

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590320

研究課題名（和文） ホルモン不応性前立腺癌の分子標的治療に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Fundamental research on target therapies for hormone-resistant prostate cancer

研究代表者

唐 小燕 (Tang Xiaoyan)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：20326036

研究成果の概要(和文):ソマトスタチンはヒト体内で細胞の機能を抑制するホルモンで、また、ソマトスタチンアナログ製剤は、ソマトスタチン受容体 SSTR 2a 陽性腫瘍に有効な治療法である。今回の研究は、前立腺癌細胞が男性ホルモン非存在環境下において、特定の誘導因子によって、ソマトスタチンの受容体(SSTRs mRNA) が誘導されることを証明した。ホルモン治療後、残存する男性ホルモン不応性前立腺癌に対して、ソマトスタチンアナログ製剤による分子標的治療法の可能性が期待される。

研究成果の概要(英文): Somatostatins are a family of cyclopeptides that act as inhibitors of various secretory processes and cell proliferation, by binding to somatostatin receptors on target cells. Somatostatin peptide agonists were introduced into clinical practice for the treatment of hormone-secreting pituitary adenomas and gastroenteropancreatic (GEP) tumours. In this study, we revealed that somatostatin receptor mRNA expression of prostate cancer cell lines can be up-regulated by DNA methylation inhibitor (5'-aza, decitabine) and histone deacetylase inhibitor (TSA), especially when we incubated those prostate cancer cells in an androgen - free medium (charcoal filtrated serum). The results suggest that somatostatin peptide agonists may be a new treatment for hormone-resistant prostate cancer patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：前立腺癌、ホルモン治療、ソマトスタチン

1. 研究開始当初の背景

ホルモン療法は前立腺癌に対する有効な治療法である。しかし、長期間男性ホルモン非存在下の環境に置かれた癌細胞は、神経内分泌 (NE) 細胞型、基底細胞型の細胞へと分化し、男性ホルモン非感受性癌となることが判っている。われわれも、長期間ホルモン治療を受けた前立腺癌症例の NE-細胞の増加を報告したことがある (*Mod Pathol*, 2004, 17:1794)。前立腺癌 NE-細胞の陽性細胞数の率は、前立腺癌の分化度、予後、臨床・病理学的ステージに正に相関し、また、一部の NE-細胞は、ソマトスタチン (SO) を分泌すると同時に、ソマトスタチン受容体 (SSTR) を発現する。このような男性ホルモン非感受性となった神経内分泌細胞型、基底細胞型の腫瘍細胞に対する有効な治療法がなく、現在、新たな治療法の開発が危急の課題となっている。

ソマトスタチンはヒト体内で細胞の機能を抑制するホルモンで、また、ソマトスタチンアナログ製剤は、ソマトスタチン受容体 SSTR 2a 陽性腫瘍に有効な治療法である。我々は、以前、SSTR2a は一部の前立腺癌細胞に陽性で、前立腺癌の予後および転移予測因子である可能性を指摘した (*Inter J of oncol* 2010, 37: 1077-1083)。一方メチル化阻害・抑制剤による SSTR1-5 の発現誘導も報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、前立腺癌治療標的分子の探索、とくにホルモン非感受性前立腺癌細胞に対する新しい治療戦略の可能性を探索することを目的とした。具体的には、長期間のホルモン療法後ホルモン不応性となり再発・転移した前立腺癌を対象として、メチル化阻害・抑制剤およびソマトスタチンアナログ製剤

が男性ホルモン不応性前立腺癌の治療薬となる可能性の探索を目的とした。

3. 研究の方法

ヒト男性ホルモン不応性前立腺癌培養細胞株 PC3 と DU145 および男性ホルモン依存前立腺癌培養細胞 LNCap を 24 時間培養後、以下の実験を行った。

- (1) 男性ホルモン不応性前立腺癌培養細胞 PC3 および DU145、男性ホルモン感受性前立腺癌培養細胞 LNCap を DMEM (Invitrogen) 培地 (10% fetal bovine serum+2mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin, 37°C・5% CO₂/ 95% Air) にて培養 (LNCap-N) 後、DNA メチル化阻害剤 (5'-aza)、脱アセチル化抑制剤 (TSA) による前立腺癌細胞 SSTRs の発現誘導を行い、最後に、前立腺癌細胞を収集し、Total RNA を抽出し、real-time RT-PCR により SSTR mRNA の定量を行った。
- (2) 前立腺癌細胞 (PC3, DU145, LNCap-N) にソマトスタチンアナログ製剤 Sandostatin (10⁻⁴M) を投入し、SSTRs の発現誘導を行い、最後に、前立腺癌細胞を収集し、Total RNA を抽出し、real-time RT-PCR により SSTRs mRNA の定量を行った。
- (3) 男性ホルモン感受性前立腺癌培養細胞 LNCap を男性ホルモン除外培地にて 20 回継代培養し (CHARCOAL STRIPPED FETAL BOVINE SERUM, BIOLOGICAL INDUSTRIES) (LNCap CF)、以上の 1) および 2) の細胞と同様な誘導実験を行い、real-time RT-PCR により SSTRs mRNA の定量を行った。
- (4) CellTiter96 Assay (Promega) による、LNCap-N 細胞および LNCap-CF 細胞の増

殖能を測定した。

- (5) ホルモン療法後前立腺摘出術を受けたヒト前立腺癌症例 40 例を選出し、それらの症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片に対して SSTR1 (Gramsch lab), SSTR2 (abcam), SSTR4 (GeneTex) の免疫組織化学を行った。

4. 研究成果

(1) 研究結果：

- ① PC3 は、SSTR1-4mRNA の増加 (p=0.007)、DU145 は、SSTR1-5mRNA の増加 (p=0.007)、LNCap N は、SSTR3-5mRNA の増加 (p=0.050) が認められた (図 1&2)。

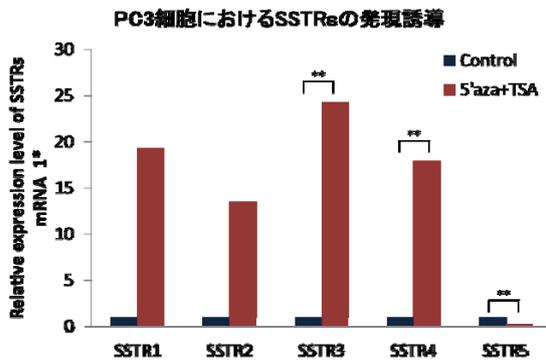


図 2. 5'-aza0.25 μ M + TSA1.0 μ M による PC3 前立腺癌細胞における SSTR1-5 の発現誘導。
① : (5' aza+TSA 投与 PC3 細胞の SSTRs/SN18s) / (control PC3 細胞の SSTR3/SN18s)

** : p=0.007

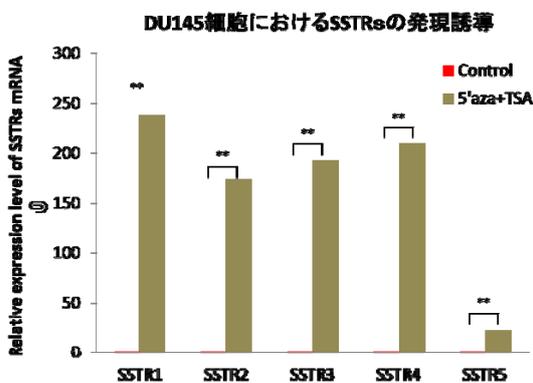


図 3. 5'-aza0.25 μ M + TSA1.0 μ M による DU145 前立腺癌細胞における SSTR1-5 の発現誘導。

① : (5' aza+TSA 投与 PC3 細胞の SSTRs/SN18s) / (control PC3 細胞の SSTR3/SN18s)

** : p=0.007

- ② ソマトスタチンアナログ製剤 Sandostatin による SSTR3 の発現誘導では、いずれの細胞に於いても認められなかった。
- ③ 男性ホルモン除外培地にて培養した LNCap CF 細胞 SSTR1-5mRNA はいずれも増加し (p=0.050)、さらに、その増加は SSTR1, 2, 4mRNA において、通常血清培地で培養した LNCap N 細胞よりも著しく増加した (p=0.050) (図 3)。

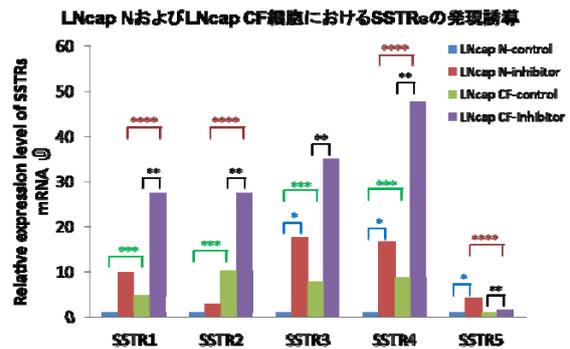


図 3. LNCap N および LNCap CF 前立腺癌細胞 SSTR1-5 の比較。5'-aza0.25 μ M + TSA1.0 μ M による LNCap N および LNCap CF 前立腺癌細胞における SSTR1-5 の発現誘導の比較。

Inhibitor: 5'-aza0.25 μ M + TSA1.0 μ M)。

① : (5' aza+TSA 投与 PC3 細胞の SSTRs/SN18s) / (control PC3 細胞の SSTR3/SN18s)

* ; LNCap N-control および LNCap N-inhibitor 細胞における SSTRs 発現誘導の比較、p=0.05。

** ; LNCap CF-control および LNCap CF-inhibitor 細胞における SSTRs 発現誘導の比較、p=0.05。

*** ; LNCap N-control および LNCap CF-control 細胞 SSTRs の比較。SSTR1, 3 p=0.006, SSTR2 p=0.004, SSTR4 p=0.002。

**** ; LNCap N-inhibitor および LNCap CF-inhibitor 細胞における SSTRs 発現誘導の比較、p=0.05。

増殖能は、LNCap CF 細胞が LNCap N 細胞より低下していた(図 4)。

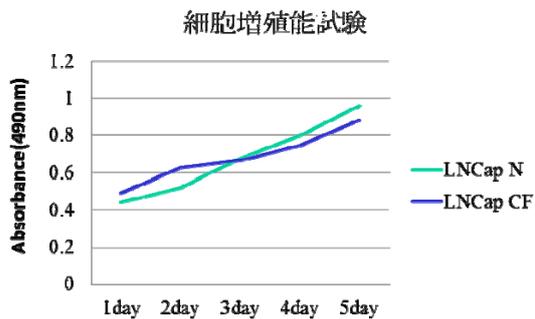


図 4. LNCap N および LNCap CF 前立腺癌細胞の増殖能試験。CellTiter96 Assay。

- ⑤ ホルモン療法後前立腺摘出術を受けた前立腺癌症例において、SSTR1, 2, 4 の免疫組織化学はそれぞれ、55%, 25%, 25% の陽性例が認められた(図 5)。特に、SSTR2 では、ホルモン療法非施行例(13%)に比べて、明らかに増加した。

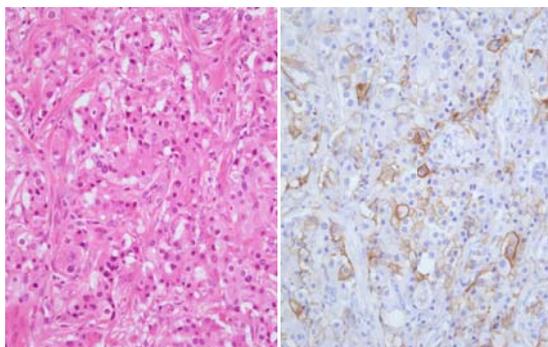


図 1. ヒト前立腺癌、ホルモン療法後前立腺摘出症例。左：残存する癌細胞；右 SSTR2 の免疫組織化学。癌細胞の膜に陽性像が認められた。

(2) 研究結果に関する考察：

我々は、これまで前立腺癌のホルモン治療によって癌の細胞生物的特性が変化することに着目し研究を続けてきた。本実験のパイロット試験の結果では、ヒト前立腺癌症例において、ホルモン療法後、ホルモン非感受性となった前立腺癌の SSTR2a 発現率は、

未治療群に比較して有意に高い($p < 0.001$)ことが判明され、さらに、今回の追加免疫組織化学試験でも類似の結果を得られた。

前立腺癌の培養細胞は、DNA メチル化阻害剤(5'-aza)および脱アセチル化酵素阻害剤(TSA)の刺激によって、SSTRs mRNA の増加が認められた。その増加は、長期間男性ホルモン除外培地にて培養した LNCap CF 細胞により強く認められた。

5'-aza および TSA によるホルモン治療後、残存する男性ホルモン不応性前立腺癌における SSTRs の発現誘導は可能で、この人為的に発現させた SSTRs を標的としたソマトスタチンアナログ製剤による分子標的治療の可能性があり、また、男性ホルモン不応性前立腺癌では SSTRs の発現誘導がかかっている可能性があり、特に発現誘導をしなくてもソマトスタチンアナログ製剤に感受性を示すことも期待される。

今後、さらに、動物実験によるソマトスタチンアナログ製剤が前立腺癌増殖抑制・転移抑制に有効であることを証明できれば、ホルモン非感受性前立腺癌治療の新しい治療法の開発にもつながると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Endoh K, Nishi M, Ishiguro H, Uemura H, Miyagi Y, Aoki I, Hirano H, Kubota Y, Ryo A. Identification of phosphorylated proteins involved in the oncogenesis of prostate cancer via Pin1-proteomic analysis. *Prostate* 72(6):626-37, 2012. (査読有)
2. Miyagi Y, Harada M. Overview of the prostate cancer pathology. *Nihon*

- Rinsho 69 Suppl 5:25-30, 2011. (査読有)
3. Tang XY, Takekoshi S, Itoh J, Umemura S, Shoji S, Terachi T, Osamura RY: Somatostatin analogue inhibits the mobility of prostate carcinoma cells: A new therapeutic method for advanced prostate carcinoma. International Journal of Oncology 37: 1077-1083, 2010. (査読有)
 4. Shoji S, Tang XY, Sato H, Usui Y, Uchida T, Terachi T: Metastin has Potential as a Suitable Biomarker and Novel Effective Therapy for Cancer Metastasis. Oncology Letters 1: 783-788, 2010. (査読有)
 5. Tang XY, Umemura S, Tsukamoto H, Kumaki N, Tokuda Y, Osamura RY: Overexpression of fatty acid binding protein-7 correlates with basal-like subtype cancer. Pathology-research and practice 206: 98-101, 2010. (査読有)
 6. Miyagi Y, Sasaki T, Fujinami K, Sano J, Senga Y, Miura T, Kameda Y, Sakuma Y, Nakamura Y, Harada M, Tsuchiya E. ETS family-associated gene fusions in Japanese prostate cancer: analysis of 194 radical prostatectomy samples. Mod Pathol 23(11):1492-8, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. 唐 小燕、中村 圭靖、宮城 洋平、増田 しのぶ. メチル化阻害・抑制剤およびソマトスタチンアナログ製剤によるホルモン不応性前立腺癌細胞に於けるSSTR1-5の発現誘導. 101回病理学会総会、東京、2012.4.26.
2. 三浦猛, 森山正敏, 池田伊知郎, 猿木信裕, 山本浩史, 今泉明, 光島徹, 山門實, 宮城 洋平. 血漿遊離アミノ酸プロファイルに

基づく新規マーカー, アミノインデックスによる前立腺がんのスクリーニング. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪. 2010.9.24

3. 唐 小燕, 梅村しのぶ, 竹腰 進: SSTR2a をターゲットとする前立腺癌の分子標的治療に関する基礎的研究. 第99回日本病理学会総会, 東京, 2010.4. 27

6. 研究組織

(1)研究代表者

唐 小燕 (Tang Xiaoyan)
 日本大学・医学部・助教
 研究者番号：20326036

(2)連携研究者

増田 しのぶ (Masuda shinobu)
 日本大学・医学部・教授
 研究者番号：20276794

竹腰 進 (Takekoshi Susumu)
 東海大学医学部・病態病理学・准教授
 研究者番号：70216878

長村 義之 (Osamura Yoshiyuki)
 国際医療福祉大学・病理学・教授
 研究者番号：10199882

宮城 洋平 (Miyagi Youhei)
 地方独立行政法人神奈川県立病院機構
 神奈川県立がんセンター臨床研究所分子病態学部
 研究者番号：00254194