

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791107

研究課題名（和文） 前立腺癌増悪機構における上皮間質相互関係の役割

研究課題名（英文） Role of prostate tumor-stromal interaction in prostate cancer progression

研究代表者

重村 克巳（SHIGEMURA KATSUMI）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：00457102

研究成果の概要（和文）：前立腺癌細胞株 LNCaP は Dihydrotestosterone によりその増殖が増強され、sonic hedgehog (Shh) シグナル伝達系の阻害剤である Cyclopamine の添加によりそれが抑制された。さらに前立腺間質細胞において、癌関連部位ではなく非癌部位由来間質細胞のみが同様の結果を示し、Shh シグナルと Androgen receptor の Link に関与する可能性が示唆された。また前立腺癌摘出標本を用いた免疫染色において前立腺間質領域での Osteonectin (ON) の過剰発現が主に前立腺上皮から発生する血清 PSA 値が有意に相関する結果を示し、これらから前立腺上皮間質相互作用により前立腺癌の増悪さらには骨転移能の獲得に寄与する、という可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Cell growth of prostate cancer cell line LNCaP was enhanced by Dihydrotestosterone and the addition of sonic hedgehog (Shh) signaling inhibitor, cyclopamine could block the enhanced cell growths. Like as above, our data with prostate stromal cells showed normal prostate stromal cells, not cancer associated stromal cells, has the same results as LNCaP and therefore possible link of Shh signaling with AR. In addition, we did immunohistochemical stainings using radical prostatectomy specimen of prostate cancer patients and showed the expression of osteonectin (ON), a bone and cell proliferative marker, in prostate stromal lesion had significantly correlated with serum PSA value derived from prostate epithelial cells, suggesting ON expressed in prostate stromal lesions may lead to prostate cancer progression and acquisition of bone metastatic potential partly through prostate epithelial - stromal interaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、ホルモン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の治療においては、特に転移を有するもの、または術後に再発をきたしたのものに関してはほとんどの場合でホルモン治療がおこなわれるが、一旦ホルモン抵抗性に転じると現在のところコンセンサスの得られている治療法は無く、その予後は厳しいものがある。その中で現在、ホルモン抵抗性前立腺癌治療法確立のために様々な研究がなされているが、抗癌剤治療など副作用が多いものが多く臨床的には継続が困難な場合が多い。その状況の中で現在、泌尿器科領域においては特に腎癌で分子標的治療が試みられており、その有効性が多く報告されている (Barakardら、Ann Oncol. 2007;18 Suppl 6:vi22-5)。これまでの研究で前立腺癌はその増悪の過程において癌が発生する上皮、そしてその周囲の間質が互いに相互に関係しあって癌の増悪に寄与していることが知られている。そしてさらなる臨床応用を目的として、最近の分子標的治療の臨床応用への発展も鑑み、本研究のホルモン抵抗性前立腺癌へ貢献できる可能性は高いと考えた。同時に本研究で用いている Sonic hedgehog (以下 Shh) という膜タンパクは胎児の尿路原基の上皮などでその発現が多いことはよく知られており、さらには細胞増殖、細胞分裂がより起こっているところでの発現が多いという特性から癌においてもその発現は多いといわれている。そこでは Shh-Gli シグナル伝達系が働き細胞増殖さらには癌増悪に関わっているとされている。本研究ではその Shh の前立腺癌の増悪における上皮 (癌) - 間質相互関係へ与える影響を解明する。そして Shh-Gli シグナル伝達系がこれらの関係においてどのように動くかも解明したい。

2. 研究の目的

前立腺癌、それも特にホルモン抵抗性前立腺癌における増悪のメカニズムを上皮 (癌) - 間質相互作用が癌増悪に大きく寄与している、という報告があり、その相互作用を胎児尿路原基上皮 (Zhu ら、Prostate;2007:67:674-684) ならびに癌 (Fan ら、Endocrinology; 2004;145:3961-70) でその発現が多いとされている膜蛋白 Shh への反応ならびに細胞内 Shh-Gli シグナル伝達との関連で研究し、そのシグナル伝達の阻害剤による腫瘍増殖抑制効果を検討し、分子標的治療への可能性を *in vitro* ならびに *in vivo* で探求するというものである。さらには前立腺癌の増悪因子であるアンドロゲンの細胞内受容体であるアンドロゲンレセプター (AR) と Shh シグナル伝達がどのように関わりホルモン抵抗性を獲得するかも模索したい。

3. 研究の方法

In vitro においてホルモン感受性前立腺癌細胞株、ならびにホルモン抵抗性前立腺癌細胞株、そして前立腺肥大症領域関連前立腺間質細胞、前立腺癌領域関連前立腺間質細胞、これら細胞株を用いて、まず Shh-AR シグナル伝達の link を調べるために Dihydrotestosterone (DHT) を細胞に作用させ、その細胞増殖に対する効果を cell growth assay にて検討した。さらにそこに Shh-Gli シグナル伝達の阻害剤 Cyclopamine を作用させて、その細胞増殖の抑制効果について MTS または alamar blue assay 法にて検討する。またその作用を見る上においても作用時間や濃度を変えることによってどの程度でそのシグナルが励起されるか、またはブロック

されるなども検討したい。さらにその target 遺伝子として細胞増殖、アポトーシスに関わるシグナル (Bad, Bcl-2, Bax, Gli 1, AR など)、さらに我々の preliminary data にて Shh-Gli のシグナル伝達系の target 遺伝子の可能性が示唆された osteonectin (ON) の発現を real time RT-PCR 法にて RNA 採取し、行い検討する。

そしてこれら in vitro の data を踏まえて、invivo data への link として前立腺癌の前立腺全摘除術標本を用いて、上記マーカーのタンパクレベルでの発現を見るために免疫組織学染色を行い、それらマーカーの発現とさらには臨床 data として血清の PSA 値と悪性度の指標とされている Gleason score との関連について検討する。さらに ON の発現が前立腺の上皮優位なのか間質優位なのかを検討し、上皮間質関係との関連づけも検討したい。

4. 研究成果

前立腺癌の増悪機構に関して、前立腺癌細胞株ならびに前立腺間質細胞を用いて、それらがどのように関わりあってそれに寄与しているか、さらにはある種の生存に関係するといわれているタンパクの前立腺癌組織での発現レベルを調べ、clinical data との相関を検討した。すなわち Shh シグナル伝達系が、これらとどのように関わるかを、その阻害剤である、Cyclopamine (Cyc) を用いて検討し、さらにその Shh シグナル伝達と Androgen receptor (AR) シグナル伝達がどのように Link するかも検討するため、DHT を上記細胞株に in vitro で作用させて、それらが、Cyc で Block され得るかを検討した。

その結果、前立腺癌細胞株 LNCaP は DHT の作用により、その細胞の増殖が増強され、Cyc の添加によりそれが抑制される事を見出し

た。またその抑制は Cyc の濃度依存性であった。さらに前立腺間質細胞においても同様の実験を行い、癌関連部位由来間質細胞、非癌部位由来間質細胞での差異を認めた。すなわち前立腺非癌部位由来間質細胞のみが Shh シグナルと AR の Link に関与する可能性が示唆された。また現在そのさらなるメカニズムの検討 (上記生存、アポトーシス関連マーカーを用いた real time RT-PCR) に関しては実験を進めている。また前立腺癌摘出標本を用いた免疫染色において、骨、生存マーカーとして知られる ON、Shh、Shh シグナル伝達系の下流タンパクである Gli 1、さらに AR、Ki67 に関して検討し、これらの過剰発現と臨床の現場で患者の前立腺癌の悪性度を測る指標として知られる Gleason score、さらに前立腺癌の腫瘍マーカーである前立腺特異抗原 PSA の 2 つのマーカーとの関連を統計学的に検討し、癌が発生すると考えられている前立腺の上皮領域ではなく、前立腺間質領域での ON の過剰発現と血清 PSA 値が有意に相関し、さらに Ki67 の過剰発現と Gleason score とが有意に相関する結果を示した。これらの data と PSA は前立腺の主に上皮から発生すると考えられていることから考えると、ON のむしろ前立腺上皮 (癌は主に上皮より発生) よりも間質においてその発現は前立腺癌の生存さらには骨化 (骨転移能の獲得) に、上皮 (PSA) 間質 (ON) 相互作用により寄与する、または寄与している可能性がある、という知見が得られ、ホルモン抵抗性前立腺癌の一つの生存シグナルとなりうる可能性が示唆された。

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 1 件）

① 重村克巳. Active Potential of Sonic Hedgehog Signaling between Human Prostate Cancer Cells and Normal/Benign but Not Cancer-Associated Human Prostate Stromal Cells. 第 61 回日本泌尿器科学会西日本支部総会, H21.11.7, 高松市

〔図書〕（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重村 克巳 (SHIGWMURA KATSUMI)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：00457102