

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18565

研究課題名(和文)新規ゼノグラフトモデルを用いた前立腺癌治療効果予測マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of a marker for prognostic treatment of prostate cancer using a new xenograft model

研究代表者

藤井 将人 (FUJII, MASATO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：10794373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌去勢治療抵抗性モデル(PDXモデル)において高発現であったIL13Ra2という分子に着目し、治療反応性予測マーカー(去勢抵抗性を予測する)となり得るかを検討した。IL13Ra2強制発現前立腺癌細胞株はアンドロゲン除去培地(去勢培地)において有意な細胞増殖を来した。動物実験においても腫瘍の生着率増大速度、去勢反応性において違いを認めた。また、治療前の前立腺癌患者サンプルを用いた免疫染色でも優位に後に治療抵抗性前立腺癌となった患者において有意にIL13Ra2免疫染色陽性率が高かった。IL13Ra2は前立腺癌治療効果予測マーカーとなりうる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行性前立腺癌に対する一次療法は去勢治療であるが、治療経過において去勢治療抵抗性となり増悪する前立腺癌が多くみられる。治療抵抗性前立腺癌に対しては複数の治療薬が存在し、早期の導入により治療効果が改善したなどの報告がある。しかし、去勢治療に対する反応性予測マーカーが無く、患者選択においての基準が困難である。今回検討したIL13Ra2は去勢抵抗性を予測し得る可能性があり、臨床応用されれば去勢治療抵抗性が予測される患者に予め適切な治療を受けて頂く事で、予後改善やQOL(生活の質)の維持に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We focused on a molecule called IL13Ra2, which was highly expressed in the prostate cancer castration resistance model (PDX model), and examined whether it could be a treatment responsiveness predictor (predicting castration resistance). The IL13Ra2 forced expression prostate cancer cell line resulted in significant cell proliferation in androgen-depleted medium (castration medium). In animal experiments, differences were also observed in the rate of increase in tumor engraftment rate and castration reactivity. In addition, immunostaining using a sample of prostate cancer patients before treatment also showed a significantly higher rate of positive IL13Ra2 immunostaining in patients who later developed treatment-resistant prostate cancer. IL13Ra2 may be a predictor of the therapeutic effect of prostate cancer.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 去勢抵抗性 PDX IL13Ra2

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌組織は肉眼的にその局在の判断が困難で、かつ同一標本内でも癌の性質が多様であり、目的の(例えば高悪性度のみ)腫瘍の採取が困難である。patient derived xenograft (PDX) モデルである KUCaP シリーズは、去勢療法への反応性と遺伝子発現に多様性を有し、臨床における前立腺癌の多様性を再現している。このモデルの使用により目的の腫瘍の採取が可能である。その特徴を用いて、去勢療法に良く反応するモデルと、早期に抵抗性を示すモデルの遺伝子発現の比較を行い、去勢療法反応性予測マーカーの同定する事を目的とする。

2. 研究の目的

進行性前立腺癌に対する一次治療は去勢療法であり、平均奏効期間は約 2 年と言われている。しかし、半年以内に治療抵抗性を獲得し去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) となる症例も存在する。近年、一次治療としての去勢療法に、CRPC 治療薬であるタキサン系抗癌剤のドセタキセルや、新規ホルモン剤のアピラテロンを併用することで、進行性前立腺癌患者の予後が改善したと報告されている。しかし、どのような患者にそれらの薬剤を併用すべきかは明らかになっておらず、診断時に去勢療法の効果を予測するマーカーがあれば、その選択において極めて有用である。KUCaP シリーズは、その去勢療法への反応性と遺伝子発現に多様性を有する。その特徴を利用し、去勢療法への反応性予測マーカーを同定することで、プレシジョン医療の開発を目指す。

3. 研究の方法

マウスの去勢を行うと、腫瘍が縮小する去勢反応性前立腺癌 (HSPC) モデル KUCaP10 と、腫瘍が縮小しない去勢抵抗性 (CRPC) モデル KUCaP7 の腫瘍組織において、RNA sequence 法により網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、発現量に差のある遺伝子が多数同定された。この結果を用いて候補遺伝子について検証を行い、それらのうち差が大きかった分子である IL13RA2 (インターロイキン 13 受容体 2) に注目した。

<実験計画>

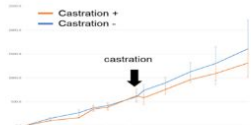
- (1) KUCaP の組織から RNA と蛋白を抽出し、real time PCR 法、Western blotting 法による IL13RA2 の発現解析を行う。
- (2) IL13RA2 強制発現前立腺癌細胞株 (LnCap) を用いて、去勢培地下で MTS assay による細胞増殖解析を行う。
- (3) IL13RA2 強制発現前立腺癌細胞株 (LnCap) を、マウス皮下に移植し増殖を確認した後に去勢療法への反応を解析する。
- (4) 前立腺癌臨床検体における IL13RA2 の発現と治療効果との相関の解析を行う。当施設で施行された前立腺生検、前立腺全摘術で採取された組織はパラフィン切片で病理部にて保管されている。IL13RA2 免疫染色によりその発現量を評価し、去勢治療の効果、予後との相関を確認する。
- (5) 前立腺癌患者血清 (治療継続中) を用いて去勢感受性前立腺癌患者及び去勢抵抗性前立腺癌患者の血中 IL13RA2 濃度を ELISA 法による発現解析を行う。

4. 研究成果

- (1) PDX モデルの去勢療法に対する感受性を評価するために、腫瘍を有するマウスを去勢し腫瘍体積の連続的な変化を、去勢されていない対照マウスと比較した。CRPC モデルとして分類されている KUCaP7 では、去勢マウスと対照マウスの間に有意差は認めなかった。HSPC モデルとして分類されている KUCaP10 は去勢にて優位に腫瘍縮小を認めた(図 1)。real time PCR 法及び Western blotting 法において CRPC モデルである KUCaP7 は HSPC モデルである KUCaP10 と比較し IL13RA2 が高発現であった。(図 2)

図 1

KUCaP-7 : Castration-resistant PDX



KUCaP-10 : Castration-sensitive PDX

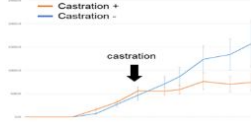
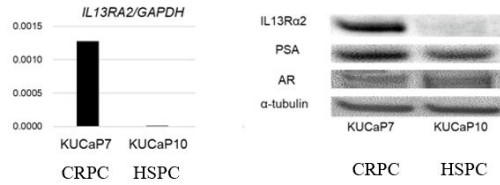


図 2



(2) FBS 添加の通常培地では、LNCaP-IL13R 2 の増殖は LNCaP-mock よりも有意に低かった。LNCaP-IL13R 2 と LNCaP-mock の両方にヒト IL13 組換えタンパク質を添加することにより、細胞増殖が抑制された (図 3A)。しかし、アンドロゲン除去培地 (CSFBS) では、LNCaP-IL13R 2 の増殖は LNCaP-mock よりも高かった。さらに、ヒト-IL13 組換えタンパク質を添加すると、LNCaP-IL13R 2 細胞の増殖が促進されました (図 3B)。これらの結果は、IL13R 2 の過剰発現が LNCaP 細胞の細胞増殖を誘導し、アンドロゲンが枯渇した状態でのみ IL13 の抗増殖効果をブロックすることを示した。

図 3A

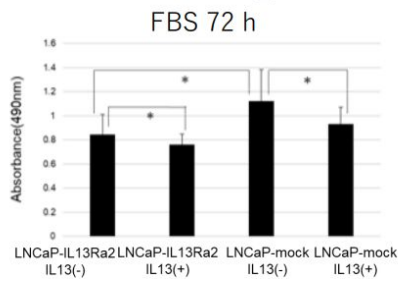
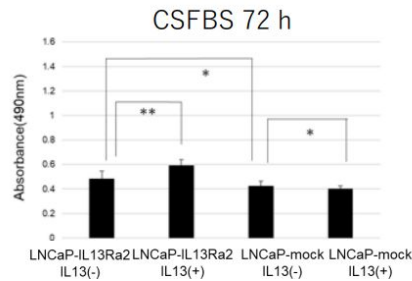


図 3B



(3) LNCaP-mock と LNCaP-IL13Ra2 をそれぞれ 5 匹のヌードマウスに両皮下に移植し、腫瘍体積を測定した。腫瘍移植から 5 週間後に LNCaP-mock の 5/10 (50%) に LNCaP-IL13Ra2 の 9/10 (90%) の部位に腫瘍生着を認めた。すべてのマウスは腫瘍移植から 5 週間後に去勢され、LNCaP-mock 細胞の腫瘍増殖は LNCaP-IL13Ra2 細胞と比較して有意に抑制された (図 4A)。また、採取した LNCaP-IL13Ra2 移植片は免疫染色にて IL13RA2 高発現を確認した (図 4B)。

図 4A

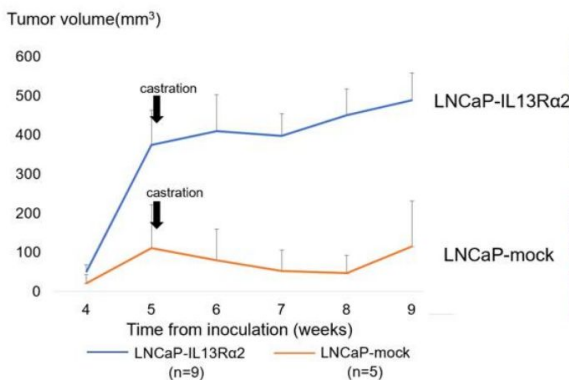
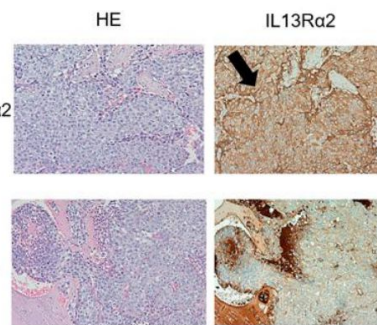


図 4B



(4) 当院で施行された前立腺癌患者の針生検標本の免疫組織染色を用いて、IL13Ra2 の発現レベルを評価した。発現レベルは none、weak、moderate、strong に分類した(図 5)。IL13Ra2 の発現レベルと PSA、グリーソンスコアは相関を認めなかった(表 1)。 Kaplan-Meier 曲線において IL13Ra2 発現レベル none/weak 群は IL13Ra2 の発現レベル moderate/strong 群に比べ Time to CRPC を延長した(図 6)。

図 5

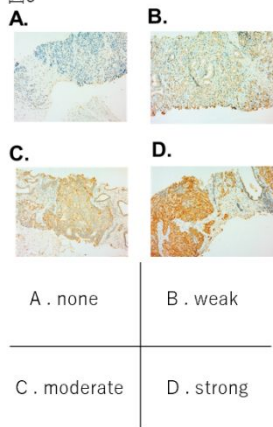
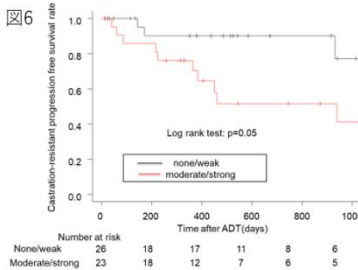


表 1

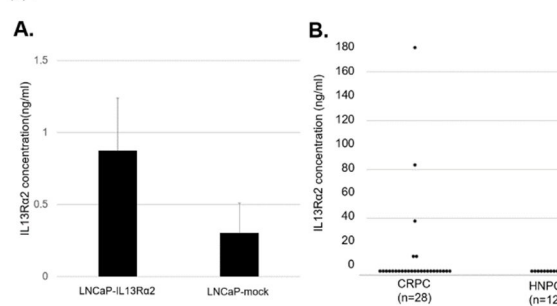
IL13Ra2 staining levels	None-Weak	Moderate-strong	
Number(n)	26	23	
Median(±SD) age(y)	76.0(±6.84)	78.1(±9.13)	P=0.37
Median(±SD) serum PSA (ng/ml)	334(±895)	1151(±2299)	P=0.10
Gleason score			
7 or less	8	2	
8 or higher	18	21	P=0.08

図 6



(5) 前立腺癌患者の IL13R 2 の血清濃度を測定する為、ELISA 法にて細胞株より分泌された IL13R 2 を評価した。LNCaP-mock および LNCaP-IL13R 2 細胞を含む上清中の IL13R 2 濃度は LNCaP-mock よりも LNCaP-IL13R 2 の方が有意に高く、前立腺癌細胞から分泌された IL13R 2 タンパクを ELISA で測定可能である事が示された(図 7A)。同様の方法で、12 人の HSPC 患者と 28 人の CRPC 患者のヒト血清サンプルを用いて IL13R 2 レベルを測定した所、血清 IL13R 2 レベルは、5 人の CRPC 患者(18%)でのみ測定でき、HSPC(0%)は測定できなかった(図 7B)。これらの結果は一部の CRPC 患者では IL13R 2 の血清濃度が高くなる傾向があることを示している。

図 7



【結論】

IL13R 2 は去勢抵抗性前立腺癌 PDX モデルで高度に発現し、前立腺癌細胞の去勢抵抗性と関連していた。これは、前立腺癌患者の去勢抵抗性を予測するための潜在的な組織および血清バイオマーカーである可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井 将人
2. 発表標題 Identification of IL13Ra2 as a biomarker for predicting castration-resistance of prostate cancer using patient derived xenograft models
3. 学会等名 2021年11月：第73回西日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永井 崇高
2. 発表標題 Identification of IL13Ra2 as a biomarker for castration-resistance prostate cancer using patient derived xenograft model
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------