

令和元年5月23日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08717

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌に対するARBの治療効果およびその分子メカニズム解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of therapeutic effects of angiotensin II type I receptor blocker against castration resistant prostate cancer

研究代表者

高橋 智 (Takahashi, Satoru)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60254281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は降圧剤であるアンギオテンシンII受容体阻害剤(ARB)がラット前立腺癌に対して増殖・進展抑制効果を示すことを見出すとともに臨床介入試験によりヒト前立腺癌症例における術後PSA再発を有意に遅延することを明らかにした。そこで我々は去勢抵抗性癌などの進行性前立腺癌に対するARBの効果について検討した。前立腺浸潤癌発生に対してARBの1つであるカンデサルタンを投与した結果、側葉浸潤癌の発生個数および腺房当たりの発生率はいずれも有意に減少した。また、カンデサルタンの転移に対する効果を検討したところ、骨転移の発生頻度に有意差はなかったものの骨転移巣の大きさに減少傾向が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンデサルタン投与により前立腺癌骨転移の発生頻度に対して効果はみられなかったものの骨転移病巣における癌細胞増殖に対しては抑制傾向が観察された。ヒト前立腺癌において、骨転移巣における癌細胞増殖の制御は骨痛による日常生活動作(Activity of Daily Living, ADL)低下を防ぐ観点から有益な実験結果であり、今後はカンデサルタンが骨内における癌細胞増殖を制御しているメカニズムを解明することが急務な課題であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that the angiotensin II receptor blocker (ARB), antihypertensive drug, exerted a suppression effects on the growth and progression of rat prostate cancer, and the clinical intervention study revealed that PSA progression was significantly prolonged in prostate cancer patients given an ARB compared with placebo control. Therefore, we examined the effect of ARB on advanced prostate cancer such as castration resistant cancer. We demonstrated that candesartan significantly attenuated both the number and incidence rate per acinus invasive carcinoma development in lateral lobe of rats. Additionally, candesartan administration tended to decrease in size of metastatic lesion in the bone of prostate cancer although there was no significant difference in the incidence of bone metastasis.

研究分野：実験病理学

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 アンギオテンシン受容体阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) 誘発ラット前立腺癌モデルを用いて長年にわたって前立腺癌の進展に関わる諸要因、化学予防物質の探求を行ってきたが、このモデルでは実験期間が 60 週を要することから多数の物質を効率よく検証するにはやや難点があった。そこで早期にかつ高頻度の前立腺癌を発生できる前立腺癌好発トランスジェニックラット (Transgenic Rat for Adenocarcinoma of the Prostate, TRAP) を樹立した⁽¹⁾。前立腺では 15 週齢時点ではほぼ全例に非浸潤性前立腺癌が認められる。これらの腺癌はアンドロゲン依存性であり、去勢により完全退縮するなど初期のヒト前立腺癌に極めて類似した形質を示しており、ヒト前立腺癌の発生・進展、さらには食事要因を含めた環境物質の前立腺癌に対する修飾効果を検討するのに適した疾患モデルであると考えられる。そこで我々は、前立腺癌化学予防候補物質の in vivo スクリーニングを TRAP ラットで行い、予防効果のある物質を多数見出してきた⁽²⁻⁶⁾。

2. 研究の目的

我々は降圧剤であるアンギオテンシン II 受容体 1 型阻害剤 (ARB) が TRAP ラット前立腺癌に対して増殖・進展抑制効果を示すことを見出すとともに臨床介入試験によりヒト前立腺癌症例における術後 PSA 再発を有意に遅延することを明らかにした⁽⁷⁾。このような ARB の効果はプロテアソーム活性化による AR タンパク発現抑制、エストロゲン受容体 α 発現増加および p38 MAPK 不活性化によるアポトーシスの促進を介したものであるが、これらの知見は去勢感受性前立腺癌に対するものである。そこで我々は去勢抵抗性癌などの進行性前立腺癌に対する ARB の効果について、我々が樹立した種々のラット前立腺癌モデルを用いて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) TRAP 浸潤癌モデル

6 週齢 TRAP ラット雄を 4 群に分け、いずれの群においてもプロピオン酸テストステロン (Testosterone propionate, TP, 40 mg in Silastic tube) を断続的に 3 回背部皮下投与 (実験 0-3 週、5-8 週、10-15 週、休薬期間それぞれ 2 週間) し、1,2 群にはカンデサルタンをそれぞれ 1 あるいは 2 mg/kg/day (ヒト投与量の約 1 あるいは 2 倍の濃度)、3 群にはアンギオテンシン II 受容体 2 型作動薬である C21 を 2 mg/kg/day で持続投与 (15 週間飲料水投与) を行った。4 群は対照群とした。21 週齢で全動物を屠殺剖検した。

(2) PCai1 移植モデル

In vivo イメージングにより転移病巣の解析を実施するため、最初にルシフェラーゼ発現ベクター (pGL4.51[luc2/CMV/neo]vector) を Lipofectamine を用いて PCai1 細胞に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ安定発現 PCai1 細胞株の樹立を行った。その後、精巣摘出した 8 週齢雄ヌードマウスに 3×10^6 個の PCai1-luc 細胞を経尾静脈移植し、接種後 1 週、8 週でルシフェリンを用いた転移巣検出を試みた。また、前立腺腹葉内に 2×10^6 個の PCai1-luc 細胞を 50% マトリゲルにて移植後 8 週に in vivo イメージングを行った後に屠殺剖検した。前立腺・肺・腎・大動脈周囲リンパ節をホルマリン固定し、前立腺腫瘍体積を測定、HE 標本にて周囲組織浸潤、転移の有無を比較検討した。

4. 研究成果

(1) TRAP 浸潤癌モデルによる解析

側葉前立腺における浸潤癌発生個数は対照群 2.7 個に対し C21、カンデサルタン 1 あるいは 2 mg/kg/day 投与群でそれぞれ 1.7 個、1.6 個、1.2 個、側葉前立腺全腺房数で補正した浸潤癌発生率は対照群 1.8% に対し C21、カンデサルタン 1 あるいは 2 mg/kg/day 投与群でそれぞれ 1.4%、0.7%、0.6% であり、いずれも群間で有意な差はみられなかった。しかしながら対照群における浸潤癌発生数が低いこと、カンデサルタン投与群で浸潤癌発生抑制傾向がみられたことから高濃度カンデサルタン投与群のみについて追加実験を行い、再検証を行った。その結果、側葉における浸潤癌発生個数は対照群 4.2 個であるのに対し、カンデサルタン 2 mg/kg/day 投与群では 1.5 個であり、カンデサルタン投与により浸潤癌発生が有意に抑制された。また、全腺房数で補正後の浸潤癌発生率は対照群、カンデサルタン投与群でそれぞれ 2.2%、0.7% であり、発生個数と同様に有意な減少が観察された。

(2) PCai1 移植モデルによる解析

リングクローニングにより PCai1-luc-#15-1 および PCai1-luc-#5-1 細胞の 2 株を樹立し、ルシフェラーゼ発現量が高い PCai1-luc-#15-1 を移植モデル使用した。 3×10^6 個の PCai1-luc-#15-1 を去勢したヌードマウス 17 匹に経尾静脈移植し、接種後 1 週、8 週でルシフェリンを用いて転移巣検出を試みたが、いずれの個体にも *in vivo* イメージングでは転移巣は観察されず、解剖を行って全身検索をしたが転移病巣は確認できなかった。このことから PCai1-luc-#15-1 は親株の PCai1 とは異なり、転移能を喪失していることが判明した。そのため、もう一つのルシフェラーゼ安定発現株である PCai1-luc-#5-1 を用いて再検討を行った。10 匹のヌードマウスに 2.5×10^6 個の細胞を用いて経尾静脈移植、2 匹のヌードマウスに 1×10^6 個の細胞を用いて皮下移植を行った結果、経尾静脈移植を行った個体では、5 匹にリンパ節転移、4 匹に肺転移が検出された。一方、皮下移植した 2 個体ではいずれも腫瘍は生着し、移植後 14 週の時点で腋窩リンパ節への転移を観察した。そこで、転移能が確認された PCai1-luc-#5-1 細胞を用いて再度経尾静脈移植および皮下移植モデル実験を実施した。経尾静脈移植後 16 週時点における肺転移は、対照群、カンデサルタン群でそれぞれ 14/30 例(47%)、17/32 例(53%)、骨転移はそれぞれ 2/30 例(7%)、5/32 例(16%) であり、有意差はみられなかった。一方、腫瘍の大きさの指標となる発光量は肺転移巣では対照群、カンデサルタン群でそれぞれ 10.3 ± 10.1 、 9.0 ± 6.6 (10^6 photons/sec) とほぼ同等の値を示したのに対し、骨転移巣ではそれぞれ 4.3 ± 2.1 、 1.5 ± 1.1 (10^8 photons/sec) であり、有意差はなかったもののカンデサルタンにより減少傾向が観察された。背部皮下移植実験では、移植後 6 週時点における腫瘍体積は対照群(n=10)、カンデサルタン群(n=10)でそれぞれ 258.9 ± 122.9 、 143.9 ± 70.9 (mm^3) であり、カンデサルタンにより有意に減少していた。ルシフェリンを用いた発光量ではそれぞれ 16.2 ± 10.5 、 11.5 ± 7.1 (10^7 photons/sec) であり、減少傾向はあるものの有意差はみられなかった。リンパ節転移はそれぞれ 7/10 例(70%)、6/10 例(60%)、発光量ではそれぞれ 0.42 ± 0.47 、 1.35 ± 2.28 (10^7 photons/sec) であり、群間で有意差は観察されなかった。

カンデサルタン投与により前立腺癌における局所浸潤・増殖は抑制されたものの遠隔転移に対する抑制効果はみられなかった。しかしながら骨転移においては *in vivo* イメージングにより転移病巣における増殖抑制傾向が観察された。このことは全身骨転移を来した進行性前立腺癌患者にカンデサルタンを投与することにより日常生活動作 (Activity of Daily Living, ADL) が劇的に改善し、寝たきり状態から歩行ができるまで改善したという症例報告 (Yamagishi, T. et al, J Urol, 173:441, 2005.) を反映する結果であると考えられる。これらの結果はヒト前立腺癌の骨転移巣における癌細胞増殖の制御は骨痛による ADL 低下を防ぐ観点から有

益な知見であり、今後はカンデサルタンが骨内における癌細胞増殖を制御しているメカニズムを解明することは急務な課題と考える。

<引用文献>

- (1) Asamoto, M., Takahashi, S., et al.: Prostate carcinomas developing in transgenic rats with SV40 T antigen expression under probasin promoter control are strictly androgen dependent. *Cancer Res*, 61: 4693-4700, 2001.
- (2) Tang, M., Takahashi, S., et al.: Protective effects of citrus nobiletin and auraptene in transgenic rats developing adenocarcinoma of the prostate (TRAP) and human prostate carcinoma cells. *Cancer Sci*, 98: 471-477, 2007.
- (3) Seeni, A., Takahashi, S., et al.: Suppression of prostate cancer growth by resveratrol in the transgenic rat for adenocarcinoma of prostate (TRAP) model. *Asian Pac J Cancer Prev*, 9: 7-14, 2008.
- (4) Takahashi, S., et al.: Suppression of prostate cancer in a transgenic rat model via γ -tocopherol activation of caspase signaling. *Prostate*, 69: 644-651, 2009.
- (5) Long, N., Takahashi, S., et al: Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. *Cancer Sci*, 104: 298-303, 2013.
- (6) Suzuki, S., Takahashi, S., et al: Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Cancer Sci*, 104: 1711-1717, 2013.
- (7) Takahashi, S., et al.: Therapeutic targeting of angiotensin II receptor type 1 to regulate androgen receptor in prostate cancer. *Prostate*, 72: 1559-1572, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

- (1) Etani T, Takahashi S. et al (査読あり、総勢12名中12番目): NCL1, a highly selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, suppresses castration-resistant prostate cancer growth via regulation of apoptosis and autophagy. *J Clin Med*, 8:E442, 2019. (doi:10.3390/jcm8040442)
- (2) Mapoung S, Takahashi S. (Corresponding author) et al (査読あり、総勢9名中8番目): Cyclohexanone curcumin analogs inhibit the progression of castration resistance prostate cancer in vitro and in vivo. *Cancer Sci*, 110:596-607, 2019. (doi:10.1111/cas.13897)
- (3) Suzuki S, Takahashi S. et al (査読あり、総勢7名中7番目): Early detection of prostate carcinogenesis by immunohistochemistry of HMGB2. *J Toxicol Sci*, 43:359-367, 2018. (doi:10.2131/jts.43.359)
- (4) Ito Y, Takahashi S. (Corresponding author) et al (査読あり、総勢8名中7番目): Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by down-regulation of androgen receptor. *Oncotarget*, 9:13859-13869, 2018. (doi:10.18632/oncotarget.24492)
- (5) 上村博司、高橋智、他 (査読なし、総勢7名中7番目): アンジオテンシン2レセプターアゴニストのアンドロゲン受容体発現抑制による前立腺癌の化学予防効果. *泌尿器外科*, 30: 1221-1224, 2017.

- (6) 鈴木周五、高橋智、他 (査読なし、総勢5名中5番目): 前立腺発癌と炎症、別冊B10 Clinica、5巻、84-88, 2016.
- (7) Suzuki S, Takahashi S. et al (査読あり、総勢9名中9番目): Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Int J Mol Sci*, 17:2071, 2016. (doi:10.3390/ijms17122071)
- (8) Sato S, Takahashi S.(Corresponding author) et al (査読あり、総勢 10 名中 9 番目): Histone deacetylase inhibition in prostate cancer triggers miR-320-mediated suppression of the androgen receptor. *Cancer Res*, 76:4192-4204, 2016. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3339)
- (9) Kuno T, Takahashi S. et al (査読あり、総勢 9 名中 9 番目): Preventive effects of fermented brown rice and rice bran against prostate carcinogenesis in TRAP rats. *Nutrients*, 8:421, 2016. (doi:10.3390/nu8070421)

〔学会発表〕(計 21 件)

- (1) 内木綾、高橋智、他、Luteolin の去勢抵抗性前立腺癌に対する抑制効果と androgen receptor splice variant の役割、第 35 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2019 年.
- (2) 久保絵美、高橋智、他、過剰なアンドロゲン曝露は前立腺における異常な DNA メチル化を誘導する、第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年.
- (3) Mapoung S, Takahashi S. et al, A synthetic cyclohexanone curcumin analog, BHMBBC, inhibits the progression of castration-resistance prostate cancer. 第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年.
- (4) Uemura H, Takahashi S. et al. Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by the downregulation of the androgen receptor. AACR Annual Meeting 2018, Chicago, USA, 2018.
- (5) 鈴木周五、高橋智、他、前立腺発がん物質の早期検出モデルの確立、シンポジウム 1「発がんリスク評価法」、第 34 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2018 年.
- (6) 鈴木周五、高橋智、他、前立腺発がん物質早期検出のためのマーカーおよびラットモデルの確立、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年.
- (7) Mapoung S, Takahashi S. et al. Dehydrozingerone, a Curcumin analog, inhibits prostate cancer growth in vivo, 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年.
- (8) 高橋智、他、前立腺がん化学予防剤開発における問題点と推進方策、シンポジウム 2「がん予防基礎研究の検証と出口戦略」、がん予防学術大会 2017 大阪、2017 年.
- (9) 内木綾、高橋智、他、Angiotensin II receptor type 2 アゴニストによるラット前立腺発がん化学予防効果、第 106 回日本病理学会総会、2017 年.
- (10) 鈴木周五、高橋智、他、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第 106 回日本病理学会総会、2017 年.
- (11) 加藤寛之、高橋智、他、免疫応答動物に対する前立腺癌細胞株の同種同所移植の検討、第 33 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2017 年
- (12) 内木綾、高橋智、他、ラット前立腺発がんに対する angiotensin II receptor type 2 アゴニストの化学予防効果、第 33 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2017 年.

- (13) 上村博司、高橋智、他、アンジオテンシン 2 レセプターアゴニストのアンドロゲン受容体発現抑制による前立腺癌の化学予防効果、第 32 回前立腺シンポジウム、2016 年。
- (14) 内木綾、高橋智、他、去勢抵抗性前立腺癌に対するルテオリンの治療効果、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年。
- (15) 恵谷俊紀、高橋智、他、新規ヒストン脱メチル化酵素阻害剤とオートファジー阻害剤の去勢抵抗性前立腺癌への治療効果、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年。
- (16) 加藤寛之、高橋智、他、前立腺癌細胞株の同種同所移植モデルの確立、第 75 回日本学会学術総会、2016 年。
- (17) 鈴木周五、高橋智、他、Pioglitazone によるラット前立腺発癌抑制効果、がん予防学術大会 2016 名古屋、2016 年。
- (18) 佐藤慎哉、高橋智、他、HDAC 阻害剤 OBP-801 の miRNA 発現制御を介した前立腺癌の増殖抑制機構の解明、第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 14 日、仙台。
- (19) 内木綾、高橋智、他、去勢抵抗性前立腺癌に対する luteolin の治療効果、第 105 回日本病理学会総会、2016 年。
- (20) Naiki T, Takahashi S. et al. Luteolin has therapeutic potential through the regulation of oxidative stress in castration-resistant prostate cancer. AUA Annual Meeting 2016, San Diego, USA, 2016.
- (21) Sato S, Takahashi S. et al. Inhibition of histone deacetylase induces miR-329-mediated androgen receptor suppression in prostate cancer. AACR 107th Annual Meeting 2016, New Orleans, USA, 2016.

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 高橋智、鈴木周五、佐藤慎哉、内木綾、久野壽也：前立腺がん化学予防の現状、菅原隆 編，次世代のがん治療薬・診断のための研究開発、技術情報協会、pp27-31，2016。

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学ホームページ URL :

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/patho1.dir/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。