

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591847  
 研究課題名（和文） 新規樹立 Xenograft を用いた前立腺癌アンドロゲン非依存性増殖機構の解明  
 研究課題名（英文） Mechanisms of acquiring androgen-independence in novel prostate cancer xenograft model  
 研究代表者  
 賀本 敏行 (KAMOTO TOSHIYUKI)  
 京都大学・医学研究科・准教授  
 研究者番号：00281098

## 研究成果の概要：

我々は以前より、前立腺癌患者の腫瘍組織を免疫不全マウスの皮下に直接移植することによる新規前立腺癌 Xenograft の作成を行い、それをを用いた研究を行ってきた。今回我々は、前立腺癌 Xenograft を用いた検討を中心とし前立腺癌のアンドロゲン非依存性(AI)増殖能の獲得機構の解明と、AI 前立腺癌の新規治療法の開発を目指した研究を遂行した。

新規樹立した前立腺癌 Xenograft, KUCaP/WT は、マウス去勢により腫瘍が縮小するが、約 2 ヶ月後に AR の変異や発現亢進を伴わずに再増殖し AI 増殖能を獲得する。このモデルを用いた DNA microarray 解析により、AI 獲得に際し様々な遺伝子の変動を認めた。その中の遺伝子のうち、AI 獲得に際し発現が亢進していた遺伝子の 1 つである Prostaglandin E receptor 4 (EP4) に関して、LNCaP 細胞を用いた機能解析を行ったところ、EP4 発現亢進その AI 増殖と PSA 産生に関与することが証明された。また、臨床検体における免疫染色により、臨床における AI 前立腺癌においても、EP4 発現が亢進していた。さらに、EP4 特異的拮抗剤(ONO-AE3-208)の in vivo での抗腫瘍効果を認め、臨床応用可能な新規治療標的分子となる可能性を見出した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
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：外科系臨床医学・泌尿器科学・腫瘍学

キーワード：前立腺癌、内分泌療法、Xenograft、AR 変異、DNA マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

食生活の変化や人口の高齢化に伴い日本人の前立腺癌罹患率は上昇し続け、その増加率は近年の男性の全癌種の中で最高となっている。前立腺癌細胞の増殖はアンドロゲン依存性であり、抗アンドロゲン療法が進行性前立腺癌の標準治療となっている。しかし治療開始後、約2年でアンドロゲン非依存性(AI)増殖能を獲得し、アンドロゲン非依存性前立腺癌(AIPC)に移行する。その後予後不良であり、AIPCの増殖機構の解明に基づいた新たな治療法の開発が急務である。

これまでの前立腺癌研究の大きな問題点のひとつとして、細胞株を用いた治療モデルを構築することが非常に困難であることが挙げられる。早期の前立腺癌は前立腺内で肉眼的腫瘍を形成しないということがその理由のひとつである。こうしたことから、前立腺癌の臨床的特徴を保った実験系を確立することが前立腺癌研究を行う上での課題とされてきた。解決法としては Xenograft 系の樹立・培養細胞株の樹立・Tissue Microarray 作製による臨床検体の効率よい解析が考えられる。我々は、これらの課題を駆使し、ヒト前立腺癌の AIPC への移行機序の解明を行ってきた(Cancer Research 2005, Mol Endocrinol 2006, Urology 2005)。

## 2. 研究の目的

- (1) 前立腺癌研究のための新しい動物実験モデルの確立
- (2) AI 獲得に際し変動する分子の探索とその機序解析
- (3) AIPC に対する新たな治療法の開発

## 3. 研究の方法

(1) KUCaP/WT の樹立と特徴：AIPC 性前立腺癌患者の局所再発組織を 20-30mm<sup>3</sup> に分割し、100ul マトリゲルと共に 5 週齢のヌードマウスの背部皮下に移植することにより、新規 Xenograft: KUCaP/WT を作成した。Xenograft 組織における AR と PSA の発現を Western blotting (WB) にて確認し、その AR 変異の有無を sequence により確認した。マウスの去勢を行い、その腫瘍体積の経時変化を評価した。去勢前(AD)と去勢後再増殖時(AI)における腫瘍の組織学的変化、AR の発現を HE 染色、免疫染色(IHC)にて確認した。

(2) DNA microarray 解析：KUCaP/WT を去勢前(Group1: n=4)、去勢後縮小期(Group2: n=4)、去勢後再増殖期(Group3: n=4)にそれぞれ腫瘍を採取した。その際に、マウス血中 PSA 値を測定した。各腫瘍より採取した RNA を用いて、Affmetrix Human Genome U133 Plus2.0 による DNA microarray 解析を行った。いずれかの 2 群間で発現に差を認めた(p<0.05)遺伝子に対して K-means clustering を行い、AI 獲得に際し上昇している遺伝子群を抽出し、RT-PCR 法にて確認した。

(3) 臨床検体における EP4 免疫染色：KUCaP/WT における EP4 の発現の有無と局在を IHC にて確認した。また同様に、ホルモン未治療前立腺癌患者(n=27)と AIPC 患者

(n=31)における発現を調べ、その発現強度とその割合を両群間で比較した。

(4) 細胞株における EP4 と AI との関係：EP4 発現ベクター(pcDNA3.1-EP4)を作成し、LNCaP 細胞を用いた強制発現細胞(LNCaP-EP4)を作成した。各細胞の細胞内 cAMP 濃度を cAMP EIA kit を用いて測定した。各細胞を 10%FBS(アンドロゲン有り)及び 10% CSFBS (アンドロゲン無し)培養液下で細胞増殖能(cell count)及び PSA の発現(real time PCR)を評価した。各細胞を 100ul マトリゲルと共にヌードマウスの背部皮下に移植し Xenograft を作成し、腫瘍体積 100-200mm<sup>3</sup> になった時点でマウスの去勢を行い、その後の変化を調べた。また、Stealth RNAi システムを用いた AR ノックダウンを行い、コントロール stealth RNAi とその細胞増殖能を比較した。

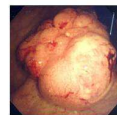
(6) ONO-AE3-208(EP4 拮抗剤)投与：ONO-AE3-208 は小野薬品より提供を受け、in vitro にて各細胞培養液に添し、細胞内 cAMP 濃度及び PSA mRNA 発現量の変化を評価した。また、in vivo では、LNCaP-EP4 の Xenograft を作成し、マウス去勢後 AE3-208(10mg/kg/day)を腹腔内投与し、腫瘍体積の変化を評価した。さらに、去勢後再増殖した KUCaP/WT に対しても同様に投与し評価した。

## 4. 研究成果

(1) KUCaP/WT は野生型 AR を持つ AD 腫瘍であり、マウス去勢後約 2 ヶ月で AR の発現亢進を伴わずに AI を獲得する。

### マウスモデルの作成

PC患者の局所再発組織

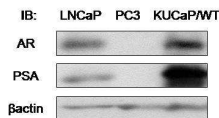


KUCaP/WTを樹立

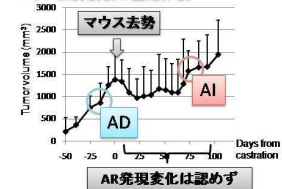


皮下移植 Xenograft

野生型AR, PSAを発現

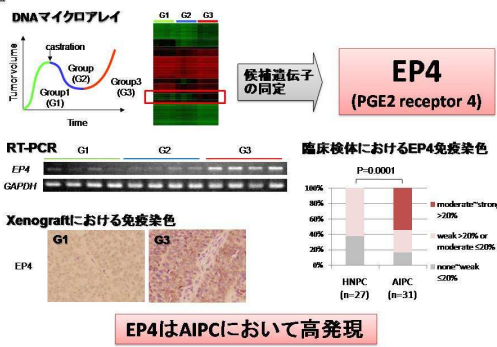


マウス去勢前後の腫瘍体積



(2) DNA microarray 解析により、KUCaP/WT の AI 獲得に際し EP4 の発現亢進を認めた。臨床におけるホルモン未治療前立腺癌と比べ AIPC において EP4 の発現が亢進していた。

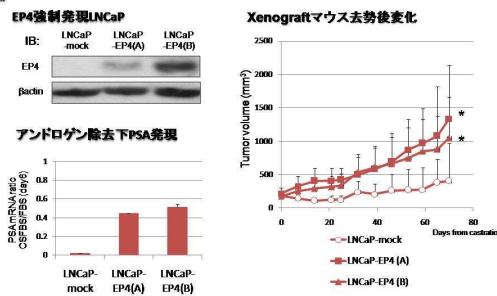
**候補遺伝子を同定**



**EP4はAIPCにおいて高発現**

(3) EP4 強制発現 LNCaP は AR の活性化を介し AI を獲得した。

**EP4とAIとの関連性の証明**

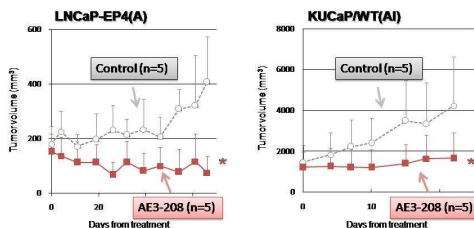


**EP4の発現亢進がAI増殖をもたらす**

(4) ONO-AE3-208(EP4 拮抗剤)は EP4 強制発現 LNCaP 及び KUCaP/WT の in vivo における AI 増殖を抑制した。

**EP4の標的分子としての可能性の検討**

**ONO-AE3-208: EP4拮抗剤**



**EP4はAIPCに対する治療標的となり得る**

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 3 件)

1. Inoue T, Kamoto T, Ogawa O, Nakamura E et al. Roles of androgen-dependent and -independent signal transduction pathways for cell proliferation of prostate cancer cells. *Exp Rev Endocrinol Metab*, 2007; 2:689-704.

2. Shimizu Y, Kamoto T, Nakamura E, Ogawa O et al. Increased Akt and phosphorylated Akt expression are associated with malignant biological features of prostate cancer in Japanese men. *BJU Int*. 2007; 100(3):685-690.

3. Terada N, Kamoto T, Nakamura E, Ogawa O et al. Association of genetic polymorphisms at 8q24 with the risk of prostate cancer in a Japanese population. *Prostate* 2008; 68: 1689-1695.

[学会発表] (計 5 件)

1. 寺田 直樹、賀本 敏行、小川 修 ほか  
アンドロゲン受容体変異(W741C)を持つ新規樹立前立腺癌 Xenograft における Antiandrogen Withdrawal Syndrome と抗アンドロゲン剤交替療法 第 96 回日本泌尿器科学会総会 2008/4/25 横浜市

2. Terada N, Kamoto T, Ogawa O et al. Mechanisms of acquiring androgen-independence in novel prostate cancer xenograft model. Poster session 23rd Annual Meeting of European Urological Association (EAU) March 26 - 29, 2008 Milan, Italy

3. 寺田 直樹、賀本 敏行、小川 修 ほか  
新規前立腺癌 Xenograft を用いたアンドロゲン非依存性獲得の機序に関する検討 第 67 回癌学会学術総会 2008/10/29 名古屋市

4. 神波 大己、賀本 敏行、小川 修 ほか  
Xenograft を用いたホルモン非依存性前立腺

癌に対する新規治療標的分子の同定 第 46  
回日本癌治療学会総会 2008/10/31 名古屋  
市

5. 寺田 直樹、賀本 敏行、小川 修 ほか  
新規樹立前立腺癌 Xenograft を用いたアンド  
ロゲン非依存性獲得機序に関する研究－EP4  
はホルモン抵抗性前立腺癌に対する新規治  
療標的分子となり得る 第 97 回日本泌尿器  
科学会総会 2009/4/17 岡山市

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：前立腺癌のホルモン不応性獲得に関与  
する遺伝子および治療薬

発明者：小川 修、辻本 豪三ほか

権利者：松本 紘、川瀬 和一十

種類：A61P

番号：2009-019701

出願年月日：2009.1.30

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

賀本 敏行 (KAMOTO TOSHIYUKI)

京都大学・医学研究・准教授

研究者番号：00281098

### (2)研究分担者

小川 修 (OGAWA OSAMU)

京都大学・医学研究・教授

研究者番号：90260611

西山博之 (NISHIYAMA HIROYUKI)

京都大学・医学研究・講師

研究者番号：20324642

中村 英二郎 (NAKAMURA EIJIRO)

京都大学・医学研究・講師

研究者番号：90293878

兼松 明弘 (KANEMATSU AKIHIRO)

京都大学・医学研究・助教

研究者番号：90437202

吉村 耕治 (YOSHIMURA KOJI)

京都大学・医学研究・助教

研究者番号：40397542