

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592398

研究課題名(和文) 進行性前立腺癌における新しい治療ターゲットの探索

研究課題名(英文) Search for a new target therapy in the advanced prostate cancer

研究代表者

賀本 敏行 (Kamoto, Toshiyuki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：00281098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：CRPCおよびnon-CRPCの患者血漿CAV1濃度をELISA法にて比較検討した結果、CRPC群で有意に高値であった($p<0.004$)。また、in vitroでもLNCaPと比較してPC3でCAV1の高発現を認めた($p<0.0001$)。さらに、前立腺癌患者と健常成人男性の間でCAV1T29107A遺伝子多型と前立腺癌の発症の相関を検討した結果、genotype distributions、allelic frequenciesとも統計学的有意差を認め、AA genotypeが前立腺癌の発症リスクを減少させる可能性があることが示唆された(OR 0.35, $P=0.033$)。

研究成果の概要(英文)：We evaluated associations between plasma CAV1 levels and prostate cancer in Japanese men, and CAV1 expression in PC3 and LNCaP cell lines. As a results, plasma CAV1 levels in patients with CRPC were much higher than in those with non-CRPC($p<0.004$). In vitro analyses showed CAV1 protein and mRNA in PC3 cells to be significantly overexpressed compared to that in LNCaP cells ($p<0.0001$). In conclusion, our results support the possibility of CAV1 as a therapeutic target for CRPC. And then, we evaluated the relationship between the CAV1 T29107A polymorphism and the risk of prostate cancer among Japanese populations. As a results, logistic regression analysis of case and control outcomes showed an odds ratio of 0.35 ($p=0.033$) between the TT and AA polymorphisms, indicating a reduced risk of prostate cancer to be associated with the AA polymorphism. Our results support the hypothesis that this polymorphism may influence susceptibility to prostate cancer.

研究分野：癌

キーワード：前立腺 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

近年 PSA の普及により前立腺癌罹患率が著明に増加しており、2020 年には 78,468 人と肺癌に次いで男性癌の 2 番目になると予測されている (前立腺がん検診ガイドライン 2008; 3-5)。治療においてはホルモン治療、外科手術、放射線療法、化学療法などがあり、状態によって最適な治療法がとられる。いずれも確立されている治療法ではあるが、特に転移性前立腺癌において数年以内にホルモン治療に抵抗性を示す症例が多く認められ、このようなホルモン治療抵抗性前立腺癌 (以下 CRPC) に対する有効な化学療法は少ない。その中でドセタキセルは臨床試験において全生存期間 (OS) の有意な延長を示し、CRPC のファーストラインの標準治療とされている (Berthold DR et al., J Clin Oncol., 2008)。しかし、ドセタキセルに抵抗性を示し、または毒性で治療継続困難になった CRPC 患者へのセカンドライン治療はまだ確立されていないのが現状である。Caveolin-1 (以下 CAV1) は分子量 22kD 程度の caveolae (細胞膜陥没構造; ほとんどすべての細胞の形質膜上に認められるフラスコ状の窪みで、細胞外に存在するコレステロールの取り込みに関与する。CAV1 はカベオラの形態形成や機能に重要な役割を果たしていると考えられている。) を構成する主要蛋白の一つであり (Sternberg PW et al., Nat Cell Biol., 1999) 泌尿器癌における高発現が報告されている。特に前立腺癌において発現が亢進しているといわれ、癌の進行度や治療抵抗性、再発率に関係しているとの報告がある (Paul G Corn et al., Cancer Management and Research., 2010)。CAV1 陽性前立腺癌患者は陰性患者に比べ癌の進行が早いとの報告や、この CAV1 の発現を抑制することで特に CRPC 患者への治療効果が認められたとの報告もある (Karam JA et al., Prostate., 2007)。しかしその詳細なメカニズムは明らかになっ

ていない。体内のアンドロゲンは精巣および副腎でコレステロールより合成される。DHEA は生殖腺などの他の組織中でテストステロンやジヒドロテストステロン (DHT) のような強活性型のアンドロゲンに変換されてアンドロゲン作用を発揮する。近年、臨床前立腺癌組織中において種々のアンドロゲン合成酵素の発現が亢進し、前立腺癌細胞自身がアンドロゲンを産生することが報告されている (Pal SK et al., Maturitas., 2009)。現在のところ、精巣、副腎および前立腺癌組織に共通してコレステロールからアンドロゲンが合成されると考えられている。特に 17, 20 -リアーゼはすべてのアンドロゲン合成に必須の酵素であるが故、副腎あるいは前立腺癌組織におけるアンドロゲン合成を阻止するためには、17, 20 -リアーゼの働きを阻害すればよいといえる。以上の経緯にてこれらの酵素を選択的に阻害する Abiraterone acetate などの薬剤が開発され、現在臨床の場において良好な成績を示し CRPC 治療のセカンドラインとして期待されている (Yap TA et al., Nat Rev Clin Oncol., 2011)。しかし、アンドロゲン合成の基盤となるコレステロール輸送の観点から CRPC 発症の機序の解析および新規治療の探索を行った研究はほとんどない。そこで本研究では CAV1 の発現および機能をさらに解析し、CAV1 を抑制することでカベオラの形成を減少させ、結果コレステロールの細胞内取り込みを抑制することで CRPC における内因性アンドロゲンの合成を低下させうかの解明を行いたいと考えている。結果、上記 CRPC に対するセカンドライン薬剤と別の機序を利用した新規薬剤の開発が期待できると考える。

2. 研究の目的

ホルモン治療抵抗性前立腺癌 (以下 Castration-Resistant Prostate Cancer:CRPC) は、転移性前立腺癌に対するホルモン治療後に抵抗性を示す難治性前立腺癌であり有効な

治療法が確立されていない。CAV1は前立腺癌の新規マーカー候補であり、かつ治療標的としての可能性を持つ細胞膜タンパク質である。本研究ではCRPCにおけるCAV1及びその関連分子の発現解析、臨床検体と培養細胞を用いたin vitro及びin vivo実験系による細胞増殖や浸潤能等の機能解析、臨床データによる悪性度との関連性等と共に解析し、CRPCにおけるCAV1を用いた診断法の開発や新規治療法の開発へ結び付ける。

3. 研究の方法

CRPCにおけるCAV1の基礎研究から臨床応用へと展開するために、本研究計画では以下の研究項目を予定した。

臨床サンプルのCAV1の発現解析および

CAV1遺伝子多型の解析

CRPC組織中のコレステロール濃度及びアンドロゲン発現量の解析

CRPCモデル(PC3)およびnon-CRPCモデル(LNCaP)などの前立腺癌細胞株を用いたCAV1発現、機能解析

Caveolin-1遺伝子ノックダウン細胞株の作製とCAV1機能解析

In vivo前立腺癌モデルマウスにおけるCAV1の機能解析

4. 研究成果

まず、臨床サンプルを用いたin vivoでの検討結果を示す。CRPCおよびnon-CRPCの患者血漿CAV1濃度をELISA法にて比較検討した結果、CRPC群で有意に血漿CAV1濃度が高値であった(Student's t-test: $p < 0.004$)。

また、CAV1 T29107A(rs7804372)遺伝子多型と前立腺癌発症の関連性も示唆されているため、前立腺癌患者と健常成人男性の間でこの多型と前立腺癌の発症の相関を検討した結果、genotype distributions ($P=0.0045$), allelic frequencies ($P=0.0018$)と統計学的有意差を認めた。Logistic regression analysisにおいてもAA genotypeが前立腺癌の発症リスクを減少させる可能性があることが

示唆された(OR 0.35, 95% CI 0.13-0.91, $P=0.033$)。次に、Cell lineを用いたin vitroでの検討結果を示す。CRPC modelとしてPC3、non-CRPC modelとしてLNCaPを用いそれぞれのCAV1の発現をmRNA levelおよびタンパクレベルで比較検討した。結果、mRNA level、タンパクレベルともPC3で有意に高発現していることが分かった(Student's t-test: $p < 0.0001$)。さらに、CAV1特異的siRNAを用いてCAV1高発現細胞株であるPC3に対して導入し、CAV1のノックダウンを行った。PC3 CAV1 KD株とコントロール株との間でPI3K-AKT情報伝達系などのシグナル伝達経路の活性化の検討を行った結果、PC3 CAV1 KD株においてmRNA levelではあるがSTAT3の著明な発現抑制を認め、CAV1がこのSTAT/Junk経路の活性化に関与している可能性が示唆された。また、興味深いことにPC3 CAV1 KD株ではその共役分子と言われるCAV2の発現抑制を認め、かつこのCAV2をKDすると同じくCAV1の発現が抑制されるといった連動性も確認できた。

加えて近年、CRPCと関連があると示唆されているFSHRについてもPC3 CAV1およびCAV2 KD株ではコントロール株に比べ強く発現抑制され、これらCAV familyがFSHRなどの性ホルモンレセプターの発現に深く関わっている可能性が示唆された(unpublished data: Fig.5)。尚、CRPC組織中のコレステロール濃度およびアンドロゲン発現量の測定に関して、市販されているキットを使用し得られた結果を臨床データとともに統計的解析を行う予定であったが、条件設定の段階で信頼性のある実験結果を得ることができず今回の研究では明らかにすることができなかった。

(詳細)

前立腺癌患者血漿および細胞株におけるCaveolin-1の発現とその意義に関する検討

(目的) CAV1 は分子量 22kDa 程度のカベオラ (細胞膜陥没構造) を構成する主要蛋白の一つであり、泌尿器癌における高発現が報告されている。欧米では、特に前立腺癌において発現が亢進しているといわれ、癌の進行度や治療抵抗性、再発率に関係しているとの報告が散見される。今回我々は前立腺癌進行度と血漿 CAV1 level の相関および PC3 や LNCaP などの cell line における CAV1 の発現も検討した。**(対象と方法)** 対象は宮崎大学泌尿器科及びその関連病院にて加療中の去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) 36 例、ホルモン感受性前立腺癌 (non-CRPC) 22 例の total 58 例 (Table.1)。対象より得られた血漿を用いて CAV1 level を市販の ELISA kit にて測定した。またそれぞれの cell line から total RNA およびタンパク質を抽出し、quantitative Real-time RT-PCR および western blotting にて CAV1 mRNA および CAV1 の発現を検討した。**(結果)** 血漿 CAV1 level は non-CRPC 群と比較して CRPC 群で有意に増加していた ($1.46 \pm 1.37 \text{ ng/ml}$ in CRPC; $0.56 \pm 0.32 \text{ ng/ml}$ in non-CRPC, $p < 0.004$) (Fig.1)。また cell line においても CAV1 および CAV1 mRNA とともに LNCaP (non-CRPC model) に比べて PC3 (CRPC model) で有意に高発現していた ($p < 0.0001$) (Fig.2, 3)。**(結論)** 血漿 CAV1 level と前立腺癌進行度に有意な相関を認めた。また cell line における検討でも CAV1 は LNCaP に比較して PC3 で高発現していた。今回の検討で CAV1 は CRPC における新規マーカーや治療ターゲットになりうる可能性が示唆された。今後より多くの症例を集積し、さらなる検討が必要であると考えられる。

Table.1 患者臨床背景

Fig.1 血漿 CAV1 濃度 (ng/ml)

	CRPC	Non-CRPC	p value
Age, years (mean±SD)	68.7 ± 7.7	66.2 ± 9.2	0.18
PSA (ng/ml) (mean±SD)	41.8 ± 25.4	8.8 ± 4.1	<0.001
Gleason grade, n (%)			
Low	2 (5.6)	4 (18.2)	0.045
Intermediate	8 (22.2)	9 (40.9)	
High	25 (72.2)	9 (40.9)	
T grade, n (%)			<0.004
T1c	7 (19.4)	13 (59.1)	
T2	29 (80.6)	9 (40.9)	
N, n (%)			<0.001
Negative	16 (44.4)	22 (100)	
Positive	20 (55.6)	0 (0)	
M, n (%)			<0.001
Negative	7 (19.4)	22 (100)	
Positive	29 (80.6)	0 (0)	
Plasma CAV1 (ng/ml) (mean±SD)	1.46 ± 1.37	0.56 ± 0.32	<0.004
Total	36	22	

PSA, Prostate-specific antigen; CAV1, Caveolin-1; M, Metastasis
Based on Student's t test and Pearson's χ^2 test

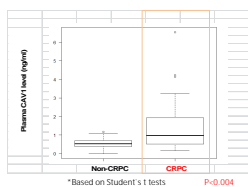
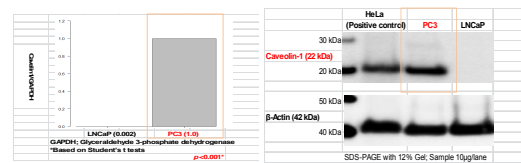


Fig.2 Real-time RT-PCR (CAV1 mRNA)

Fig.3 Western blot analysis



日本人男性における前立腺癌の発症、進展と Caveolin-1(CAV1) T29107A 遺伝子多型 (rs7804372) との関連

(目的) CAV1 は細胞膜陥没構造を構成する主要蛋白の一つであり、泌尿器癌、特に前立腺癌において発現が亢進しているといわれ、癌の進行度や治療抵抗性、再発率に関係しているとの報告が散見される (Paul G Corn et al., Cancer Management and Research., 2010)。さらにこの CAV1 の遺伝子多型と前立腺癌発症の関連性も示唆されており、特に Asian において前立腺癌の発症と CAV1 T29107A(rs7804372)との関連が報告されている。今回我々は Case と Control の間でこの多型と前立腺癌の発症の相関を検討し、ついで Case の中で悪性度 (GS, PSA grade, bone metastasis など) との相関も検討した。**(対象と方法)** 対象は宮崎大学泌尿器科及び藤元早鈴病院泌尿器科にて加療中の前立腺癌患者 (Case) 220 名および健診センターから得た健常成人男性 (Control) 122 名、total 342 名のうち age, smoking status を adjust させ、検討が可能であった 220 名 (Case 134, Control 86) (Table.2)。対象より得られた血液から DNA を抽出後、それを用いて CAV1 T29107A 遺伝子多型を PCR-RFLP 法を用いて解析した (Fig.4)。**(結果)** Case 68.3 ± 7.4 歳 (range, 61–75), Control 66.9 ± 8.3 歳 (range, 59–75) であり両群に差は認めなかった ($P=0.21$, not significant (NS))。また喫煙歴についても同様に差は認めなかった ($P=0.24$, NS)。CAV1 T29107A genotype と allele frequencies での検討では genotype distributions ($P=0.0045$), allelic frequencies ($P=0.00$

18)と統計学的有意差を認めた (Table.3)。 Logistic regression analysis においても AA genotype が前立腺癌の発症リスクを減少させる可能性があることが示唆された(OR 0.35, 95% CI 0.13–0.91, P=0.033)。 Case のみでこの遺伝子多型と clinicopathological characteristics (GS, PSA grade, bone metastasis)の相関について subset analysis を施行したが、両群において統計学的有意差を認めなかった (Table.4)。(結論)日本人男性において CAV1 T29107A 遺伝子多型と前立腺癌の発症に有意な相関を認めた。 Case のみの解析ではこの多型と臨床データに明らかな相関は認められなかったが、本検討は pilot study であり、今後より多くの症例の集積や cohort study によるさらなる検討が必要であると考えられる。

Table.2 臨床背景

Fig.4 PCR-RFLP

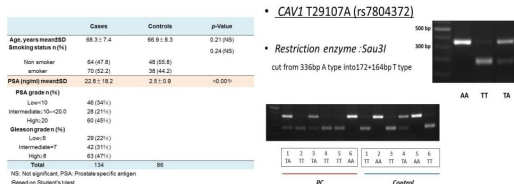


Table.3 rs7804372 と前立腺癌発生

Table.4 rs7804372 と前立腺癌進展

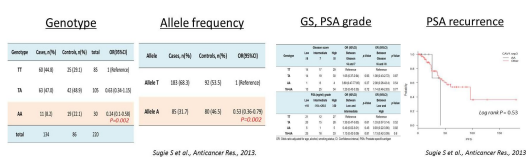
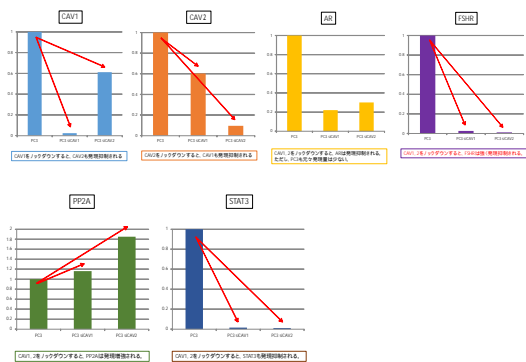


Fig.5 Real-time RT-PCR for PC3



5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計12件:全て査読あり)

1: Effect of dutasteride on microvessel density in benign prostatic hyperplasia.

Sugie S, Mukai S, Tsukino H, Iwamoto H, Kobayashi T, Toda Y, Kamoto T. In Vivo. 2014 May-Jun;28(3):355-9.

2: Risk factors for loss to follow-up during active surveillance of patients with Stage I seminoma.

Endo T, Kawai K, Kamba T, Inai H, Uchida K, Miyazaki J, Kamoto T, Ogawa O, Nishiyama H. Jpn J Clin Oncol. 2014 Apr;44(4):355-9. doi: 10.1093/jjco/hyu001..

3: Cyclooxygenase 2 genotypes influence prostate cancer susceptibility in Japanese Men.

Sugie S, Tsukino H, Mukai S, Akioka T, Shibata N, Nagano M, Kamoto T. Tumor Biol. 2014 Mar;35(3):2717-21. doi: 10.1007/s13277-013-1358-y.

4: Matriptase and MET are prominently expressed at the site of bone metastasis in renal cell carcinoma: immunohistochemical analysis.

Mukai S, Yorita K, Kawagoe Y, Katayama Y, Nakahara K, Kamibeppu T, Sugie S, Tsukino H, Kamoto T, Kataoka H. Hum Cell. 2014 Sep 4.

5: Plasma macrophage stimulating protein and hepatocyte growth factor levels are associated with prostate cancer progression.

Sugie S, Mukai S, Yamasaki K, Tsukino H, Kamoto T. HUM CELL. submitted

6: Presurgical treatment with axitinib in renal cell carcinoma patients with venous extension.

Mukai S, Kita Y, Fujita N, Akioka T, Kamibeppu T, Sugie S, Kida K, Onizuka C, Tsukino H, Kamimura T, Wakada H, Kamoto T. International Cancer Conference Journal. 10.1007/s13691-014-0203-5, 2014

7: Expression of human kallikrein 1-related peptidase 4 (KLK4) and MET phosphorylation in prostate cancer tissue: immuno-histochemical analysis. Mukai S, Y orita Y, Yamasaki K, Nagai T, Kamibeppu T, Sugie S, Kida K, Onizuka C, Tsukino H, Kamimura T, Kamoto T, Kataoka H. H UM CELL. doi: 10.1007/s13577-015-0114-6

8: Increased plasma caveolin-1 levels are associated with progression of prostate cancer among Japanese men. Sugie S, Mukai S, Tsukino H, Toda Y, Yamauchi T, Nishikata I, Kuroda Y, Morishita K, Kamoto T. Anticancer Res. 2013 May;33(5):1893-7.

9: Analysis of multimodal treatment outcome in renal cell carcinoma patients with bone metastasis. Mukai S, Tsukino H, Goto T, Sugie S, Shitamura T, Kamimura T, Kamoto T. Hinyokika Kyo. 2013 Apr;59(4):207-12.

10: Functional polymorphism in the CA V1 T29107A gene and its association with prostate cancer risk among Japanese men. Sugie S, Tsukino H, Yamauchi T, Mukai S, Fujii M, Shibata N, Kuroda Y, Kamoto T. Anticancer Res. 2013 Mar;33(3):1023-7.

11: Management for bone metastasis of prostate cancer. Kamoto T. Gan To Kagaku Ryoho. 2012 Aug;39(8):1178-82.

12: Urinary bladder pyogenic granuloma: a case report. Mukai S, Tanaka H, Yamasaki K, Goto T, Onizuka C, Kamoto T, Kataoka H. J Med Case Rep. 2012 Jun 12;6(1):149. doi: 10.1186/1752-1947-6-149.

【学会発表】(計2件)

1: 日本人男性における前立腺癌の発症、進展と Caveolin-1 (CAV1) T29107A 遺伝子多型 (rs7804372) との関連 ; 杉江悟、賀本敏

行他 ; 第 22 回泌尿器科分子細胞研究会、ホテル日航高知旭ロイヤル : 高知市、2013/3/9

2: 前立腺癌患者血漿および細胞株における Caveolin-1 の発現とその意義に関する検討 ; 杉江悟、賀本敏行他 ; 第 23 回泌尿器科分子細胞研究会、ホテルメトロポリタン山形 : 山形市、2014/3/15

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

賀本 敏行 (KAMOTO Toshiyuki)
(宮崎大学医学部外科学講座 泌尿器科学分野 教授) 研究者番号 : 00281098

(2) 研究分担者

森下 和広 (MORISHITA Kazuhiro)
(宮崎大学医学部機能制御学講座腫瘍生化学分野 教授) 研究者番号 : 80260321

向井 尚一郎 (MUKAI Shoichiro)
(宮崎大学医学部外科学講座 泌尿器科学分野 講師) 研究者番号 : 10315369

杉江 悟 (SUGIE Satoru)
(宮崎大学医学部外科学講座泌尿器科学分野 医員) 研究者番号 : 50626140

(3) 研究協力者

月野 浩昌 (TSUKINO Hiromasa)
(宮崎大学医学部外科学講座泌尿器科学分野 講師) 研究者番号 : 60433059

上別府 豊治 (KAMIBEPPU Toyoharu)
(宮崎大学医学部外科学講座泌尿器科学分野 医員) 研究者番号 : 90649641