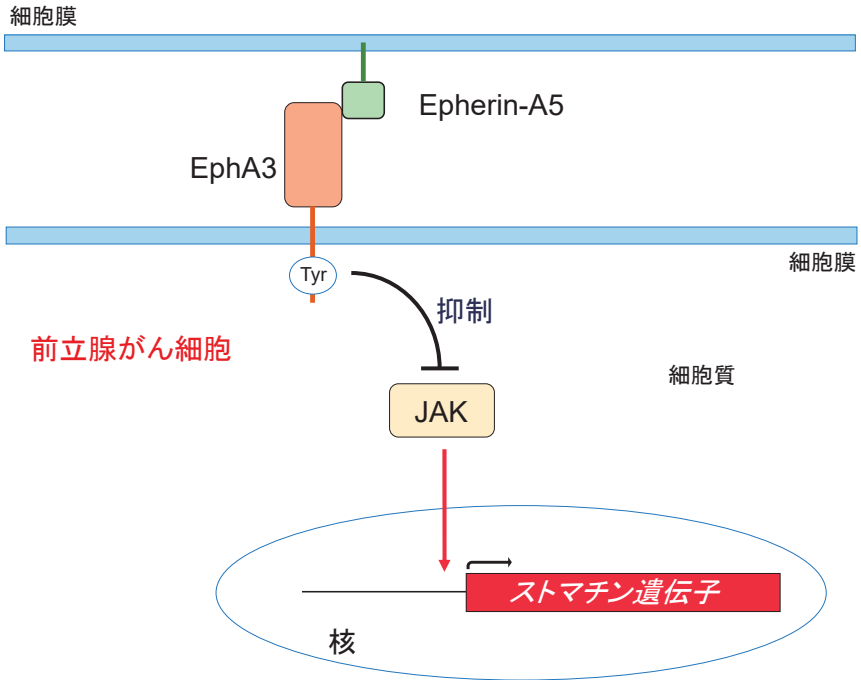
| 23　去勢抵抗性前立腺がんのメカニズム解明と新規治療開発 | 扇田　久和 |
|---|---|

【目的】前立腺がんは全体としては比較的予後の良いがんとされているが、一部に去勢抵抗性（アンドロゲン非依存性）となり悪性化するものがある。この去勢抵抗性の分子メカニズムについては未解明の部分が多く残されており、その解明は泌尿器腫瘍領域における重要な課題の一つである。本研究では、我々が独自に見出した抗腫瘍作用を持つ細胞膜裏打ち分子ストマチンに着目し、この分子と去勢抵抗性前立腺がんとの関連について検証することを主な目的とする。さらに、解明した分子メカニズムをもとに、去勢抵抗性前立腺がんに対する新たな治療法開発研究に向けた基盤構築についても検討する。

【方法】前立腺がんにおけるストマチンの発現制御機構に EphA-ephrin-A 系が関与していないか調べるため、これらの分子のノックダウン、qPCR、ウェスタンブロッティングを施行した。EphA3 による細胞内シグナルとストマチンの発現との関連を調べるため、EphA3 の細胞内シグナル伝達に必要な C 末端を欠失した EphA3 発現ベクターを作製し、免疫染色実験を行った。EphA3 下流のシグナル伝達に関わる JAK の阻害薬を使用した。前立腺がん細胞が増える速度について調べるため、一定数の細胞を培養ウェル上に播いた後、2 日ごとに細胞数をカウントした。

【結果】抗腫瘍作用を有するストマチンの発現が低下した前立腺がんは去勢抵抗性となり悪性度（増殖能・運動能の亢進）が高くなるが、ストマチンの発現を抑制する機構として、がん細胞間での EphA3 と ephrin-A5 の結合が重要であることを見出した。逆に、LNCaP 細胞で EphA3 または ephrin-A5 をノックダウンするとストマチンの発現量が増加した。さらに、このノックダウン細胞では LNCaP 細胞の増殖が抑制された。C 末端を欠失した EphA3 を LNCaP 細胞に過剰発現させてもストマチンの発現が増加したことから、EphA3 による細胞内シグナル伝達がストマチン発現抑制に必要であった。一方、EphA3 ノックダウンによるストマチン発現増加は、JAK 阻害薬の追加投与により、コントロールレベルにまで抑制されたことから、EphA3 シグナルは JAK を抑制することでストマチンの発現を抑制していると考えられた。

EphA–ephrin-A 系によるストマチン発現制御機構



# 23. 去勢抵抗性前立腺がんのメカニズム解明と新規治療開発

扇田　久和

滋賀医科大学 医学部 生化学・分子生物学講座

Key words：前立腺がん，ストマチン，シグナル伝達

## 緒　言

前立腺がんは日本で現在、男性で罹患数が第 1 位のがんとなっている［1］。前立腺がんの 5 年生存率は 90%以上と比較的予後は良いものの、一部に、抗アンドロゲン薬などの抗ホルモン療法に抵抗性を示し去勢抵抗性を獲得するものがある［2］。この様な前立腺がんはアンドロゲン非依存性に増殖し、近接組織への浸潤、遠隔臓器への転移も生じやすくなり、5 年生存率も 30%以下と極端に予後不良となる。したがって、前立腺がんにおいては、去勢抵抗性（アンドロゲン非依存性）となり悪性化した前立腺がんの病態メカニズムを解明し、効果的な治療法を開発することが重要な課題となっている。

我々はこれまでの研究により、細胞膜裏打ちタンパク質の一つストマチンが抗腫瘍作用を有することを明らかにした［3］。ストマチンの抗腫瘍作用として、ストマチンがタンパク質リン酸化酵素 PDPK1 の分解誘導を促進することで、PDPK1 下流のシグナル分子 Akt の活性化が抑制されて、細胞増殖能が低下すると共にアポトーシスが強く誘導されることを示した。ヒトサンプルを用いた検討では、ストマチン発現が少ないほど前立腺がんグリーソンスコアが高く、去勢抵抗性で悪性度が高く、術後の予後も不良であることも分かった。しかし、去勢抵抗性となり悪性化した前立腺がんで、なぜストマチンの発現が低下するのか、その機序については明らかになっていない。

本研究では、前立腺がんの悪性化に大きく関連するストマチンの発現制御機構について検討し、細胞表面分子 EphA3 とそのリガンド ephrin-A5 との結合がストマチン発現制御に深く関わっていることを見出した。さらに、その細胞内シグナル伝達機構についても知見が得られた。

## 方　法

### 1. 前立腺がん細胞

本研究では前立腺がん細胞として LNCaP 細胞を使用した。細胞培養には DMEM 培養液を使用し、10%ウシ胎児血清（FBS）培養液に添加した。LNCaP 細胞の増える速度について調べるため、1 ウェル当り 20,000 個の細胞を播いた後、2 日（48 時間）ごとに細胞数をカウントした。

### 2. ノックダウン、qPCR、ウェスタンブロッティング

EphA3、ephrin-A5、ストマチンをノックダウンするために次の siRNA 塩基配列を用いた。

EphA3：5’-GCCUGACACUAUAUACGUA-3’

ephrin-A5：5’-CCUCUACAUGGUGAACUUU-3’

ストマチン：5’-GGAGAUCCUCACAAAGGAU-3’

ストマチンの発現を調べる qPCR には、次のプライマーを使用した。また、コントロールとしてβ-アクチンまたは GAPDH の発現量と比較するため、次のプライマーを使用した。

ストマチン：Forward 5’-CAATTAGCGTGGATGGTGTG-3’、Reverse 5’-ACATCTCTGCTGCTCCCACT-3’

β-アクチン：Forward 5’-TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA-3’、Reverse 5’-GAGTCCTGTGGCATCCAC-3’

GAPDH：Forward 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'、Reverse 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'

ウェスタンブロッティングは一般的な方法で施行し、次の一次抗体を使用した。β-アクチンはローディングコントロールとして検出した。

Phospho-EphA3 [Tyr779] (D10H1)：ウサギモノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology 社、Cat No. #8862)

EphA3（D-2）：マウスモノクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology 社、Cat No. sc-514209）

β-アクチン（C4）：マウスモノクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology 社、Cat No. sc-47778）

### 3. C 末端欠損 EphA3 発現ベクター

EphA3 の C 末側にある細胞内リン酸化部位（aa 622～983）を欠失する cDNA は、pEGFP-N3 ベクターにクローニングした。この発現ベクターは大腸菌内で増やした後、精製し、Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific 社）によるエレクトロポレーション法によって LNCaP 細胞にトランスフェクションした。

### 4. JAK 阻害薬

最終濃度 1μmol/L の JAK Inhibitor I（Cayman Chemical 社、Cat No. #15146）を細胞培養液に 24 時間添加した後、細胞を回収して実験を行った。

## 結果および考察

### 1. 前立腺がん細胞間における EphA と ephrin-A との結合がストマチンの発現を抑制

集塊を形成するがん細胞では細胞間で様々な細胞表面分子が結合して相互作用している。細胞表面分子とストマチン発現との関連を、前立腺がん LNCaP 細胞を用いて調べたところ、LNCaP 細胞表面に発現する EphA3 とそのリガンドである ephrin-A5 との結合がストマチンの発現制御に重要であることが分かった。LNCaP 細胞において EphA3 または ephrin-A5 をそれぞれの遺伝子に対する siRNA を用いてノックダウンすると、ストマチンの発現が有意に増加した（図 1）。このことより、前立腺がん細胞間における EphA3 と ephrin-A5 との結合によってストマチンの発現が抑制されていると考えられた。

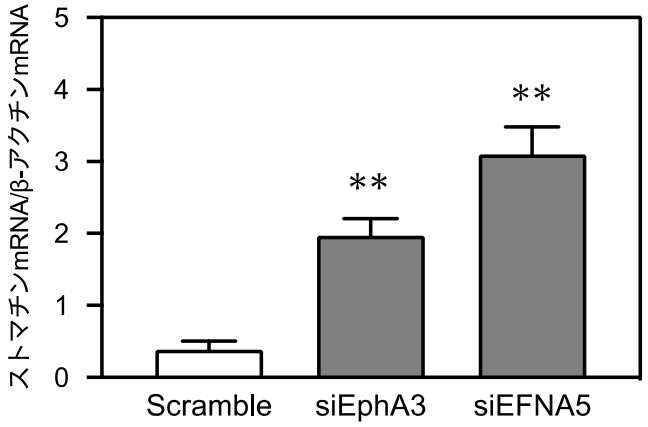



図 1.　LNCaP 細胞での EphA–ephrin-A 系によるストマチン発現制御

Scramble siRNA を導入したコントロール LNCaP 細胞、EphA3 をノックダウン（siEphA3）または ephrin-A5 をノックダウン（siEFNA5）した LNCaP 細胞から抽出した RNA を用いてストマチンの発現を qPCR で解析した。結果は平均±標準偏差で示す（n＝5）。群間比較は One-way ANOVA で行った（** $p<0.01$ vs. Scramble）。

**2. EphA–ephrin-A 系によるストマチン発現抑制は前立腺がん細胞の増殖を促進** EphA-ephrin-A 系とストマチンが、がんの悪性度と密接に関連するがん細胞増殖にどの様に関わっているかについて検討した。コントロール siRNA（Scramble）を入れた LNCaP 細胞では EphA3 と ephrin-A5 の結合があり、ストマチンの発現が抑制されているが、細胞を播いて 10 日後、細胞数は約 50 倍に増加した（図 2）。一方、EphA3 をノックダウン（siEphA3）してストマチンの発現を促進させると、細胞増殖は有意に抑制された。さらに EphA3 に加えてストマチンもノックダウン（siStomatin）すると EphA3 によって抑制されていた細胞増殖は回復した。

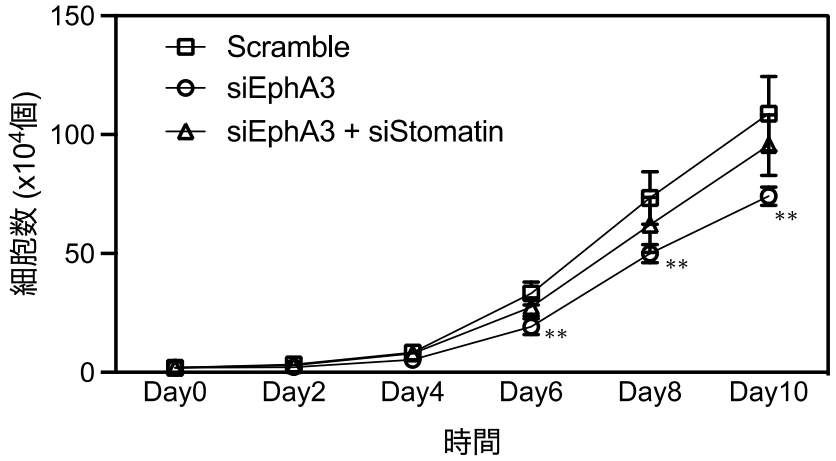



図 2. LNCaP 細胞増殖曲線

最初（Day0）に細胞を20,000個播いた後、2日ごとに細胞数をカウントした。結果は平均±標準偏差で示す。各群n=6。群間比較はTwo-way ANOVAで行った。

** $p<0.01$ vs. Scramble。

**3. 前立腺がん細胞でのストマチン発現制御には EphA3 によるシグナル伝達が関与**

EphA–ephrin-A 系がどの様にストマチン発現制御を行っているか、その詳細を調べるために、EphA3 の C 末端を欠失させた発現ベクターを作製した。EphA–ephrin-A 系において、ephrin-A はグルコシルホスファチジルイノシトール（GPI）を介して細胞膜表面に係留されている GPI アンカー型タンパク質である一方、EphA は 1 回膜貫通分子で細胞内領域を有するため、EphA と ephrin-A の結合による細胞内シグナル伝達は EphA が主に担っている。特に、EphA の細胞内領域にはチロシン残基が存在し、このチロシンがリン酸化されることで下流の分子にシグナル伝達を行う［4］。

このシグナル伝達に重要なチロシン残基を含む C 末端を欠失させた EphA3（GFP タグを付けている）を LNCaP 細胞に過剰発現させた（図 3a）。この時、隣接する LNCaP 細胞間で ephrin-A5 と結合する EphA3 は、確率的に内在性の EphA3 よりも C 末端を欠失させた外部より過剰発現させた EphA3 の方が多くなるため、単に GFP を発現させたコントロール LNCaP 細胞と比較して、EphA3 のリン酸化の度合いは大きく減少した（図 3a）。すなわち、C 末端を欠失させた EphA3 の過剰発現により、EphA–ephrin-A 系における EphA3 を介した細胞内シグナル伝達が強く抑制されたことになる。この時、ストマチンの発現を調べると、C 末端を欠失させた EphA3 を過剰発現させた LNCaP 細胞では、GFP を発現させたコントロール LNCaP 細胞と比較して、ストマチンの発現量が大きく増加していた（図 3b）。

次に、EphA の細胞内下流シグナル分子として知られている JAK に着目した［5］。LNCaP 細胞で EphA3 をノックダウンすると **1** で述べたように、ストマチンの発現が有意に増加したが、JAK 阻害薬をこのノックダウン細胞に投与するとストマチンの発現増加は阻止された（図 4）。このことは、EphA–ephrin-A 間の相互作用により JAK の作用が抑制されてストマチンの発現が抑制されているが、EphA–ephrin-A 間の相互作用がなくなると JAK が活性化してストマチンの発現増加に寄与していると考えられた。

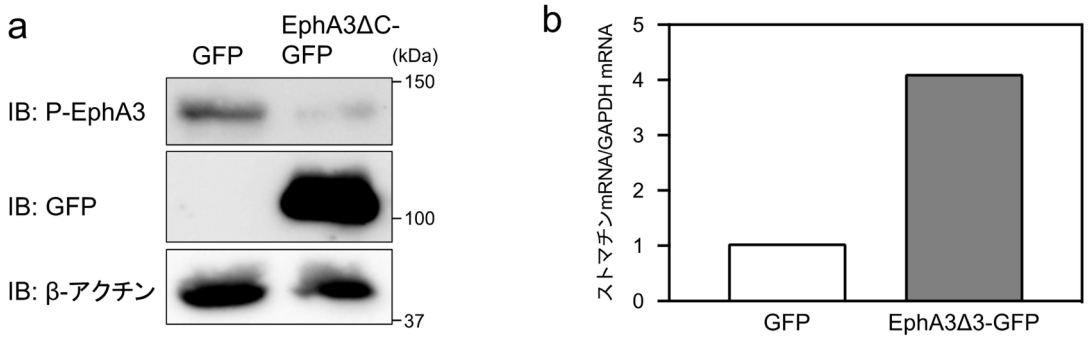



図 3. LNCaP 細胞への C 末端欠失 EphA3 過剰発現によるストマチン発現促進

a) リン酸化 EphA3 (P-EphA3)、EphA3ΔC-GFP の発現をウェスタンブロッティングで検出。β-アクチンはローディングコントロールとして使用。

b) qPCR によるストマチン発現の解析（各群 n＝1)。

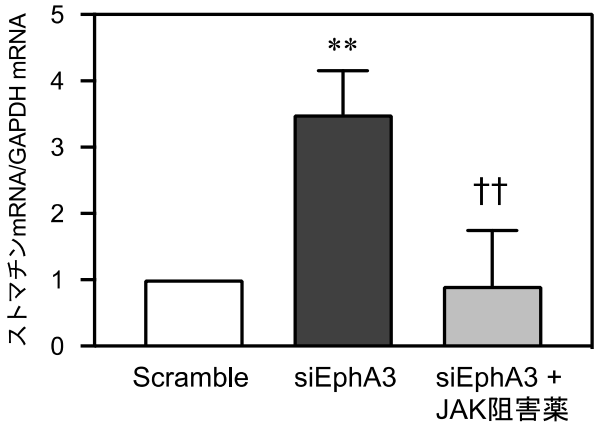



図 4. LNCaP 細胞でのストマチン発現制御における JAK の関与

コントロール（Scramble)、EphA3 ノックダウン（siEphA3）および EphA3 ノックダウンして JAK 阻害薬を添加した場合のストマチン発現量を qPCR で解析した。結果は平均±標準偏差で示す（各群 n＝3)。群間比較は One-way ANOVA で行った（** $p<0.01$ vs. Scramble、†† $p<0.01$ vs. siEphA3)。

以上より、去勢抵抗性となり悪性化したがん細胞で見られるがん細胞増殖にストマチンが関わっていることと、その発現メカニズムについて明らかにすることができた。現在、悪性度の異なるがん細胞でのストマチン発現制御機構、マウスを用いた *in vivo* 実験を継続しており、さらなる展開が期待できる。

## 共同研究者・謝辞

本研究の一部は、滋賀医科大学生化学・分子生物学講座分子病態生化学部門のスタッフ、大学院生の協力を得て行われたものであり、この場を借りて協力頂いた方々に感謝を申し上げる。

## 文　献


1) 国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」（全国がん登録）

2) Kitagawa Y, Ueno S, Konaka H, Mizokami A, Hinotsu S, Akaza H, Namiki M. Experience with androgen deprivation therapy for prostate cancer in Japan and future perspectives. Curr Cancer Drug Targets. 2015;15(4):314-26. PMID: 26003144 doi: 10.2174/1568009615041505181127 20.

3) Rahman NIA, Sato A, Tsevelnorov K, Shimizu A, Komeno M, Ahmat Amin MKB, Molla MR, Soh JEC, Nguyen LKC, Wada A, Kawauchi A, Ogita H. Stomatin-Mediated Inhibition of the Akt Signaling Axis Suppresses Tumor Growth. Cancer Res. 2021 May 1;81(9):2318-2331. PMID: 33757977 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-2331.

4) Kania A, Klein R. Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2016 Apr;17(4):240-56. PMID: 26790531 doi: 10.1038/nrm.2015.16.

5) Lai KO, Chen Y, Po HM, Lok KC, Gong K, Ip NY. Identification of the Jak/Stat proteins as novel downstream targets of EphA4 signaling in muscle: implications in the regulation of acetylcholinesterase expression. J Biol Chem. 2004 Apr 2;279(14):13383-92. PMID: 14729671 doi: 10.1074/jbc.M313356200.