

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791102

研究課題名（和文） メバロン酸経路をターゲットとした前立腺癌治療への基礎的研究

研究課題名（英文） Basic study on new treatment strategy targeting mevalonate pathway in prostate cancer

研究代表者

野村 昌史（NOMURA MASASHI）

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00420167

研究成果の概要（和文）：メバロン酸経路をターゲットとするスタチンおよびゾレドロン酸の前立腺癌細胞に対する効果を検討した。両剤ともに前立腺癌細胞増殖を抑制した。特に、スタチンはアンドロゲン非依存性細胞 PC-3 を特異的に抑制した。前立腺癌細胞は脂質の受容体である LDL 受容体を発現しており、LNCAP は外因性の脂質の変化およびスタチンによる細胞内脂質の低下によって LDL 受容体発現調節が起こる。一方、PC-3 ではこの調節機序が働いていないため、スタチンによる効果が認められた。以上の結果から、スタチン、ゾレドロン酸といったメバロン酸経路をターゲットとする薬剤を前立腺癌の治療に利用できる可能性が判明した。

研究成果の概要（英文）：In this study, the therapeutic potential of statin and zoledronic acid, mevalonate pathway targeting agents, was studied. Both agents inhibited prostate cancer cell proliferations, especially, statins specifically inhibited proliferation of PC-3, androgen-independent cells. Prostate cancer cells expressed LDL receptor. LNCAP cells had abilities to regulate expression of LDL receptor in response to exogenous or endogenous lipid levels. In contrast, PC-3 lacked this ability and statin exerts its antiproliferative effect in PC-3 cells. These results suggested that mevalonate targeting agents, such as statin and zoledronic acid, have potentials to use for 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	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総 計	1,900,000	570,000	2,470,000

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、メバロン酸経路、スタチン、脂質、ゾレドロン酸

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は本邦において、2020 年には罹

患率が第2になると予測されており、現在前立腺癌による死亡数は急増傾向にある。PSA

スクリーニングによって早期に発見される癌がある一方で、無症状である癌の特性から、すでに進行期で発見される症例も依然として多い。また、早期癌も治療後に再発する症例も多く存在する。前立腺癌は男性ホルモン依存性癌であるため、男性ホルモンを遮断するいわゆる **Androgen deprivation therapy** が進行癌の第一選択治療であり、初期には90%以上の症例が奏功する。しかし、その治療継続にともなって、抵抗性を示すようになり、いわゆる去勢抵抗性前立腺癌が問題となっている。

去勢抵抗性前立腺癌の治療は現在、ドセタキセルによる化学療法が標準治療であるが、高齢者が対象となることもあり、必ずしも十分に治療できないという問題点もあり、新規治療のターゲットが求められている。

私のグループでは脂質と前立腺癌についての検討を進めており、その中で、高脂血症に使用するスタチンが前立腺癌細胞増殖を抑制することを見いだした。このことは、スタチンが作用するメバロン酸経路を制御することが前立腺癌に対する新しい治療戦略になることを示唆しており、今回、前立腺癌の骨転移に対する治療薬で、同じメバロン酸経路にも作用を示す、ゾレドロン酸の相乗効果がスタチンと認められるかを検討するため、研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

前立腺癌に対する新規治療方法の確立を検討するため、これまで私の属する教室で検討されたスタチンおよび前立腺癌骨転移における治療薬であるゾレドロン酸が、共通して作用するメバロン酸経路に焦点を絞り、前立腺癌に対する効果を基礎的に検討した。

3. 研究の方法

上記の目的のため、メバロン酸経路と前立腺癌に関する基礎的検討を以下のような方法で種々検討した。

1) ゾレドロン酸の前立腺癌細胞に対する増殖抑制効果の検討

前立腺癌細胞 LNCAP、PC-3 に対して種々の濃度のゾレドロン酸を作用させ、細胞増殖を MTS アッセイによって検討した。これは、ゾレドロン酸がメバロン酸経路の下流にある非ステロールブランチの中で、Rho-RAS 系がゾレドロン酸に関係しているという知見から実際に増殖抑制効果があるかをみるものである。

2) スタチンによる前立腺癌細胞に対する増殖抑制効果の検討

前立腺癌細胞 LNCAP、PC-3 に対して種々の

濃度のシンバスタチンを作用させ、細胞増殖を MTS アッセイによって検討した。これは、ゾレドロン酸がメバロン酸経路の下流にあるステロールブランチの中で、LDL 受容体および dolicol を介して IGF-1 受容体を変動させるという教室のデータをもとに、実際に増殖抑制効果があるかをみるものである。

3) スタチン・ゾレドロン酸併用による前立腺癌細胞に対する増殖抑制効果の検討

上記 1) 2) から両剤の相乗効果効果があるかを検討し、実際の臨床の場面での使用に際しての情報となるものである。

4) メバロン酸経路に関する前立腺癌との関連に関するその他の検討

(1) 前立腺癌細胞における LDL とその受容体の検討

メバロン酸経路が前立腺癌細胞内の脂質濃度を制御していることが推察されるが、実際にメバロン酸経路を動かした結果として脂質が取り込まれる可能性があるなどが、不明であるため、前立腺癌細胞における脂質の取り込みに関する受容体について、RT-PCR および蛍光ラベルした受容体によってその存在について検討した。具体的には、これまで教室で行ってきたレムナントリポプロテインの受容体である LDL 受容体の存在について RT-PCR およびウエスタンブロットで存在の有無を確認した。その後、蛍光ラベルした LDL を前立腺癌細胞 LNCAP に作用させ、種々の脂質の状況での細胞との関係を蛍光顕微鏡で検討した。

(2) スタチンの種類および細胞による LDL 受容体の反応と細胞増殖の関係

前立腺癌細胞にはホルモン依存性の LNCAP および非依存性の PC-3 があり、これまでの検討でレムナントリポプロテインに対する反応は異なることが示された。スタチンに対する反応も異なる可能性があるため、その差を MTS アッセイや LDL 受容体の点から検討した。さらに、スタチンも脂溶性から水溶性のものがあるため、種々のスタチンによる反応を MTS アッセイおよび LDL 受容体の点から検討した。

4. 研究成果

1) ゾレドロン酸の前立腺癌細胞に対する増殖抑制効果の検討

ゾレドロン酸を 10 μ M から 200 μ M まで

濃度を振り、12 時間、24 時間、48 時間で LNCAP および PC-3 細胞の増殖を MTS アッセイで検討した。細胞は時間の経過とともに増殖は抑制され、48 時間まで有意に低下していた。48 時間まで経時的に活性が低下していたため、以後の実験は 48 時間での検討とした。

濃度としては濃度依存的に増殖は抑制されていた。各濃度での検討を行った。

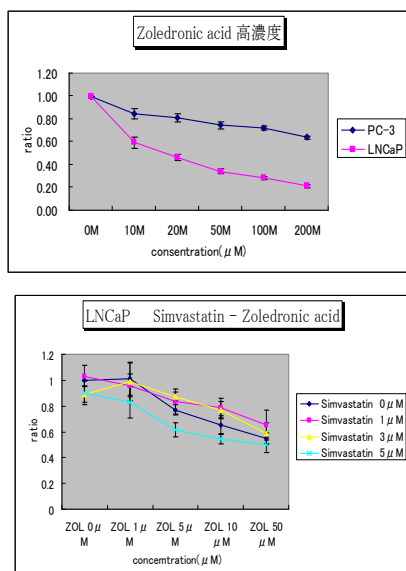


図 1：上：ゾレドロン酸とMTSアッセイ
下：スタチンとゾレドロン酸の併用

2) スタチンによる前立腺癌細胞に対する増殖抑制効果の検討

スタチンとしては教室で知見のあるシンバスタチンを使用した。1 μ M から 100 μ M に濃度を振り、ゾレドロン酸と同様に 12 時間、24 時間 48 時間での検討を行った。時間とともに細胞増殖は抑制された。ここでは、PC-3 細胞について増殖抑制が認められた。このことは、以前、IGF-1 受容体をダウンレギュレートする結果を報告した教室のデータと一致していた。(図 4 参照)

3) スタチン・ゾレドロン酸併用による前立腺癌細胞に対する増殖抑制効果の検討

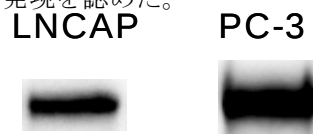
上記 2 つの結果からスタチン・ゾレドロン酸の併用効果を検討し、両剤の相乗効果が確認された。

小括：メバロン酸をその作用点の一つとするスタチンおよびゾレドロン酸を前立腺癌細胞と反応させることによって前立腺癌細胞の増殖抑制を起こすことができ、相乗効果をもたらすことが判明した。

4) メバロン酸経路に関する前立腺癌との関連に関するその他の検討

(1) 前立腺癌細胞における LDL とその受容体の検討

LNCAP および PC-3 細胞ともに、RT-PCR では LDL 受容体発現し、下記のように蛋白レベルで発現を認めた。



LDL 受容体 Western blot

図 2：LDL受容体発現：ウエスタンブロット

また、LNCAP 細胞は 10%FBS という脂質が多く存在している状態では細胞に蛍光ラベルした DIL (LDL) を結合していなかった。一方 1 %FBS で脂質全体が少ない状態では DIL (LDL) が LNCAP 細胞とよく結合していた。一方、LDL 50 μ g/ml で細胞をインキュベートすると DIL (LDL) は結合しなかった。(図 3)

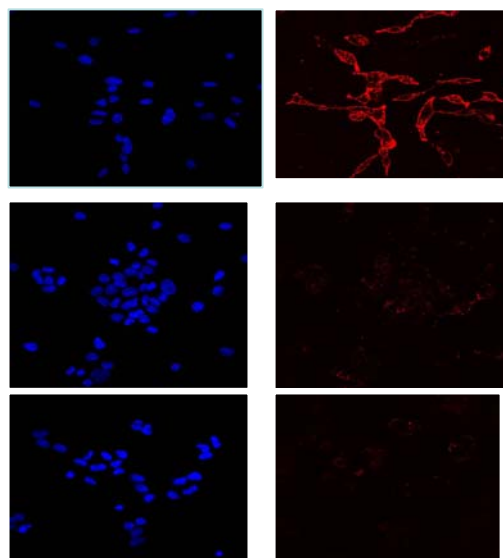


図 3：DIL (LDL) 30 分後の LNCAP 細胞における蛍光顕微鏡による観察

上段：1%FBS DIL (LDL) が細胞に結合している

中段：10%FBS DIL (LDL) は細胞との結合を認めない

下段：50 μ g/ml LDL DIL (LDL) は細胞との結合を認めない

これらの点から、脂質の存在下では LDL は LNCAP 細胞には結合しないことが分かる。また、脂質が少ない条件では LDL は細胞に結合する。すなわち、LDL 受容体の調節が細胞外の脂質に関連して認められることを示唆している。

以上の結果より、前立腺癌細胞は LDL 状態を発現しており、LDL をはじめとするリポタンパク質を結合する能力を有していることが示唆された。しかも、LNCAP 細胞では通常の脂質を代謝する細胞と同様に、外因性の脂質によって LDL 受容体の制御がなされていることが同時に示唆された。

(2) スタチンの種類および細胞による LDL 受容体の反応と細胞増殖の関係

前立腺癌細胞にはホルモン依存性の LNCAP および非依存性の PC-3 があり、これまでの検討でレムナントリポタンパク質に対する反応は異なることが示された。シンバスタチンを $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ の濃度でふって LNCAP 細胞および PC-3 細胞での MTS アッセイによる増殖抑制効果を検討した。

図に示すように PC-3 細胞は $1\mu\text{M}$ および $10\mu\text{M}$ の低濃度で増殖抑制を示した。一方、LNCAP は $10\mu\text{M}$ まで変化を示さなかった。この状態での LDL 受容体を検討したが、LNCAP では $1\mu\text{M}$ および $10\mu\text{M}$ となるにつれて LDL 受容体の発現が亢進していた。一方、PC-3 細胞では LDL 受容体量に変化は認められなかった。

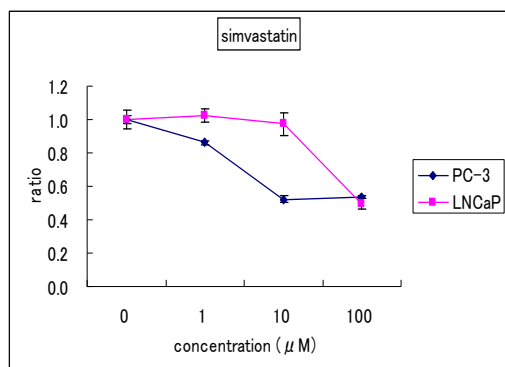


図 4 : シンバスタチンによる LNCAP および PC-3 細胞の細胞増殖反応

LNCAP では 1 および $10\mu\text{M}$ の低濃度で細胞増殖抑制が認められる。一方、PC-3 では抑制が $100\mu\text{M}$ という高濃度まで起こっていない。

LNCaP



0 1 10 μ

PC-3



0 1 10 μ

図 5 : シンバスタチンを投与した際の LDL 受容体の発現の変化

LNCAP は低濃度で LDL 受容体の発現が亢進している。一方、PC-3 ではベースの発現から変化がなく、スタチン投与による LDL 受容体の発現調節がないことを示す。

以上のことから、LNCAP 細胞ではスタチンによって LDL 受容体発現量が増加し、スタチンによる細胞内脂質量の低下を補正すべく、LDL 受容体の増加によって細胞外から脂質を取り込む能力をもつことが、スタチンによる効果が低濃度でみられない説明となると推察される。一方、PC-3 細胞では LDL 受容体の変化がなく、細胞内脂質の変動からくる細胞内の変化を補正できず、スタチンに対して感受性があると推察された。

(2) スタチンの種類および細胞による LDL 受容体の反応と細胞増殖の関係

スタチンには脂溶性および水溶性がある。これまで脂溶性スタチンであるシンバスタチンに関して実験を行ってきたが、他のスタチン（アトロバスタチン、 Crestor ）に関して検討した。脂溶性スタチンに比較して水溶性のスタチンでは効果が低いことが判明した。In vitro の系であるが、脂溶性のものは細胞膜への通過の点など細胞への効果が高いことが推察される結果であった。細胞に対する反応はいずれも、PC-3 細胞が感受性をもつことが判明した。

小括：スタチンは PC-3 細胞にたいして低濃度から効果を示すことが判明した。このメカニズムとして LDL 受容体の制御に科関係していることが示唆された。すなわち、スタチンは細胞内でコレステロール合成を抑制し、この結果、細胞はエネルギー源としてのコレス

テロールの低下から外因性のコレステロールを取り込み、細胞の恒常性を保つ方向に働くことが推察される。LNCAP 細胞はこれまでの検討から細胞内脂質の変動にともなって SREBP-2(sterol response element binding protein 2)の制御が通常の細胞のように働くが、PC-3 ではこの制御が働かず、細胞内脂質の変動によって SREBP-2 のターゲット分子である LDL 受容体を制御できない。こうした状況が、PC-3 細胞ではスタチン感受性をもたらすと推察された。

総括：メバロン酸経路をターゲットしているスタチンおよびゾレドロン酸は前立腺癌に対する治療薬剤としての役割を持つことが示唆された。

また、メバロン酸経路に関する酵素およびその阻害剤さらに、LDL 受容体などが新しい前立腺癌治療およびその病態生理の理解に関係することも示唆された。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

野村 昌史 (NOMURA MASAHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00420167