

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592412

研究課題名(和文) 前立腺癌に対する分子治療薬療法におけるシグナルクロストークの解明

研究課題名(英文) Signal crosstalk in molecular targeted therapy for prostate cancer

研究代表者

清田 浩 (Kiyota, Hiroshi)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：30153240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は前立腺癌マウス皮下移植モデルJDCaPを用い、前立腺癌における発癌・増殖シグナル経路のクロストークを解明することを目的とした。JDCaPはARやPSA、ERGなどの前立腺癌特異的マーカーを発現し、さらにAR経路、チロシンキナーゼ～Aktシグナル経路など複数のシグナル経路が活性化していた。in vivo皮下移植モデルにおいて、内分泌治療(ビカルタミド)およびチロシンキナーゼ阻害剤(スニチニブ)共に抗腫瘍効果を示したが、スニチニブではチロシンキナーゼ経路などが阻害される一方でAR経路は活性化し、シグナルクロストークが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study was to elucidate the signal crosstalk in prostate cancer xenograft model, JDCaP. JDCaP expressed typical markers of prostate cancer such as PSA, AR and ERG. Several pathways including AR and tyrosine kinase-akt were activated in JDCaP. IN vivo xenograft model, both anti-androgen drug, bicalutamide and throsine kinase inhibitor, sunitinib showed anti-tumor effect. However, sunitinib inhibited tyrosine kinase pathway but activated AR pathway, which suggested signal crosstalk of both pathways.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌

## 1. 研究開始当初の背景

アジア人における前立腺癌の罹患率、死亡率は近年上昇している。前立腺癌の遺伝学的背景や分子生物学的特徴は地域間、人種間で異なっていることが報告されている (Yamada H, et al. J Natl Cancer Inst 2009;101:1330)。しかし、これまで多くの前立腺癌に対する研究は欧米諸国でなされ、アジア人に発生する前立腺癌の分子生物学的、臨床的特徴は十分に解明されていない。われわれはこれまでの研究で、日本人ホルモン抵抗性前立腺癌患者の皮膚転移より新規前立腺癌細胞株 (JDCaP) を樹立し、その生物学的特徴を報告した (Kimura T, et al. Prostate. 2009;69:1660)。JDCaP は野生型アンドロゲン受容体 (AR) を発現し、ホルモン依存性の増殖を示した。また、前立腺癌の特異的な遺伝子学的特徴である PCA3 mRNA の高発現と TMPRSS2-ERG 相互転座が確認された。さらに、PSA 発現、PTEN 陰性と前立腺癌の分子生物学的特徴を保持している。

一方、ホルモン抵抗性前立腺癌に対する新たな治療戦略として、分子標的治療薬の有用性が検討されている。チロシンキナーゼ阻害剤、mTOR 阻害剤など多くの薬剤が検討されているが、基礎研究では有効性を示す薬剤も、臨床試験ではほとんどの薬剤で有意な効果を認めていない。その原因には癌増殖シグナル経路におけるクロストークが影響を与えている可能性が考えられている。

これまで前立腺癌の増殖シグナルにおいては、AR 経路が中心的な役割を果たすと考えられてきた。しかし、ホルモン抵抗性獲得機序の解明が進むにつれて、前立腺癌においても他の固形癌同様、チロシンキナーゼ～Akt シグナル経路や Ras-MAP キナーゼシグナル経路も活性化していることがわかってきた。さらに、これらのシグナル経路はお互いにクロストークを持っていることが示唆され、それが、治療抵抗性の原因となっていることが考えられた。そこで、前立腺癌増殖シグナル経路におけるクロストークを解明は、前立腺癌に対する新規治療の開発に重要なテーマであると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は前立腺癌マウス皮下移植モデル JDCaP を用い、前立腺癌における発癌・増殖シグナルのクロストークを解明することを目的とした。従来前立腺癌モデルが継代する間に前立腺癌の生物学的な特徴が失われていくのに対し、JDCaP モデルは野生型 AR を発現し、ホルモン感受性があるだけでなく、PTEN 陰性、PCA3 mRNA の高発現、TMPRSS2-ERG 相互転座と前立腺癌の典型的な分子細胞学的特徴を保持したまま継代されている点で特徴的なモデルである。そしてその事は、分子標的治療薬の治療評価や耐性獲得機序の解明には極めて理想的なモデルと考えられる。これまで前立腺癌にお

いても多くの分子標的治療薬が検討されてきたが、前臨床試験では効果を認めるが、臨床試験ではほとんど薬剤が単剤としての有効性が示されていない。われわれはその原因が前立腺癌の heterogeneity により、同一患者の前立腺に活性化シグナル経路の異なる癌が存在している事、そして各シグナル経路のクロストークにより標的としたシグナルが不活化しても他のシグナルが活性化され、補填される事にあると考えた。現在前立腺癌の増殖シグナルには AR 経路、チロシンキナーゼ～Akt シグナル経路や Ras-MAP キナーゼシグナル経路などが関係していることが示唆されている。これらのクロストークを明らかにするために、まず、JDCaP モデルにおける各シグナル経路の活性化を解析した。次に、ホルモン療法やチロシンキナーゼ阻害剤、mTOR 阻害剤による in vivo 治療実験を行い、治療前後のシグナル経路の変化を解析した。さらに、各治療の併用実験を行い、併用治療の有用性を検討した。

## 3. 研究の方法

### JDCaP モデルにおける各シグナル経路の活性化を解析

これまでの検討で JDCaP は PSA 陽性 AR 陽性および野生型遺伝子配列、PTEN 陰性、PCA3 mRNA の高発現、TMPRSS2-ERG 相互転座と前立腺癌の典型的な分子生物学的特徴を保持していることがわかっているが、さらに分子生物学的特徴を解析する。解析は JDCaP 皮下腫瘍モデルから切除した腫瘍を用いて行った。

#### i) 前立腺癌マーカーの解析

AMACR, PSCA など前立腺癌マーカーについて、免疫染色および real time PCR 法により検討する。各種抗体は市販のものを用いる。さらにこれまでの当教室における臨床検体を対象としたプロテオミクス解析で前立腺癌における発現が高値であると考えられた分子 (SPINK1, SOX9, SPOP, FOXA1, MED12) についても検討を行った。

#### ii) 癌増殖シグナルの解析

代表的な癌増殖シグナル経路として AR 経路 (AR, HSP90)、Ras-MAPK 経路 (Ras, cRaf, MEK, MAPK)、チロシンキナーゼ～Akt 経路 (EGFR, Akt, GSK3b, NK κB, FKHR)、mTOR 経路 (mTOR, TSC1/2, PRAS40, 4E-BP1, p70-S6 等) の発現、リン酸化解析を行った。解析方法として、ウエスタンブロット法を用いた。

### ホルモン療法、分子標的治療による in vivo 治療実験とシグナル解析

JDCaP 皮下移植モデルを用いてホルモン療法、分子標的治療薬の効果を検討し、治療

前後のシグナル変化を解析した。本研究における動物実験に関しては、東京慈恵会医科大学の規程に基づき、実験動物委員会で承認済であるとともに、関連する法令を遵守して行った。

### i)治療実験

JDCaP を雄ヌードマウス(6週齢)皮下に移植し、腫瘍が200mm<sup>3</sup>を越えた段階で抗アンドロゲン剤(ピカルタミド 50mg/kg 週5回内服)投与、チロシンキナーゼ阻害剤(スニチニブ 80mg/kg 週5回内服)投与、mTOR 阻害剤(エベロリムス 10mg/kg 週5回内服)投与し、腫瘍径を測定した。

### ii)シグナル解析

実験 -i)同様に治療を行い、4週間後に腫瘍を摘出する。腫瘍より蛋白を抽出し、ウエスタンブロット法にてコントロール腫瘍および各治療群に関して、実験 -ii)で行ったシグナル解析を行う。

### ホルモン療法、分子標的治療の併用療法の有用性の検討

JDCaP を雄ヌードマウス(6週齢)皮下に移植し、腫瘍が200mm<sup>3</sup>を越えた段階で治療を行う。治療薬は実験の結果からホルモン療法(ピカルタミド 50mg/kg 週5回内服)、チロシンキナーゼ阻害剤(スニチニブ 80mg/kg 週5回内服)および両薬剤の併用とした。腫瘍径を測定すると共に副作用の有無も観察した。

## 4.研究成果

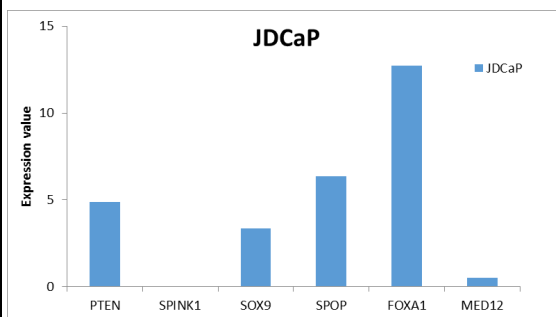
### 前立腺癌マーカーの解析

JDCaP における各前立腺癌マーカーの発現をウエスタンブロット、免疫染色および real time PCR 法にて解析した。表1および図1に各マーカーの発現プロファイルを示す。

表1

	免疫染色法	real time PCR
PSA	+	+
AR	+	+
ERG	+	+
PTEN	-	±
c-myc	+	
p53	-	
PCA3	+	
SPINK1		-
SOX9		+
SPOP		+
FOXA1		+
MED12		+

図1



### 増殖シグナルの解析

JDCaP における代表的な癌増殖シグナル経路としてAR 経路、Ras-MAPK 経路、チロシンキナーゼ~Akt 経路、mTOR 経路の発現、リン酸化解析をウエスタンブロット法を用いて行った。代表的な結果を表2に示す。JDCaP はAR 経路、Ras-MAPK 経路、チロシンキナーゼ~Akt 経路、mTOR 経路すべてが活性化していた。

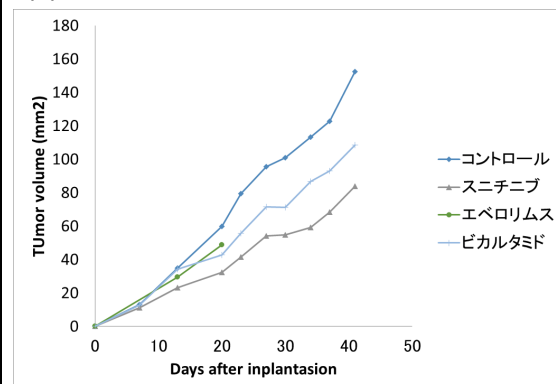
表2

AR	+
AKT	+
pAKT	+++
p-p70S6	+++
p-p44/42 MAPK	++

### ホルモン療法、分子標的治療による in vivo 治療実験

JDCaP を雄ヌードマウス(6週齢)皮下に移植し、腫瘍が200mm<sup>3</sup>を越えた段階で抗アンドロゲン剤(ピカルタミド)、チロシンキナーゼ阻害剤(スニチニブ)、mTOR 阻害剤(エベロリムス 2.5, 5, 10mg/kg 週5回内服)投与し、腫瘍径を測定した。ピカルタミド投与により腫瘍は縮小し、JDCaP の内分泌感受性が確認された。またスニチニブ投与でも腫瘍は縮小し、チロシンキナーゼ阻害剤の有効性も確認されたが、エベロリムス投与では副作用が強く、マウスは投与2週間に死亡した(図2)。

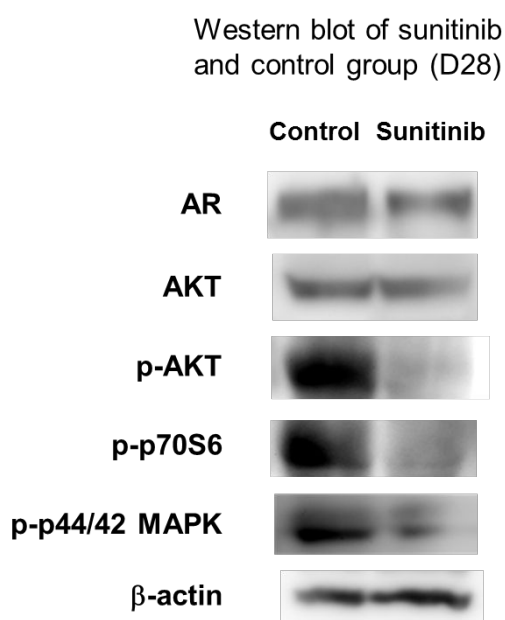
図2



### ホルモン療法，分子標的治療による *in vivo* 治療実験におけるシグナル解析

JDCaP に腫瘍を移植し、腫瘍が 200mm<sup>3</sup> を越えた段階で 抗アンドロゲン剤（ビカルタミド），チロシンキナーゼ阻害剤（スニチニブ）を投与し、4 週間後に腫瘍を摘出し、ウエスタンブロット法にてシグナル解析を行った。スニチニブ投与により、Ras-MAPK 経路（p-p44/42 MAPK）、チロシンキナーゼ～Akt 経路（p-Akt）、mTOR 経路（p-p70S6）はすべて抑制されていたが、AR シグナルは抑制されなかった（図 3）。ビカルタミド投与により、AR シグナル経路は抑制された一方でチロシンキナーゼ～Akt 経路は活性化が起り、それぞれのシグナル経路のクロストークが確認された。

図 3



### ホルモン療法，分子標的治療の併用療法の有用性の検討

JDCaP を皮下に移植し、腫瘍が 200mm<sup>3</sup> を越えた段階で ホルモン療法（ビカルタミド）チロシンキナーゼ阻害剤（スニチニブ）および両薬剤の併用を行った。結果 同様、ビカルタミドおよびスニチニブ単独では腫瘍抑制効果を認めたと、両薬剤を併用投与群では副作用によりマウスは投与 5 日以内に全例死亡した。

#### < 引用文献 >

Yamada H, Penney KL, Takahashi H, Katoh T, Yamano Y, Yamakado M, Kimura T, Kuruma H, Kamata Y, Egawa S, Freedman ML. Replication of prostate cancer risk loci in a Japanese case-control association study. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Oct 7;101(19):1330-6.  
Kimura T, Kiyota H, Nakata D, Masaki T, Kusaka M, Egawa S. A novel androgen-dependent prostate cancer

xenograft model derived from skin metastasis of a Japanese patient. *Prostate.* 2009 Nov 1;69(15):1660-7.

#### 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）

“去勢抵抗性前立腺癌モデル JDCaP-HR の樹立とアンドロゲン受容体スプライスバリエーション発現の検討” 木村高弘，田代康次郎，坂東重浩，本田真理子，佐々木裕，三木淳，清田浩，颯川晋．第 103 会日本泌尿器科学会総会．2015 年 4 月 18 日～21 日 金沢

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

清田 浩 (Kiyota Hiroshi)  
東京慈恵会医科大学・泌尿器科・教授  
研究者番号：30153240

##### (2) 研究分担者

木村 高弘 (Kimura Takahiro)  
東京慈恵会医科大学・泌尿器科・講師  
研究者番号：00307430