

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590450

研究課題名（和文） ホルモン感受性癌の増殖・進展に関わるマクロファージの役割

研究課題名（英文） Molecular mechanism of hormone therapy resistance in cancers

研究代表者

桑田 健 (KUWATA TAKESHI)

独立行政法人国立研究センター・臨床開発センター・医長

研究者番号：00327321

研究成果の概要（和文）：前立腺癌のホルモン療法抵抗性における分子機構の解明を行った。LNCap をはじめとした複数の細胞株を用いた検討ではマクロファージから産生される IL-1beta は腫瘍細胞の増殖を抑制した。一方、副腎において産生されるアンドロゲン前駆体をテストステロンへと変換させるアンドロゲン合成酵素を発現させた LNCap 細胞は *in vitro* においてアンドロゲン前駆体による AR 活性化が観察され、*in vivo* において徐辜マウスでの腫瘍の生着を促進させた。これらの結果から、アンドロゲン合成酵素発現が、前立腺癌のホルモン療法に対する治療抵抗性に関与する分子機構であることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：Molecular mechanism of hormone therapy resistance, especially in prostate cancer, was investigated. Interleukin(IL)-1beta showed tumor inhibitory effect in several prostate cancer cell lines including LNCap, while a previous report suggested possible involvement of IL-1beta in the resistance. Constitutive expression of these enzymes support tumor cell growth in castrated nude mice. Thus we concluded that these results suggested expression of androgenic enzymes may be involved in acquired resistant against hormone therapy in cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学

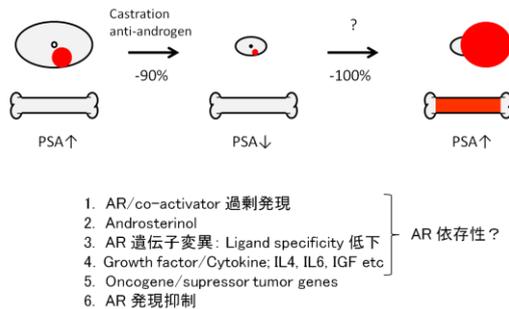
科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍

1. 研究開始当初の背景

乳癌および前立腺癌はそれぞれエストロゲン・プロゲステロンおよびアンドロゲン依存性の増殖・進歩を促すホルモン感受性癌として知られている。いずれもホルモン療法による一時的な治療効果が期待できるが、最終的にホルモン非依存性を獲得した腫瘍細胞が出現し治療抵抗性となる。このホルモン非依存性の獲得機構については未だその詳細は明らかになっていない。

ホルモン非依存性の獲得 (前立腺癌の場合)



2. 研究の目的

腫瘍周囲に浸潤するマクロファージの関与やステロイドホルモン合成に関わる酵素発現など、乳癌・前立腺癌のホルモン非依存性獲得に関わる分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

特に前立腺癌をモデルに、細胞培養系およびマウス移植系を用いて、アンドロゲン欠乏状態後に再増殖を促す腫瘍細胞に起こっている遺伝子発現変化を同定した。またホルモン治療後の前立腺癌組織において、その結果を検証した。

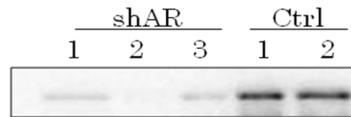
4. 研究成果

前立腺癌の抗アンドロゲン療法抵抗性において、マクロファージをはじめとした分子機構の解明を行い、以下の結果を得た。

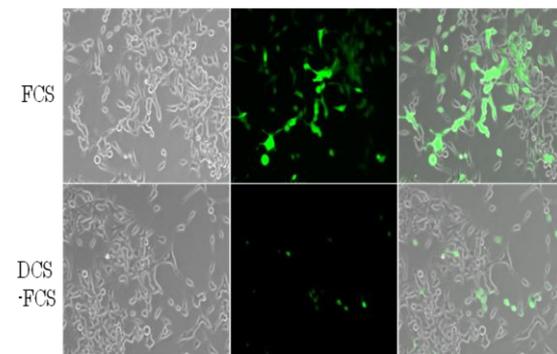
(1) マクロファージ由来サイトカインの関与
 マクロファージより産生される IL-1beta がホルモン療法抵抗性に関与するとの報告に反して、LNCap をはじめとした複数の細胞株を用いた検討では IL-1beta は腫瘍細胞の増殖を抑制した。

(2) アンドロゲン欠乏状態におけるアンドロゲン受容体の機能
 続いて、アンドロゲン欠乏状態においてアンドロゲン受容体が増殖抑制的に働いている可能性について検討した。アンドロゲン受容体に対する3種のshRNAを合成し、これによるアンドロゲン受容体発現のノックダウンを試みた。その結果、合成し

たいずれのshRNAもアンドロゲン受容体の発現量を減少させ、うち1ヶはほぼ完全にその発現を消失させた



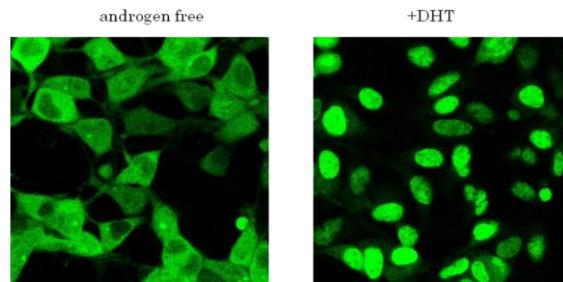
このshRNAによるアンドロゲン受容体の発現を恒常的に低下させた前立腺癌細胞株 LNCap をアンドロゲンを除去したDCS-FCSの存在下で培養すると、コントロールshRNA株と同様に、DCS-FCS下では増殖が抑制された。



このことから、ホルモン治療に対する治療抵抗性にはアンドロゲン受容体機能が保持されていることが必要であると考えられた。

(3) アンドロゲンによるアンドロゲン受容体の局在

EGFR とアンドロゲン受容体との融合蛋白 (EGFR-AR) を発現するベクターを構築し、HEK293細胞に発現させた。アンドロゲンを除いたDCS-FCSでの培養条件では、EGFR-ARは細胞質に局在した。一方、アンドロゲン添加によりARは速やかに核内へと移行した。

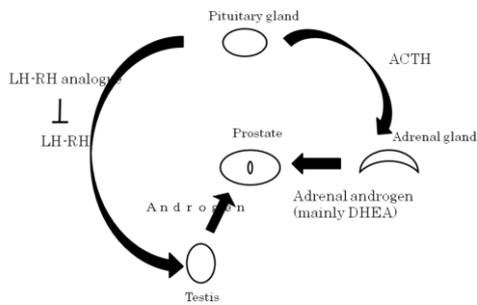


一方、ホルモン療法を受けた前立腺癌組織において、アンドロゲン受容体は核内に存在していた。このことから、ホルモン療法に対する治療抵抗性に、アンドロゲン受容体の活性化をきたす物質の存在が示唆された。

(4) 副腎由来アンドロゲンの関与
 これまでに、ホルモン療法施行時においても、

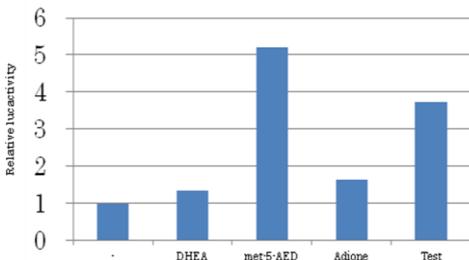
副腎由来アンドロゲンが産生されることでアンドロゲン受容体を活性化する機構が報告されている。

抗アンドロゲン療法抵抗性:副腎由来アンドロゲン

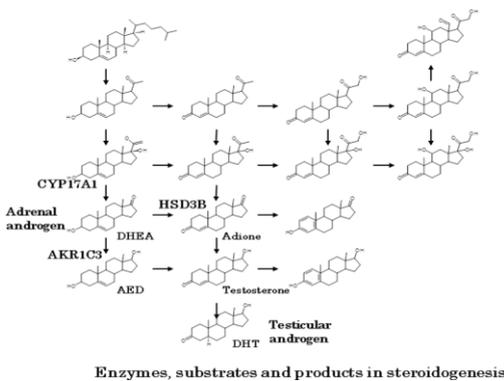


この知見に基づき、続いてホルモン治療抵抗性における副腎由来アンドロゲンの関与を検討した

アンドロゲン受容体による転写活性化の指標となるアンドロゲン応答 DNA 配列を用いた検討では、副腎由来アンドロゲンは精巣から分泌されるテストステロンに対し、弱い活性しか有しなかった。

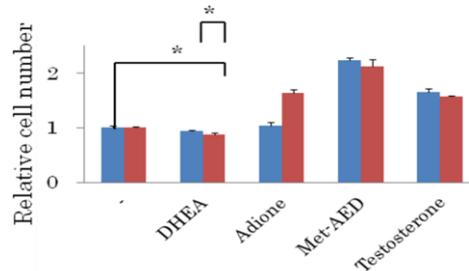


このことから、副腎由来アンドロゲンがホルモン治療抵抗性に関与するためには、副腎由来アンドロゲンを精巣型のテストステロンに変換させることが必要であると考えられた。



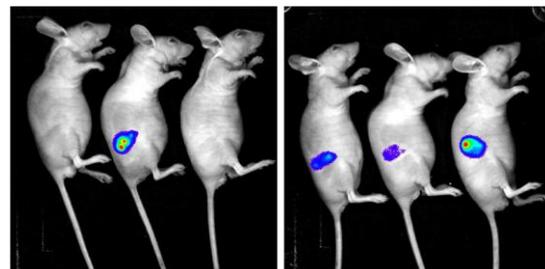
(5) アンドロゲン合成酵素発現

副腎由来アンドロゲンをテストステロンへと変換させる酵素としては、HSD3B2 と AKR1C3 が知られている。アンドロゲン合成酵素を恒常的に LNCap に発現させることにより、in vitro において腫瘍細胞は副腎由来アンドロ



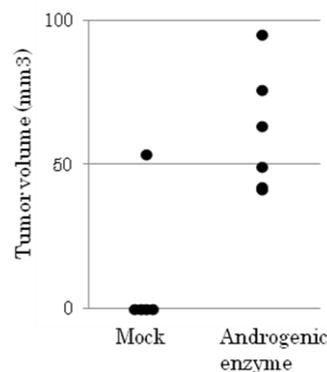
ゲンにより増殖能が更新した。

続いてアンドロゲン合成酵素を恒常的に発現する LNCap 細胞を用いて、精巣除去マウスにおける腫瘍生着能を検討した。この際、LNCap 細胞に Luciferase 遺伝子を発現させることで、in vivo imaging による定量化を可

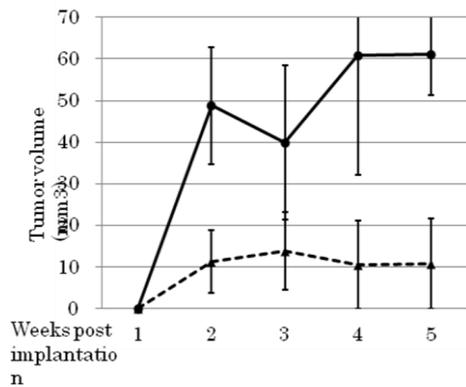


能とした。

この系による検討の結果、アンドロゲン合成酵素を発現する LNCap 細胞はコントロールに比して、有意に生着率が上昇した。



また経時的観察でも腫瘍増殖能の亢進が確認された



(6) まとめ

アンドロゲン前駆体をテストステロンへと変換させる酵素は、アンドロゲン欠乏状態にした腫瘍細胞で発現亢進しており、これらの酵素を発現させた前立腺癌細胞株 LNCap は in vitro においてアンドロゲン前駆体による AR 活性化が観察され、in vivo において徐寧マウスにおいて腫瘍の生着を促進させた。これらの酵素発現は抗アンドロゲン療法が施行された前立腺癌症例において発現亢進しており、ヒト前立腺癌の治療抵抗性に関与する分子機構であることが強く示唆された。

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 1 件)

Kimura T, Kuwata T, Ashimine S, Yamazaki M, Yamauchi C, Nagai K, Ikehara A, Feng Y, Dimitrov DS, Saito S, Ochiai A, Targeting of bone-derived insulin-like growth factor-II by a humanizing antibody suppresses the growth of prostate cancer cells in a human bone environment、Clinical Cancer Research、査読有、16 巻 2010、121-129

DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0982

[学会発表] (計 3 件)

① Kuwata T and Ochiai A Aldo-keto reductase(AKR) 1C3 expression is frequently observed in human prostate cancer cases after androgen-therapy and promotes prostate cancer cell growth in castrated mice model AACR-EORTC-NCI Molecular Targets and Cancer Therapeutics Conference、平成 23 年 11 月 14 日、米国

② 桑田 健、落合淳志 前立腺癌の抗アンドロゲン療法抵抗性獲得におけるアンドロゲン合成酵素発現の関与 日本病理学

会総会 平成 23 年 4 月 30 日、横浜

③ 桑田 健、落合淳志 前立腺癌の抗アンドロゲン療法抵抗性におけるステロイド合成酵素発現の関与 日本病理学会総会 平成 22 年 4 月 28 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑田 健 (KUWATA TAKESHI)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・医長

研究者番号：00327321

(2) 研究分担者

落合淳志 (OCHIAI ATSUSHI)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・部長

研究者番号：60183034

(3) 連携研究者

()

研究者番号：