

## 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 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659290

研究課題名（和文）イオン輸送体を分子標的としたホルモン不応性前立腺癌新規治療薬の開発

研究課題名（英文）The development of novel molecular therapeutic agents targeting ion transporters for the treatment of hormone refractory prostate cancer

研究代表者

三木 恒治 (MIKI TSUNEHARU)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：10243239

研究成果の概要（和文）：

アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株において、 $K^+/Cl^-$  cotransporter (KCC) を制御することで細胞内  $Cl^-$  濃度 ( $[Cl^-]_i$ ) の低下が生じ、細胞増殖が抑制されることを確認した。KCC を活性化する薬剤、*N*-ethylmaleimide (NEM) の誘導体を作製してアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞に処理し、より特異的に作用する誘導体をスクリーニングした。マウス前立腺癌モデルに NEM 誘導体を投与した際に、抗腫瘍効果があることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

We showed that activation of  $K^+/Cl^-$  cotransporter (KCC) led the intracellular  $Cl^-$  concentration of androgen-independent prostate cancer cells and decreased proliferation of the cells. We produced various derivatives of *N*-ethylmaleimide (NEM), KCC activator, and investigated the effect of them on proliferation of androgen-independent prostate cancer cells. The specific derivative for the cells induced the antitumor effect in mouse model of prostate cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	0	1,400,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	450,000	3,350,000

研究分野：泌尿器科学

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、細胞増殖、クロライドイオン、KCC、N-ethylmaleimide

### 1. 研究開始当初の背景

現在のところ、ホルモン不応性前立腺癌に対して確立された治療法はなく、病状の進行を抑制することは困難である。近年、我々の胃癌細胞を用いた研究結果から、細胞質内のCl<sup>-</sup>濃度 ([Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>) の低下が細胞増殖を抑制することが明らかとなった。また、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株である PC3 細胞においても、[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> のわずかな減少によって細胞増殖が顕著に抑制されることが示された。

### 2. 研究の目的

これまでの研究結果から、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株である PC3 細胞では、細胞増殖抑制に対する [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> 感受性が非常に高いことが明らかとなった。本研究では、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞では、細胞内 Cl<sup>-</sup> の細胞増殖効果に対する感受性が亢進しているという実験仮説を提唱し、[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> の維持に関与している K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter (KCC) を分子標的とするホルモン不応性前立腺癌に対する特異的増殖抑制薬剤の開発を試みることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)通常および低 Cl<sup>-</sup>濃度の培養液でアンドロゲン非依存性前立腺細胞を培養し、細胞数を比較する。[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> を強制的に低下させた際に、アンドロゲン非依存性前立腺細胞株において、増殖抑制効果が生じているかどうかを確

認する。

(2)前立腺癌細胞株に、KCC の活性化剤としての報告のある N-ethylmaleimide (NEM) を処理した際に、KCC の活性化が引き起こされるかについて確認する。

(3)前立腺癌細胞株において、NEM を処理した際に、[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> の減少が引き起こされるか、また同条件にて培養を行った各細胞の増殖に対する影響を確認する。

(4)前立腺癌細胞に対する特異性や KCC の活性化効果の向上をめざして NEM の誘導体の作製を行う。

(5)アンドロゲン非依存性前立腺癌皮下腫瘍モデルマウスを作製し、細胞増殖抑制効果の高い NEM 誘導体を、モデルマウスに投与した後、継時的に NEM 誘導体の血中濃度と腫瘍サイズの測定を行い、腫瘍縮小効果の有無を確認する。

#### 4. 研究成果

(1)アンドロゲン除去または通常のウシ胎児血清を添加した培養液中で、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 (PC3) とアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 (LNCaP) および正常前立腺細胞株を培養した後、低  $\text{Cl}^-$  培養液に置換し、MTT アッセイおよびダイレクトカウンティング法により細胞数を計測した。通常の  $\text{Cl}^-$  濃度の培地で培養した細胞との細胞数を比

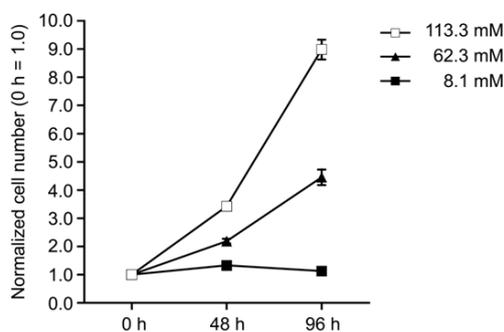


図1 低 $[\text{Cl}^-]_i$ でのアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株(PC3)の培養

較することで、 $[\text{Cl}^-]_i$ を強制的に低下させた際に増殖抑制効果が異なるか否かについて検討を行ったところ、PC3細胞では低 $[\text{Cl}^-]_i$ 環境において細胞増殖が著明に抑制され(図1)、その程度はアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株であるLNCaP細胞よりも顕著であった。

(2)アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株(PC3)およびアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株(LNCaP)に、 $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  cotransporter (KCC)の活性化剤としての報告のあるNEMを処理した際に、KCCの活性化が引き起こされるかを確認した。どちらの細胞株においてもNEMによって細胞外への $\text{K}^+$ の輸送は活性化された。KCCの阻害剤であるDIOAで前処理同様の測定を行った際には、NEMによる $\text{K}^+$ の輸送の活性化は認められなかつ

たため、NEMの効果がKCCを介したものであることが確認された。

(3)アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株(PC3)およびアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株(LNCaP)において、NEMを処理したところ、どちらの細胞株においても $[\text{Cl}^-]_i$ の減少が引き起こされ、細胞増殖の抑制が認められた。この効果はアンドロゲン非依存性細胞株であるPC3においてより顕著であった。この実験によって、NEMがKCC活性を亢進させたことによる $[\text{Cl}^-]_i$ の低下が、細胞増殖抑制を引き起こすことが確認された。

(4)より前立腺癌細胞に対する特異性やKCCの活性化効果の向上をめざし、NEMの誘導体の作製を行った。NEMの官能基を置換・追加した複数の誘導体を合成した。新規合成NEM誘導体はいずれも再結晶を行うことにより精製し、核磁気共鳴スペクトルや赤外・紫外吸収スペクトルなどのスペクトル測定、および元素分析測定を行うことによりその構造決定および純度検定を行った。

新規作成したNEM誘導体について、前立腺癌細胞のKCCに対する特異性を検証した。アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株(PC3、LNCaP-LNO)、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株(LNCaP)、各種癌細胞株、各種正常細胞株に対してNEM誘導体を処理し、KCC輸送活性の評価や、 $[\text{Cl}^-]_i$ および細胞増殖抑制に対する影響について確認した。これらの結果から、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞に対して最も特異性および細胞増殖抑制効

果が高い NEM 誘導体のスクリーニングを行った。

(5)ヌードマウスに、PC3 細胞および LNCaP-LNO 細胞を皮下注射し、アンドロゲン非依存性前立腺癌皮下腫瘍モデルマウスを作製した。上記(4)でスクリーニングした、最も細胞増殖抑制効果の高い NEM 誘導体を、モデルマウスに経口投与した後、継時的に NEM 誘導体の血中濃度と腫瘍サイズの測定を行い、腫瘍縮小効果の有無を確認した。通常マウスの他に、去勢マウスにおける腫瘍縮小効果も比較した。新規に合成した NEM 誘導体によって、前立腺癌皮下腫瘍モデルマウスにおける腫瘍の縮小効果が確認された。

本研究は、細胞内のイオン環境変化、特に細胞内  $Ca^{2+}$  が細胞増殖を制御しているという点に着目した全く新しいアプローチからの研究であり、KCC をターゲットとした NEM 誘導体による新たな治療法の開発は、有効な治療法がなかったホルモン不応性前立腺癌治療におけるブレークスルーに成りうると思われる。

#### 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)

[学会発表] (計 1 件)

①平岡健児、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞 PC3 において細胞内クロライドイオンは増殖調節因子として作用する、第 98 回日

本泌尿器科学会総会、2010 年 4 月 27 日、盛岡市

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

三木 恒治 (MIKI TSUNEHARU)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：10243239

##### (2)研究分担者

河内 明宏 (KAWAUCHI AKIHIRO)  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：90240952

本郷 文弥 (HONGO FUMIYA)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：80291798

木村 泰典 (KIMURA YASUNORI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：20398374

丸中 良典 (MARUNAKA YOSHINORI)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：00127036

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：