

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861451

研究課題名(和文) 前立腺癌進展過程におけるプロリン異性化酵素 Pin1 に着目したシグナル伝達の解明

研究課題名(英文) Elucidation of signaling pathway targeting to the prolyl isomerase Pin1 in progression of castration resistant prostate cancer

研究代表者

安水 洋太 (Yasumizu, Yota)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：40464854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Pin1はプロリンの構造をcis体からtrans体に変化させることでタンパクの立体構造を変化させるプロリン異性化酵素の一種である。種々のプロリン異性化酵素の中で、Pin1はリン酸化Ser/Thr-Proのmotifに結合するという特徴を有し、リン酸化と構造変化の架け橋を行う。前立腺癌の臨床検体におけるPin1の強発現は強力な再発予測因子であった。また去勢抵抗性前立腺癌細胞株を使用し、in vitroにおけるPin1阻害の有用性を示した。この結果は去勢抵抗性前立腺癌の治療において、Pin1を治療標的とするものの有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The prolyl isomerase Pin1 regulates phosphorylated status of proteins by catalyzing the cis-trans isomerization of phosphorylated Ser/Thr and Pro motifs, and plays an important role in cancer progression. Strong expression of Pin1 in prostate cancer samples taken from prostatectomy was a potent predictive factor for prognosis. In vitro, inhibition of Pin1 showed significant anti-tumor efficacy for castration resistant prostate cancer cells. These results suggested Pin1 may serve as a promising therapeutic target for castration resistant prostate cancer.

研究分野：泌尿器

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 プロリン異性化酵素 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床上的の問題点

前立腺癌有転移症例においては、主にアンドロゲン遮断療法 (androgen deprivation therapy; ADT) が施行される。ADTは8割の症例で奏効するものの、次第にアンドロゲン非依存性増殖能を獲得し、ADTに抵抗性を示す、いわゆる去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer; CRPC) となる。CRPCの治療法としてドセタキセルを用いた化学療法が広く行われているが、予後改善の寄与度はわずか3か月程度であり、新規治療戦略の確立は急務である。

(2) CRPCに対する当教室の取り組み

ヒトCRPC細胞株C4-2は、ホルモン感受性前立腺癌株であるLNCaPをアンドロゲン除去下でvivo継代することで樹立された細胞株である。我々はC4-2をアンドロゲン除去下で培養継続し、独自にCRPC株:C4-2AT6を樹立し、ホルモン不応性の獲得過程における通常酸素濃度下でのHIF-1・Ets-1活性亢進に伴う血管新生亢進を報告した(Kosaka et al. Prostate, 70, 162-9, 2010)。アンドロゲン非依存性の増殖を呈するのみならず、ドセタキセル療法に対し抵抗性を獲得している(Kosaka et al, J urol, 185, 2376-2381, 2010)。LNCaP、C4-2、C4-2AT6は同様にPTEN欠損、AR増幅、PSA産生の形質を備えつつ、それぞれホルモン感受性・去勢抵抗性・去勢抵抗性ドセタキセル抵抗性と異なった特徴を有する。この特徴は臨床における前立腺癌の進展プロセスと類似し、この実験系を用いることで進展プロセスに着目したCRPCに対する新規治療戦略の構築を可能とする。

(3) プロリン異性化酵素Pin1を標的としたCRPC新規治療戦略

Pin1はプロリンの構造をcis体からtrans体に変化させることでタンパクの立体構造を変化させるプロリン異性化酵素の一種である。種々のプロリン異性化酵素の中で、Pin1はリン酸化Ser/Thr-Proのmotifに結合するという特徴をもち、リン酸化と構造変化の架け橋を行う。現在までにPin1の標的タンパク質としてp53、NF- κ 、cyclinD1等が報告されており、各種の癌形成に関与している。前立腺癌においても、癌抑制タンパクPMLに結合することでそのユビキチン化・分解を促し、結果、HIF-1 pathway・Akt-mTOR pathwayを活性化する(Yuan, Cancer Cell, 2011)。また、前立腺癌の臨床検体におけるPin1の発現が前立腺癌の組織的悪性度(Gleason score)と相関し、かつPin1の強発現はGleason score・断端陽性・リン

パ節陽性よりも強力な再発予測因子である(Ryo A, Clin Cancer Res, 2005)。

前立腺癌の進展プロセスにおけるPin1の発現の変化、シグナル伝達との関係については未だ明らかになっていない。しかし、前立腺癌との極めて強い相関を持つPin1の発現の解析は、CRPCの新規治療戦略の確立の一助となることが予想される。

2. 研究の目的

本研究ではCRPCにおいてPin1のまだ解明されていない基礎的研究を完成し、Pin1に着目した新規治療戦略の確立を目指すことを目標とする。具体的には下記の3点を研究目的とする。

- (1) LNCaP、C4-2、C4-2AT6の前立腺癌細胞株を駆使して、前立腺癌の進展プロセスにおけるPin1発現の変化・Pin1を介したシグナル伝達の変化を解明する。
- (2) Pin1を介したシグナル伝達の阻害がCRPCに対する新規治療戦略となりうるか検討する
- (3) 当院での臨床検体におけるPin1の発現について免疫組織染色を用いて評価し、その発現と前立腺癌の予後との関係を他因子とともに評価する。

3. 研究の方法

- (1) ヒトCRPC細胞株であるC4-2及びC4-2AT6、ホルモン感受性細胞株のLNCaP、C4-2AT6を低酸素環境下(O₂5%)に長期間(chronic:1か月以上)曝露させた細胞株を用いてPin1の発現について検討した。
- (2) C4-2AT6にPin1阻害剤Jugloneを投与し、Pin1の発現と殺細胞効果を評価した。また、ドセタキセル・NVP-BE2235 (Dual PI3K/mTOR阻害剤)と併用して、併用効果を評価した。
- (3) 当院で限局性前立腺癌に対して根治的前立腺全摘除術を施行した86名を対象に、免疫組織化学を用いてヒト前立腺癌組織におけるPin1の発現を評価した。Pin1の発現とGleason score、PSA再発との関連を統計学的に検討した。

4. 研究成果

- (1) C4-2AT6におけるPin1の発現
本研究の予備的検討として、C4-2、C4-2AT6におけるリン酸化ステータスについて評価した。PTENの欠損を認めるC4-2、C4-2AT6ではPI3K/Akt/mTOR pathwayの亢進を認めたが、その発現強度には差がありC4-2AT6において

有意な発現の亢進を認めた。慢性的な低酸素環境下に曝露された C4-2AT6 では、PI3K/Akt/mTOR pathway の更なる亢進を示した(Figure1)。これらの結果から、過酷な環境下において前立腺癌細胞のリン酸化ステータスは亢進し、この亢進が治療抵抗性の一端を担っている可能性が示唆された。続けて、C4-2AT6 に対して Akt/mTOR pathway 阻害剤である

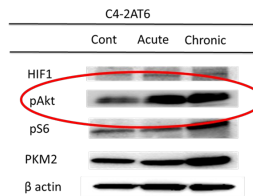


Figure1

NVP-BE2325 (Dual PI3K/mTOR inhibitor)を用

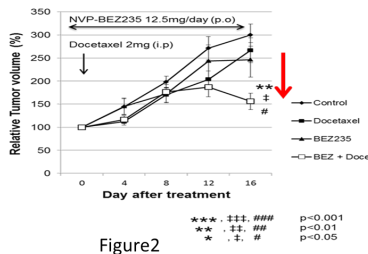


Figure2

いて阻害効果を評価した。ドセタキセルの併用療法は、in vitro/in vivo において抗腫瘍効果を認めた (Figure2)。しかし、長期間のPI3K/Akt/mTOR 阻害は Feedback 経路を介したリン酸化の再エントリーを引き起こすと考えられている(Figure3)。したがって、包括的なリン酸化の制御が重要な役割を担うと予想される。そこで、リン酸化 Ser/THr-Pro の motif に結合するこ

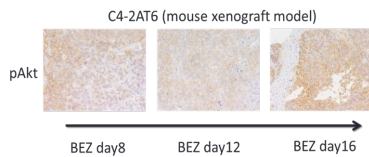


Figure3

とで種々のタンパクのリン酸化の switching を担う Pin1 に着目した。

LNCaP, C4-2AT6、および低酸素環境下での C4-2AT6 における Pin1 の発現を Western blotting 法を用いて評価した。C4-2AT6 における pin1 の発現は、LNCaP と比較し優位に亢進した。また、低酸素環境下の C4-2AT6 では更なる活性化を認めた(Figure4)。これらの結果から、過酷な環境下で生き延びた前立腺癌細胞にお



Figure4

いて Pin1 が高発現を示すことが示唆された

(Figure5)。

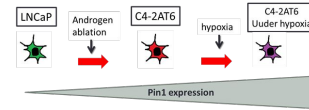


Figure5

(2) Pin1 阻害剤 Juglone とドセタキセルの併用効果

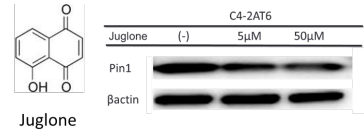


Figure6

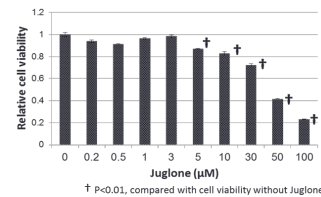


Figure7

まずは C4-2AT6 における Pin1 制御の抗腫瘍効果について検討した。Pin1 阻害剤として Juglone を使用した。Juglone は濃度依存的に C4-2AT6 における Pin1 の発現を抑制した (Figure6)。Juglone に曝露した C4-2AT6 の cell viability は濃度依存的に減少した(Figure7)。

去勢抵抗性前立腺癌に対してドセタキセルが広く使用されている。そこでドセタキセルとの併用について検討した。C4-2AT6 における Pin1 の発現を容量依存的に時間依存的に亢進させた (Figure8)。C4-2AT6 の皮下腫瘍モデルを作成

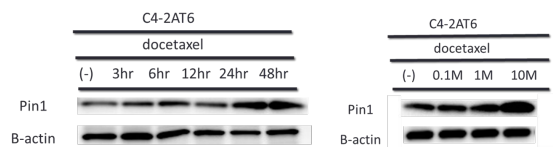


Figure8

しマウスにドセタキセルを投与したところ、in vitro と同様に、ドセタキセルは C4-2AT6 マウス皮下腫瘍モデルにおける Pin1 の発現を亢進させた (Figure9)。

続いて C4-2AT6 に対する Juglone とドセタキセルの併用効果に対して検討した。C4-2AT6 に

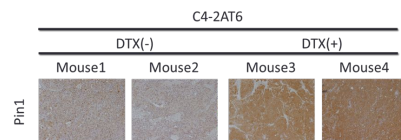


Figure9

に対するドセタキセルと Juglone の併用はドセタキセル単剤・Juglone 単剤と比較して有意に高い殺細胞効果を示した (Figure10)。一方、

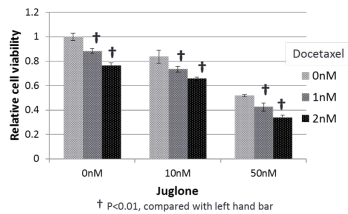


Figure10

NVP-BE2235 (Dual PI3K/mTOR inhibitor) との併用では、ほとんど効果を示さなかった (Figure 11)。これらの結果から Juglone が PI3K/Akt pathway のリン酸化を制御している可能性が示

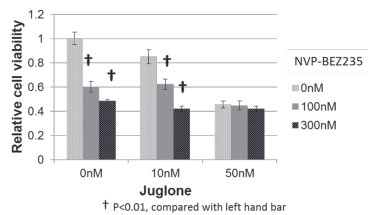


Figure11

唆された。

(3) 臨床検体における Pin1 の発現と予後との関係

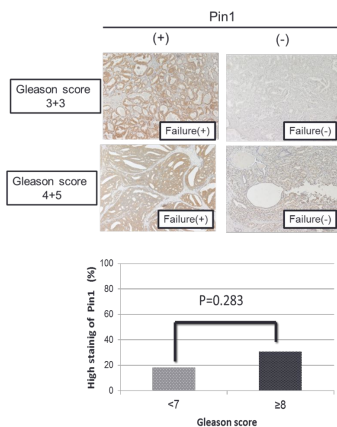


Figure12

慶応義塾大学病院において限局性前立腺癌に対して前立腺全摘術を施行した 86 例の前立

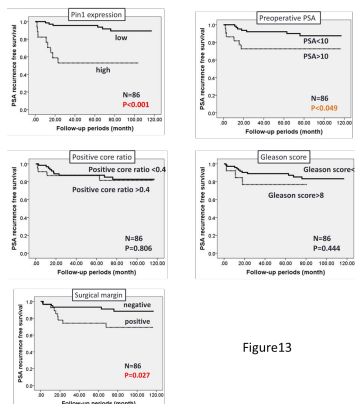


Figure13

腺癌組織を用いて、免疫組織化学による Pin1 の発現を評価した。グリソスコアと Pin1 の発現には有意な相関はみとめなかった (Figure12)。術

後の PSA 再発の有意な因子として PSA 値・positive core rate・グリソスコア・断端陽性・Pin1 の強発現を挙げて、PSA 再発との相関性を評価した。Pin1 強発現は断端陽性とともに PSA 再発と有意な相関を認めた (Figure13)。更に多変量解析を用いて PSA 再発の予測因子を評価したところ、Pin1 強発現が独立した唯一の再発予測因子であった (Figure14)。

以上の結果から、Pin1 制御の有用性についての分子基盤を得られたと共に、再発評価目的の

	HR	95%CI	Univariable	Multivariable
Pin1 expression (low vs. high)	7.27	2.51 - 21.04	<0.001	<0.001
Preoperative PSA (ng/ml) (<10 vs. ≥10)	2.85	0.96 - 8.50	0.060	
Positive core ratio (<0.33 vs. ≥0.33)	1.16	0.36 - 3.69	0.806	
Gleason score (<8 vs. ≥8)	1.65	0.46 - 5.90	0.445	
Surgical margin	3.11	1.08 - 8.97	0.036	

Figure14

マーカーとしての有用性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 安水 洋太、去勢抵抗性前立腺癌におけるプロリン異性化酵素 Pin1 の制御に着目した新規治療戦略、第 15 回関東ホルモンと癌研究会、2015/1/31、ベルサール八重洲、東京

2) Yota Yasumizu, Post-translational modification mediated by the prolyl isomerase Pin1 accerelate cancer progression in castration resistant prostate cancer., American Urological Association Annual Meeting 2014, 2014/5/19, Orlando, America

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安水 洋太 (YASUMIZU YOTA)

慶応義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 40464854