したい。

5.結語

骨転移を有するような進行期前立腺癌では、ホルモン療法に抵抗性になり、化学療法や新規抗アンドロゲン薬が導入されたものの満足な治療成績は得られていない。また、高齢社会に伴い急増する前立腺癌をいかに予防していくかは社会的にも重要な課題である。近年

さまざまな癌検体に対して NGS を用いた網羅的遺伝子解析が行われ、既知のジェネティックな変異に加えて、ヒストン修飾因子やクロマチンモデリング因子の変異を含むエピジェネティックな異常が発癌に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。ヒストン・クロマチン修飾因子を標的とした前立腺癌モデルマウスはまったく新しい疾患モデルになると考えられ、SASP の解析とともに得られた結果は前立腺癌発症の分子機構に新たな知見をもたらし、新規治療法開発に役立つ可能性が期待される。

6.文献

- 1) van Haaften G, Dalglish GL, Davies H, Chen L, Bignell G, Greenman C, et al. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nature*. 2009; 41: 521-3.
- 2) Van der Meulen J, Speleman F, Van Vlierberghe P. The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. *Epigenetics*. 2014; 9: 658-68.
- 3) Hong S, Cho YW, Yu LR, Yu H, Veenstra TD, Ge K. Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 18439-44.
- 4) Kobatake K, Ikeda KI, Nakata Y, Yamasaki N, Ueda T, Kanai A, et al. Kdm6a Deficiency Activates Inflammatory Pathways, Promotes M2 Macrophage Polarization, and Causes Bladder Cancer in Cooperation with p53 Dysfunction. *Clin Cancer Res*. 2020; 26: 2065-79.
- 5) Gingrich JR, Barrios RJ, Morton RA, Boyce BF, DeMayo FJ, Finegold MJ, et al. Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Res*. 1996; 56: 4096-102.
- 6) Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997; 275: 1943-7.
- 7) Ide H, Lu Y, Noguchi T, Muto S, Okada H, Kawato S, et al. Modulation of AKR1C2 by curcumin decreases testosterone production in prostate cancer. *Cancer Sci*. 2018; 109: 1230-1238.
- 8) De Velasco MA, Lu Y, Kura Y, China T, Inoue Y, Nakayama A, et al. Chemopreventive effects of nanoparticle curcumin in a mouse model of Pten-deficient prostate cancer. *Hum Cell*. 2020; 33: 730-6.

7.成果発表

今後、主要学会で発表予定。また現在論文化に向けて推考中。