

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591859

研究課題名(和文) ノックインマウス前立腺癌モデルを用いたスタチンの前立腺癌化学予防に関する研究

研究課題名(英文) A study of chemoprevention of prostate cancer with statins in a knock-in mouse prostate cancer model

研究代表者

酒井 英樹 (SAKAI HIDEKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40235122

研究成果の概要(和文)：ノックインマウス前立腺癌モデルにおいて、血管内超音波プローブを用いた経直腸的超音波断層法によって腫瘍の変化を縦断的に観察することが可能であった。スタチンの前立腺癌化学予防効果は解析できなかったが、非受容体型チロシンキナーゼである c-Fes は細胞増殖を介して、前立腺癌の発生あるいは進行と関連している可能性があり、前立腺癌の化学予防および治療の標的となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transrectal ultrasonography with an endovascular ultrasound probe allowed longitudinal monitoring of in situ tumor growth in the genetically engineered mouse prostate cancer model, PSP-KIMAP. Although preventative effects of statins in prostate cancer were not successfully analyzed, our data suggest that a non-receptor protein-tyrosine kinase, c-Fes may be involved in the development and progression of prostate cancer via cell proliferation. We speculate that c-Fes is a possible target in the treatment and chemoprevention of prostate cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

キーワード：前立腺癌、ノックインマウス、PSP94、c-Fes

1. 研究開始当初の背景

2005年に症例対照研究においてスタチンによる前立腺癌発症リスクの減少効果(Shannon J, et al)、2006年には前向きコホート研究からスタチンによる前立腺癌の進行抑制効果が報告された(Platz EA, et al)。このように前立腺癌の発生・進展に与えるスタチンの効果には極めて興味を持たれるが、

基礎的データは限られている。我々は、前立腺癌細胞を用いた研究でスタチンの増殖抑制効果を確認していたが、前臨床試験に繋がるような、動物モデルを用いた in vivo 実験が必要であると考えた。

また我々は、ヒト前立腺癌ときわめて類似した経過をたどり、個体間で腫瘍の発生や特徴が安定しているノックインマウス前立腺

癌モデルを樹立しているのので、これを用いて縦断的にスタチンの化学予防効果をみる研究を立案した。

2. 研究の目的

ヒト前立腺癌ときわめて類似した経過をたどるノックインマウス前立腺癌モデルを用いて、高脂血症治療薬であるスタチンの前立腺癌発生・進行予防効果を明らかにすることを目的とした。

まず、マウス前立腺の超音波画像と病理組織を詳細に解析し、前臨床試験に備えた前立腺の縦断的観察を確立する。次に、スタチン投与における縦断的観察を行い、前立腺発癌あるいは進行に関わる分子の検索を行うこととした。

また、今回の研究では、乳癌や卵巣癌の増殖あるいは転移との関連が報告されている非受容体型チロシンキナーゼ c-Fes について、マウスモデルおよびヒトの前立腺癌組織における発現を検討し、その病理学的意義や治療標的となる可能性についても検討した。

3. 研究の方法

(1) PSP-KIMAPマウスの前立腺超音波画像と病理組織の比較

各週齢の野生型およびPSP-KIMAPマウスを対象として、臨床で使用されている血管内超音波プローブを用いた経直腸的超音波断層法 (TRUS) を行い、前立腺の病理組織所見とその超音波画像の対比を行った。なお摘出標本の病理学的所見は、臨床で用いられている Gleason score に準じて評価した。

(2) スタチンの持続投与

前立腺癌細胞を用いた実験で増殖抑制効果を認めていた fluvastatin あるいは simvastatin を用いることとした。脂溶性であるため、持続皮下注射を含め投与法を検討したが、的確な持続投与を確立するまでに至らなかった。

(3) PSP-KIMAP マウス前立腺における c-Fes の発現

PSP-KIMAPマウスの週齢ごとに前立腺組織を採取し、パラホルムアルデヒドで固定後に c-Fes の発現を免疫組織化学的に評価した。

(4) ヒト前立腺における c-Fes の発現と細胞増殖およびアポトーシスとの関連

前立腺癌の診断で根治的前立腺摘除術を受けた 91 例を対象として、c-Fes の発現を免疫組織化学的に検討した。同様に、Ki-67 陽性細胞数の割合を増殖細胞指数 (%), terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end-labeling

(TUNEL) 陽性細胞数の割合をアポトーシス指数 (%) として測定した。

(5) ヒト前立腺癌における c-Fes の発現と臨床病理学的特徴との関連

前立腺癌 91 症例の年齢、診断時 PSA 値、手術後の病理学的病期および組織学的悪性度 (Gleason スコア) と c-Fes 発現との関連を t 検定およびカイ 2 乗検定で検討した。

(6) ヒト前立腺癌における c-Fes の発現と予後との関連

前立腺癌 91 症例における c-Fes 発現別の生化学的再発 (PSA 再発) なし生存率を Kaplan-Meier 曲線を用いて比較し、その有意差検定には log-rank 検定を用いた。また、病理病期および Gleason スコアとともに多変量解析を行い、c-Fes の再発予測因子としての意義を検討した。

4. 研究成果

(1) PSP-KIMAPマウスの前立腺超音波画像と病理組織の比較

吸入麻酔下に行うマウス TRUS は簡便かつ安全であり、1匹あたりの検査所要時間は 5 分程度であった。

- ① 前立腺の大きさは PSP-KIMAP マウスにおいて 9 ヶ月以降 18 ヶ月まで経時的に増大した (表 1)。
- ② PSP-KIMAP マウスにおける月齢ごとの前立腺癌発症率は 6 ヶ月で 20%、9 ヶ月で 46%、12 ヶ月以上で 100% であり、組織学的悪性度は Gleason score 6~8 に相当した。
- ③ 血管内超音波 TRUS による前立腺の局在は、その摘出組織標本所見とよく一致していた。

以上より、血管内超音波 TRUS によるマウス前立腺の観察は簡便かつ低侵襲で、マウスの屠殺を行うことなく腫瘍変化を縦断的に観察することが可能であり、その有用性が確認された。

表 1. 前立腺長径の推移

マウス月齢	6 月	9 月	12 月	18 月
PSP-KIMAP	4.07	4.08	4.60	5.00
野生型	3.75	3.73	3.88	—

(3) PSP-KIMAP マウス前立腺における c-Fes の発現

12 週齢までのマウスにおいて、正常組織では c-Fes 陽性例はなく、prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) のあった 7

例中 2 例で c-Fes 陽性であった。28 から 32 週齢のマウスでは全例に癌が存在し、癌組織では c-Fes が陽性であった。全体での c-Fes 陽性率は正常組織 0%、PIN 25%および癌 100%であった (表 2)。

表 2. PSP-KIMAP マウス前立腺における c-Fes の発現

	例数	c-Fes	
		陰性	陽性
4-12 週齢 (7 匹)			
正常	7	7 (100%)	0 (0%)
PIN	7	5 (71%)	2 (29%)
癌	0	—	—
28-32 週齢 (7 匹)			
正常	0	—	—
PIN	1	1 (100%)	0 (0%)
癌	7	0 (0%)	7 (100%)
総計 (14 匹)			
正常	7	7 (100%)	0 (0%)
PIN	8	6 (75%)	2 (25%)
癌	7	0 (0%)	7 (100%)

(4) ヒト前立腺癌における c-Fes の発現と細胞増殖およびアポトーシスとの関連

c-Fes 陽性例では有意に増殖指数が高かったが、c-Fes 発現とアポトーシス指数との関連はみられなかった (表 3)。

表 3. ヒト前立腺癌における c-Fes と細胞増殖およびアポトーシスとの関連

	c-Fes		P 値
	陰性	陽性	
増殖指数 (%)*	5.6±4.5	8.9±4.8	0.002
アポトーシス指数 (%)*	2.0±1.0	1.8±0.8	0.263

*平均値±標準偏差

(5) ヒト前立腺癌における c-Fes の発現と臨床病理学的特徴との関連

前立腺癌 91 例中 c-Fes 陰性は 57 例、陽性は 34 例であった。c-Fes の発現と年齢および血清 PSA 値の間に関連はみられなかった。臨床病期の進行例で有意に c-Fes 陽性例が多かった。また、組織学的悪性度の高い症例で有意に c-Fes 陽性例が多かった (表 4)。

表 4. c-Fes の発現と臨床病理学的特徴

	c-Fes		P 値
	陰性	陽性	
症例数	57	34	
年齢 (歳)*	63.0±5.7	62.6±7.2	0.754
PSA (ng/ml)*	9.5±6.3	11.3±10.1	0.503
病理病期			<0.001
pT2	45	14	
pT3	12	20	
Gleason スコア			0.027
6 以下	25	7	
7	19	11	
8 以上	13	16	

*平均値±標準偏差

(6) ヒト前立腺癌における c-Fes の発現と予後との関連

生化学的再発 (PSA 再発) なし生存率は有意に c-Fes 陽性症例が不良であった (図 1)。

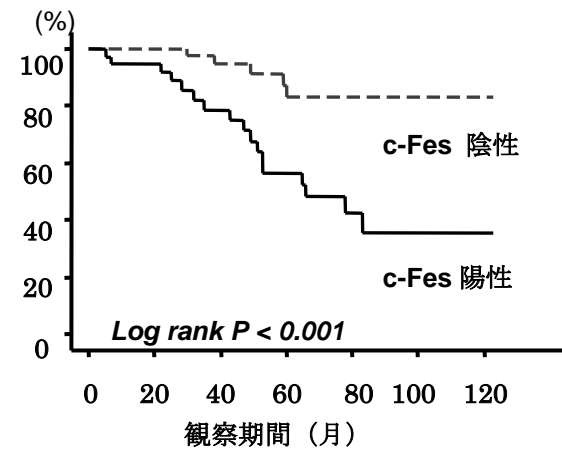


図 1. 生化学的再発なし生存曲線

また、病理学的病期および Gleason スコアを含めた多変量解析の結果でも c-Fes 陽性は独立した再発予測因子であった (表 5)。

表 5. c-Fes の発現と臨床病理学的特徴

	ハザード比	95%信頼区間	P 値
病理病期	3.31	1.22-8.97	0.019
Gleason スコア	1.13	0.47-2.68	0.790
c-Fes	3.21	1.11-9.37	0.032

(7) 研究成果の総括

血管内超音波プローブを用いた TRUS

によるマウス前立腺の観察は簡便かつ低侵襲で、マウスの屠殺を行うことなく腫瘍の変化を縦断的に観察することが可能であった。

細胞の増殖や分化との関連が示唆されている非受容体型チロシンキナーゼである c-Fes は、動物実験において正常細胞では発現せず、前立腺癌で発現していた。また、臨床検体を用いた検討から病期および悪性度と関連し、アポトーシスよりも増殖との関連が示唆された。以上より、c-Fes は細胞増殖を介して、前立腺癌の発生あるいは進行と関連しており、前立腺癌の化学予防および治療の標的となり得る可能性が示唆された。

一方、マウスへのスタチン投与実験系を確立できず、現時点では当初の目的であったスタチンの前立腺癌予防効果を評価できなかったため、今後更に研究を進めたい。

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 Watanabe S, Miyata Y, Kanda S, Iwata T, Hayashi T, Kanetake H, Sakai H, Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human prostate cancer specimens with and without neo-adjuvant hormonal therapy, J Cancer Res Clin Oncol, 査読あり, Vol.136, No.5, 2010, 787-793
- ② 酒井英樹、前立腺癌の化学予防、癌と化学療法、査読なし、37 巻、1 号、2010、35-38
- ③ Maruta S, Sakai H, Kanda S, Hayashi T, Kanetake H, Miyata Y, E1AF expression is associated with extra-prostatic growth and matrix metalloproteinase-7 expression in prostate cancer, APMIS, 査読あり, Vol.117, No.11, 2009, 791-796

[学会発表] (計4件)

- ① 宮田康好、前立腺癌における c-Fes の発現と臨床病理学的特徴や増殖、アポトーシスとの関連、第 26 回前立腺シンポジウム、2010 年 12 月 11 日、東京コンファレンスセンター (東京都)
- ② 渡邊慎一、前立腺癌における c-Fes の発現と臨床病理学的特徴や増殖、アポトーシスとの関連、第 68 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 24 日、大阪国際会議場 (大阪府)
- ③ 渡邊慎一、前立腺癌における Fes の臨床病理学的意義、第 98 回日本泌尿器科学会

総会、2010 年 4 月 29 日、ホテルメトロポリタン盛岡 (岩手県)

- ④ 丸田 大、前立腺癌発症ノックインマウスにおける血管内超音波プローブを用いた経直腸的超音波断層法の有用性、第 96 回日本泌尿器科学会総会、2008 年 4 月 25 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 英樹 (SAKAI HIDEKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：40235122

(2) 研究分担者

井川 掌 (IGAWA TSUKASA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：40295069

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

宮田 康好 (MIYATA YASUYOSHI)
長崎大学・病院・講師
研究者番号：60380888
丸田 大 (MARUTA SUGURE)
長崎大学・大学院生
渡邊 慎一 (WATANABE SHIN-ICHI)
長崎大学・大学院生