

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861428

研究課題名(和文)長期低酸素環境が前立腺癌細胞の悪性化に与える影響についての研究

研究課題名(英文)A study of the impact of chronic hypoxia has on the malignant transformation of prostate cancer cells

研究代表者

山崎 六志(YAMASAKI, MUTSUSHI)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90508863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、前立腺癌の悪性化(アンドロゲン非依存性獲得や増殖・浸潤能の亢進)において長期低酸素環境が重要な役割を果たしていることを示し、そのメカニズムを解明した。

長期低酸素下培養前立腺癌細胞を解析することにより、長期低酸素環境が細胞増殖能、細胞浸潤能の亢進に関わり、そのメカニズムとして細胞内シグナルの亢進や、遺伝子発現の変化が関与することを示した。前立腺癌の悪性化に関わる候補遺伝子を同定、解析し、それを阻害することにより抗癌剤などの抗腫瘍作用が増強することを示し、新たな治療法の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：This study showed that chronic hypoxia environment plays an important role in malignant transformation of prostate cancer (androgen-independent behavior and enhancement of proliferation and invasion), and was elucidate that mechanism.

By analyzing the chronic hypoxia-conditioned prostate cancer cells, we indicated that the chronic hypoxia involved in enhancement of cell invasiveness, change of intracellular signaling and gene expression. We analyzed candidate genes involved in malignant potential of prostate cancer, and showed the potential for new therapies.

研究分野：前立腺癌

キーワード：低酸素 前立腺癌

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は欧米男性において最も多い悪性腫瘍のひとつであり、日本においても食の欧米化などにより増加している。未治療前立腺癌はほとんどの症例がアンドロゲン依存性を示し、種々のホルモン療法により腫瘍は縮小する。進行前立腺癌患者においても、その約 85% に有効である。しかし、数年の間にアンドロゲン非依存性増殖を示すようになり去勢抵抗性前立腺癌となる。去勢抵抗性前立腺癌は有効な治療が限られており、予後不良である。また、癌の進行に伴ってみられる転移も予後に大きな影響を与える。これらの問題の解決にはその分子機構の解明が必要であり、現在解明されつつあるが、未だ不明な点も多い。

腫瘍内低酸素環境は前立腺癌を含む多くの癌においてみられ、アンドロゲン除去療法でも前立腺に低酸素環境を誘導することが報告されている。こういった低酸素環境が治療抵抗性や予後不良に関与しているとされるが、その分子機構の解明は未だ不十分である。

腫瘍内低酸素環境は、前立腺癌の病勢進行に伴い長期間存在していることが予想される。しかし、これまでの研究では低酸素環境の検討は短期低酸素環境下によるものがほとんどであり、長期低酸素環境が与える影響について検討した報告は少ない。

そこで我々は、“腫瘍の増大およびアンドロゲン除去療法により長期低酸素環境に陥った前立腺癌細胞は、アンドロゲン非依存性増殖能や細胞浸潤能を獲得し、悪性化に関与しているのではないかと仮説し、研究を進めることとした。

### 2. 研究の目的

本研究は前立腺癌の進行において長期低酸素環境が及ぼす影響を解明するものである。

治療抵抗性進行前立腺癌の予後は不良であり、有効な治療法は限られている。様々なメカニズムが報告されているものの、いまだ不明な点も多い。腫瘍内低酸素環境は前立腺癌を含めた種々の癌において悪性化、進行に関わることが知られているが、その分子機構の解明は未だ不十分である。

これまでの研究は、短期低酸素環境下による検討がほとんどであり、長期低酸素環境が与える影響について検討した報告は少ない。本研究は長期低酸素環境が前立腺癌細胞悪性化に及ぼす影響とその分子機構を明らかにし、治療抵抗性前立腺癌のメカニズムの理解、さらには新しい治療法の開発につなげることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 長期低酸素下培養前立腺癌細胞の細胞増殖能、細胞遊走・浸潤能の検討  
長期低酸素下、短期低酸素下および通常酸素下培養前立腺癌細胞の細胞増殖を cell count にて検討し、アンドロゲン非依存性および低

酸素抵抗性増殖能獲得の有無を検討する。  
BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chambers にて長期低酸素下、短期低酸素下および通常酸素下培養前立腺癌細胞の細胞遊走能・浸潤能を比較解析する。

(2) 細胞増殖、細胞遊走・浸潤に関与するシグナル伝達の解析

長期低酸素下、短期低酸素下および通常酸素下培養前立腺癌細胞から細胞蛋白を抽出し、細胞周期関連蛋白質や細胞接着因子の発現の変化を western blotting で解析する。長期低酸素下、短期低酸素下および通常酸素下培養前立腺癌細胞から Total-RNA を抽出し MMPs の発現変化をリアルタイム RT-PCR 法にて解析する。長期低酸素下培養前立腺癌細胞における細胞内シグナル伝達系の活性化を western blotting で解析し、活性化のみられたシグナル伝達系についてはその特異的阻害剤を用いてシグナルを阻害し、細胞増殖能、細胞遊走・浸潤能の亢進が抑制されるかどうかを確認する。

(3) 長期低酸素下培養前立腺癌細胞の培養上清中の分泌蛋白質の解析

長期低酸素下、短期低酸素下および通常酸素下培養前立腺癌細胞の培養上清中の分泌蛋白を Cytokine Antibody Array を用いて解析し、長期低酸素下にて変化のみられた蛋白については ELISA を用いて変化の定量化を行う。

(4) 長期低酸素環境による遺伝子発現変化の網羅的解析および機能解析

長期低酸素環境による遺伝子発現の変化を Whole Human Genome オリゴ DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析する。変化のみられた遺伝子について、リアルタイム RT-PCR 法にて発現変化を確認した後に siRNA を作成し、その発現を抑制することで細胞の増殖能、遊走能・浸潤能、アンドロゲン非依存性に与える影響について検討する。

(5) 長期低酸素環境による miRNA 発現変化の網羅的解析

長期低酸素環境による miRNA 発現の変化を miRNA マイクロアレイにて網羅的に解析する。変化のみられた miRNA について遺伝子発現変化とのかわりを検討する。

(6) 長期低酸素下培養前立腺癌細胞の in vivo での腫瘍形成能の検討

長期低酸素下培養前立腺癌細胞と通常酸素下培養前立腺癌細胞および短期低酸素下培養前立腺癌細胞をヌードマウス皮下に移植し、腫瘍径の経時的変化、転移巣出現の有無、アンドロゲン非依存性増殖の有無について比較検討する。最終的には腫瘍を摘出し血管新生の有無や細胞接着因子の発現などを免疫蛍光染色にて比較検討する。

(7) in vivo での siRNA の抗腫瘍効果の検討

in vitro にて検討した siRNA を癌細胞移植ヌードマウスに投与し、その抗腫瘍効果を in vivo で解析し、新しい治療法への可能性について検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 長期低酸素下培養前立腺癌細胞では細胞増殖能、細胞遊走・浸潤能が亢進した。

(2) 長期低酸素下培養前立腺癌細胞ではアンドロゲン除去によりG1期停止を生じるが、短期低酸素下培養前立腺癌細胞はアンドロゲン除去による細胞周期の変化を認めなかった

(3) AR や PSA 発現は長期低酸素環境による変化はないが、Rb のリン酸化亢進、p27Kip1 発現低下を認めた。

(4) 長期低酸素下培養前立腺癌細胞では MMP-7, -9, -14, -15 の発現亢進がみられた。

(5) 長期低酸素下培養前立腺癌細胞では HIF-1, PI3K/Akt および Jak/Stat の活性化が認められ、各阻害剤により細胞死が誘導された。

(6) 長期低酸素環境による遺伝子発現変化の網羅的解析により候補遺伝子として vav3 を挙げ、悪性化への関与を示した。

(7) in vivo での長期低酸素下培養前立腺癌細胞の腫瘍形成能亢進、アンドロゲン非依存性増殖を確認した。

(8) 長期低酸素下培養前立腺癌細胞ではタキサン系抗癌剤の感受性が低下した。

(9) vav3 について siRNA と抗がん剤併用による抗腫瘍作用の相乗効果を示した。

(10) Angiopoietin-like protein の発現亢進、アンドロゲン非依存性獲得への関与などを示した。

#### 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 5 件)

Yamasaki M, Nomura T, Sato F, Mimata H. Chronic hypoxia induces androgen-independent and invasive behavior in LNCaP human prostate cancer cells.

Urol Oncol. 2013 Oct;31(7):1124-31.

doi:10.1016/j.urolonc.2011.12.007.

Epub 2012 Jan 5.

査読あり

Nomura T, Yamasaki M, Hirai K, Inoue T, Sato R, Matsuura K, Moriyama M, Sato F, Mimata H.

Targeting the Vav3 oncogene enhances docetaxel-induced apoptosis through the inhibition of androgen receptor phosphorylation in LNCaP prostate cancer cells under chronic hypoxia.

Mol Cancer. 2013 Apr 8;12:27.

doi:10.1186/1476-4598-12-27.

査読あり

Hirai K, Nomura T, Yamasaki M, Inoue T,

Narimatsu T, Chisato Nakada PD, Yoshiyuki Tsukamoto PD, Matsuura K, Sato F, Moriyama M, Mimata H.

The Vav3 oncogene enhances the malignant potential of prostate cancer cells under chronic hypoxia.

Urol Oncol. 2014 Feb;32(2):101-9.

doi:10.1016/j.urolonc.2012.09.005.

Epub 2013 Feb 9.

査読あり

Sato R, Yamasaki M, Hirai K, Matsubara T, Nomura T, Sato F, Mimata H.

Angiopoietin-like protein 2 induces androgen-independent and malignant behavior in human prostate cancer cells.

Oncol Rep. 2015 Jan;33(1):58-66.

doi:10.3892/or.2014.3586. Epub 2014

Nov 3.

査読あり

Nomura T, Yamasaki M, Mimata H.

Elucidating the molecular mechanism of prostate cancer progression under chronic hypoxia and development of the novel therapeutic approach.

Nihon Rinsho. 2014 Dec;72(12):2136-40.

査読あり

##### [学会発表](計 3 件)

AUA2014 Annual Meeting

2014年5月18日 オーランド(アメリカ)

Targeting the Vav3 oncogene enhances docetaxel-induced apoptosis through the inhibition of androgen receptor phosphorylation in LNCaP prostate cancer cells under chronic hypoxia in vitro and in vivo

TAKEO NOMURA, MUTSUSHI YAMASAKI,

KENICHI HIRAI, TORU INOUE, RYUTA SATO,

FUMINORI SATO, HIROMITSU MIMATA

第103回日本泌尿器科学会総会

2015年4月18日 金沢都ホテル(石川県金沢市)

長期低酸素環境によって誘導される前立腺癌転移能獲得のメカニズムの解明

岩崎和範、山崎六志、佐藤竜太、平井健一、住野泰弘、野村威雄、佐藤文憲、濱田文彦、三股浩光

第103回日本泌尿器科学会総会

2015年4月21日 ANAクラウンプラザホテル金沢(石川県金沢市)

前立腺癌における Angiopoietin-like protein 4 発現の意義

羽田真郎、佐藤竜太、山崎六志、野村威雄、佐藤文憲、三股浩光

##### [図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山崎六志 (YAMASAKI, Mutsushi)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90508863

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：