

令和元年6月18日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11012

研究課題名(和文) 癌間質浸潤細胞におけるPGE2受容体を標的にした去勢抵抗性前立腺癌治療の検討

研究課題名(英文) A study for treatment of castration-resistant prostate cancer targeting PGE2 receptors in cancer associated stromal cells

研究代表者

酒井 英樹 (SAKAI, Hideki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：40235122

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)：去勢抵抗性前立腺癌におけるプロスタグランジンE2 (PGE2) の病理学的意義は不明な点が多いため、ホルモン感受性および去勢抵抗性癌におけるPGE2受容体 (EP1-4R) の発現を検討した。EP1R、EP2RおよびEP4Rの発現が前立腺癌の増殖および浸潤・遊走に関与し、去勢抵抗性前立腺癌ではEP4Rの発現が癌の活動性において重要な役割を演じている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホルモン感受性前立腺癌から去勢抵抗性前立腺癌への進行に伴いプロスタグランジンE2受容体サブタイプの発現が変化し、そのうちの1つであるEP4Rの発現が去勢抵抗性前立腺癌の増殖に重要である可能性が示唆された。この結果は、致命的な病態である去勢抵抗性前立腺癌の新たな治療戦略を構築する上で重要な情報になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Limited information is available on the pathological significance of prostaglandin E2 (PGE2) in castration-resistant prostate cancer. We investigated the expression of PGE2 receptors (EP1-4R) in hormone sensitive and castration-resistant prostate cancers. Our results suggested that expression of EP1R, EP2R and EP4R was associated with cancer cell proliferation and invasion/migration, and that EP4R expression might play an important role in malignant aggressiveness in castration-resistant prostate cancer.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 去勢抵抗性前立腺癌 E prostanoid receptor prostaglandin E2

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

1. 研究開始当初の背景

近年、去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC) に対して、新たなホルモン療法や抗がん剤治療が行なわれ、予後の改善が認められているものの、数ヶ月の生存期間延長であり、まだ満足できるものではない。そのため、CRPC への進行予防を含めた新たな治療戦略の構築は、今なお解決すべき重要な課題の1つである。

CRPC に対する治療標的の検索を目的に、去勢抵抗性の獲得に至る機序が様々な手法を用いて研究されている。その多くはアンドロゲン受容体やそのシグナル伝達経路に関するものであり、CRPC の新しい治療法開発に貢献している。しかし、CRPC の病態がアンドロゲン受容体系以外にも様々な因子によって制御されていることも広く知られた事実であり、その1つとしてプロスタグランジン E2 (prostaglandin E2, PGE2) が挙げられる。また、PGE2 は、癌細胞だけでなく多くの免疫担当細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞の増殖や分化および機能制御に関与している。

我々は、PGE2 の癌細胞における病理学的役割に注目し、PGE2 の生成を制御する cyclooxygenase (COX)-2 の腎癌細胞における発現を検討し、その癌細胞の増殖や血管新生、細胞浸潤関連分子との関連を明らかにした (*Clin cancer Res* 9 :1734, 2003)。また、PGE2 の特異的受容体である EP 受容体に注目し、EP 受容体発現が、上部尿路癌 (*Virchows Arch* 448 :822, 2006) や腎細胞癌 (*Anticancer Res* 31 :597, 2011) で臨床病理学的特徴や予後と関連していることを報告した。また、前立腺癌においても、癌細胞で同様の結果が見られる (*Urology* 67 :1360, 2006) だけではなく、癌周囲の間質細胞における EP 受容体の発現も有意な病理学的役割を果たすことを報告した (*Urology* 81 :136, 2013)。

一方、これらの検討は、すべてホルモン治療前の組織を用いて行われており、CRPC における EP 受容体の病理学的意義や予後との関連は不明な点が多い。また、EP 受容体を発現する前立腺癌周囲の間質浸潤細胞についての詳細な病理学的意義はわかっていない。

2. 研究の目的

CRPC 癌細胞および癌間質浸潤細胞における EP 受容体の網羅的解析から、EP 受容体発現の CRPC 進展予測因子としての可能性、および EP 受容体阻害剤を用いた進展予防も含めた前立腺癌治療戦略の有用性を *in vivo*、*in vitro* の両面から解明することを目的とする。

細胞、動物モデル、臨床検体での研究を統合的に遂行し、以下の解明を目指す。

- (1) アンドロゲン依存性と非依存性前立腺癌細胞における EP 受容体の病理学的、分子生物学的役割。
- (2) 免疫担当細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、癌幹細胞における EP 受容体の役割。
- (3) 前立腺癌自然発生遺伝子改変マウスの CRPC における癌細胞と間質組織での EP 受容体発現の病理学的意義。
- (4) EP 受容体阻害剤による抗腫瘍効果の分子生物学的な機序。
- (5) CRPC の臨床検体における EP 受容体発現と臨床病理学的特徴や予後との関連。

3. 研究の方法

- (1) ヒト前立腺細胞におけるプロスタグランジン E2 (EP) 受容体の検討

Western blot および免疫染色法を用いてヒト前立腺癌細胞 (アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞 PC-3 および DU-145、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞 LNCaP) および正常前立腺上皮細胞における EP 受容体の発現を検討した。

ヒト前立腺癌細胞の EP 受容体を siRNA によってノックダウンし、細胞増殖能 (MTT assay, colony formation assay) および遊走・浸潤能 (Scratch assay および invasion assay) の変化を検討した。

- (2) 前立腺癌発症マウスモデルにおける EP 受容体の検討

マウス CRPC モデルを作製し、CRPC 組織における EP 受容体の発現を検討する目的で、生後 10 週時の前立腺癌自然発生遺伝子改変マウス (knock-in mouse of adenocarcinoma of prostate, KIMAP) に精巣摘除術 (外科的去勢) を施行した。

- (3) 臨床検体を用いた前立腺癌組織における EP 受容体の検討

対象はホルモン感受性前立腺癌 (hormone sensitive prostate cancer, HSPC) 患者 75 人、CRPC 患者 27 人、合計 102 人であった。なお、HSPC 患者の診断時 PSA 平均値は 65.8 ng/mL、組織学的悪性度 (Gleason score, GS) は低悪性度 (GS6 以下) 17 人、中間悪性度 (G7) 27 人、高悪性度 (GS8-10) 31 人であった。また、転移のある患者が 19 人、転移のない限局癌が 56 人であった。

4 つの EP 受容体 (EP1R、EP2R、EP3R および EP4R) の発現は免疫組織化学的に評価し、細胞増殖 (Ki-67 labeling index)、アポトーシス (apoptotic index) および血管新生 (VEGF-A 発現) との関連を検討した。なお、全例針生検標本を用いた検討のため、microvessel density の評価は行わなかった。

ホルモン療法未施行の前立腺癌（HSPC）組織および去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）組織におけるEP受容体およびその関連因子の発現を比較検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト前立腺細胞におけるプロスタグランジンE2（EP）受容体の検討

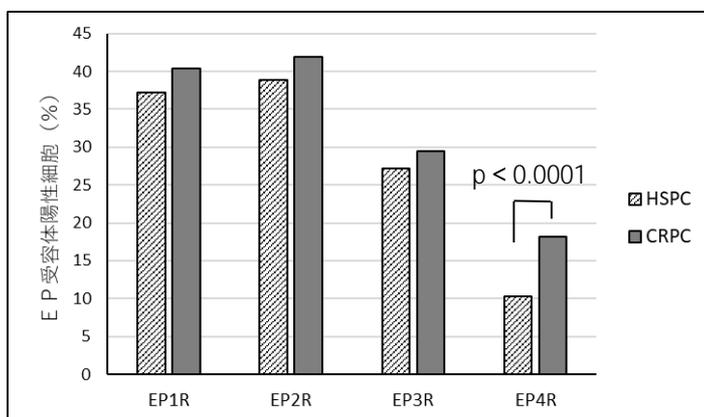
前立腺癌細胞株において、アンドロゲン依存性の有無にかかわらず EP3R を除く EP 受容体（EP1R、EP2R および EP4R）が高発現していることを確認し、それぞれの受容体において si-RNA 法による発現制御を行った。その結果、3 つの受容体すべてにおいて、発現をノックダウンすることによって細胞増殖および遊走能が低下する傾向を認めたと、その結果にばらつきがみられた。その原因として siRNA によってノックダウンされた発現が、数日後に回復する細胞があることが判明した。そこで、現在、ノックダウンの効果が安定的かつ長期に得られる sh-RNA 法を用いて、前述した結果の確認を進めている。

(2)前立腺癌発症マウスモデルにおける EP 受容体の検討

CRPC モデルを作製する目的で、前立腺癌自然発生遺伝子改変マウス（KIMAP）に外科的去勢を施行し、前立腺癌の縮小効果を確認した。しかし、その後の観察で多くのマウスが再増殖を示さず、CRPC に至らなかった。組織学的検討から、去勢により強い抗腫瘍効果が得られたことが判明したため、より悪性度の高い高週齢 KIMAP を用いた CRPC モデル作製に着手した。

(3) ヒト前立腺癌組織におけるEP受容体発現の検討

HSPC および CRPC における EP 受容体の発現を免疫組織化学的に評価した。その結果、EP1R、EP2R および EP3R 陽性細胞の比率は HSPC と CRPC の間で差がなかったが、EP4R 陽性細胞の比率は HSPC に比べ CRPC で有意に高かった（下図）。



EP 受容体の発現と細胞増殖（Ki-67 labeling index）との関連を検討した。その結果、HSPC では EP1R と EP2R の発現が、CRPC では EP2R と EP4R の発現が Ki-67 labeling index と正に相関していた。

EP 受容体の発現とアポトーシス（apoptotic index）との関連を検討した。その結果、HSPC では関連がみられず、CRPC でのみ EP4R の発現が apoptotic index と負に相関していた。

EP 受容体の発現と血管新生（VEGF-A 発現）との関連を検討した。その結果、HSPC では EP1R と EP2R の発現が、CRPC では EP4R の発現が VEGF-A 発現と正に相関していた。

研究成果(1)(3)から、EP1R、EP2R および EP4R の発現が前立腺癌の増殖および浸潤・遊走に関与し、ホルモン感受性前立腺癌では EP1R と EP2R の発現が、去勢抵抗性前立腺癌では EP4R の発現が癌の活動性において重要な役割を演じている可能性が示唆された。今後、マウス CRPC モデルの作製を行い、当初の目的である CRPC 癌細胞と間質組織での EP 受容体発現の病理学的意義について検討を進め、EP 受容体阻害剤投与による抗腫瘍効果の分子生物学的な機序を解明する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

宮田康好, 中村裕一郎, 安田拓司, 志田洋平, 計屋知彰, 望月保志, 酒井英樹: 前立腺癌における thrombospondins の臨床病理学的役割の検討. 第 32 回前立腺シンポジウム, 2016

年 12 月 10 日，東京コンファレンスセンター（東京都・港区）

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮田 康好

ローマ字氏名：MIYATA, Yasuyoshi

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（医学系）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：6 0 3 8 0 8 8 8

(2)研究協力者

研究協力者氏名：湯野 努

ローマ字氏名：YUNO, Tsutomu

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。