

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462433

研究課題名(和文) 前立腺特異的PTEN/p53ダブルノックアウトマウスモデルに関する研究

研究課題名(英文) Development of PSA-conditional PTEN/p53 double knockout mouse prostate cancer model

研究代表者

デベラスコ マルコ (DE VELASCO, Marco)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：20449838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前にPTEN flox/PSA-Creトランスジェニックマウス前立腺癌モデルを確立し、今回、本マウスモデルを用いて、よりaggressiveな転移モデルの確立をめざし、PSAコンディショナルPTEN/p53 (Trp53) ダブルノックアウトマウス (PTEN/p53 DKO) を作製した。DKO Homo-deletionマウスでは早期より肺・肝・リンパ節などに遠隔転移をきたし、全生存期間の中央値は55週とかなり短くなった。これにより、ヒト前立腺癌の第3相試験と同様のPFSとOSをエンドポイントとしたPre-clinicalな治療実験が可能となり、極めて有用なモデルと思われた。

研究成果の概要(英文)：We have previously developed a PTEN flox/PSA-Cre transgenic mouse prostate cancer model. In the current research, we focused on p53 (Trp53) to establish a more aggressive metastatic prostate cancer model. Using the same gene engineering method, we established a PSA-conditional PTEN/p53 double knockout (PTEN/p53 DKO) mouse prostate cancer model. Mice with DKO homo-deletion develop an aggressive phenotype characterized by a higher incidence of metastasis, including multiple metastases to lungs, liver, lymph nodes and other distant organs, and decreased survival (median overall survival, 55 weeks of the age), enabling us to use the PTEN/p53 DKO mouse model to evaluate the therapeutic efficacy in a randomised controlled studies with similar end points of PFS and OS to a human phase-3 trial. These findings demonstrate the usefulness of the PTEN/p53 DKO mouse prostate cancer model for the preclinical development of novel treatment strategies for prostate cancer.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 遺伝子改変マウス PTEN p53 前臨床試験

## 1. 研究開始当初の背景

近年、PSA 検査の普及や前立腺癌の全国的な啓発活動により、早期前立腺癌の診断頻度は増加傾向にあり、手術・放射線療法によって治癒可能な前立腺癌が多くなってきている。しかしながら、局所進行性あるいは転移性前立腺癌も少なくなく、初期治療として内分泌療法が著効するが、いずれ生命を脅かす去勢抵抗性前立腺癌になり、ドセタキセルによる化学療法を中心とした集学的治療を行うが予後は不良である。近年の分子生物学的研究により、前立腺癌の発癌・進展の過程に関与する分子や遺伝子異常が解明されてきたが、去勢抵抗性獲得の機序はいまだ不明である。予後や治療予測因子としてリン酸化 Akt などの Molecular Marker が提唱され臨床的に用いられるようになり、的確な画像診断は言うまでもなく、切除標本や生検標本、また患者血清などから得られる分子生物学的な情報が適切な治療方針の決定に大きく寄与することは明らかである。このような状況を鑑みると、必要となるのが進行性前立腺癌に対する個別化治療のオプションであるが、残念なことに内分泌療法と化学療法のごく限られた治療オプションしかないのが現状である。その最大の原因は *in vivo* の実験系で検証するシステムが確立されていないことが挙げられる。すなわち、ヌードマウスを使った xenograft モデルによる治療研究は可能であるが、immune competent な syngeneic tumor モデルがなく、xenograft モデルでは治療効果を示すがヒトでは同様の効果がなく、治療実験においては syngeneic モデルの確立が重要と思われる。我々はこれまでリン酸化 Akt に着目しその regulator である PTEN 癌抑制伝子を中心に検討を重ねてきた。PTEN の不活化により恒常的に活性化されたリン酸化 Akt の発現は high grade や high

stage の前立腺癌に多く認められ、前立腺癌進展に PTEN 遺伝子の変異が重要とされている。さらに、Cre-LoxP のシステムによる conditional gene targeting 法では、特定の遺伝子を臓器特異的に欠落させその遺伝子の癌化に関わる責任の度合いを知るのに適している。そこで *PTEN flox/PSA-Cre* の系を用い、マウス前立腺組織のみにおいて PTEN を特異的に欠損させ、dysplasia, PIN, high grade PIN, carcinoma, metastasis といった多段階発癌モデルを確立した。この遺伝子改変マウスモデルは PTEN homo deletion マウスにおいて 8 週齢で PIN が発生し、10~12 週で 50% 以上に前立腺癌が認められ、15 週齢で 100% のマウスが発癌し徐々に増殖・進展していく。また成熟後の早期 (8~10 週齢) に去勢術を施行すると一端前立腺は縮小するものの去勢後 8 週で再び増殖に転じる。細胞核のアンドロゲン受容体 (AR) の発現を見ると、去勢後 4 週では AR の発現は認めないが、8 週よりテストステロン欠如下においても再び AR の発現が認められ 12 週では強い AR の発現とともに腫瘍の増殖が認められ、去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) へと移行する。このように我々はヒト前立腺癌の自然史に酷似した前立腺癌発生マウスモデルを開発し、CRPC マウスモデルと共に実用化した。

## 2. 研究の目的

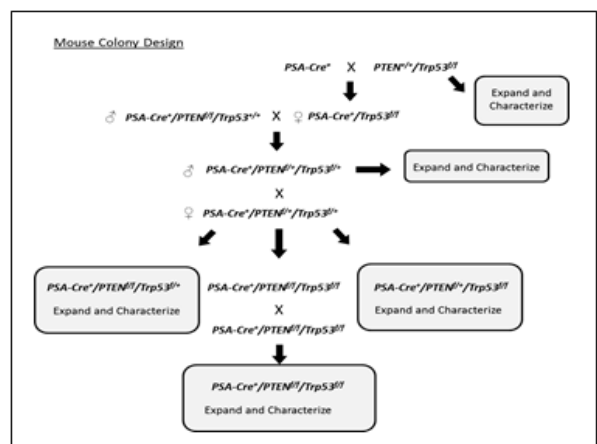
前述の前立腺癌モデルで得られた結果より、本モデルは平均生存期間が 70 週間と長く、遠隔転移する比率が 10% と低く、治療研究において腫瘍の縮小や組織学的変化をみると抗腫瘍効果の検討には有用と思われるが、生存率 (overall survival: OS) の検討には適合していない。ヒト前立腺癌治療効果判定の現況を鑑みると、もう少し生存期間が短く、転

移・進展の速いモデルが必要と思われる。このような状況から、より aggressive な前立腺癌マウスモデルの作製に着手する必要があり、その一つとして前立腺癌の悪性度と関連のある Trp53 ( p53 ) に着目し、Trp53 変異を PTEN 欠失に加えることにより悪性度の高い前立腺癌モデルとなりうると予想される。すでに異なったプロモーターを用いて前立腺癌や乳癌において同様の試み(p53 ダブル KO マウス)が行われ、より aggressive なマウスモデルが確認されている (Chen Z et al. Nature 2005,436:725, Jonkers, et al. Nature Genetics 2001,29:418)。すなわち、本研究の目的は Cre-loxP システムを用い、我々の確立している PTEN ノックアウト前立腺癌マウスと p53 mutant マウス ( NIH より提供 ) を用いて survival 研究に有用な前立腺特異的 PTEN/p53 ダブルノックアウトマウスを開発し、よりヒト前立腺癌治療に反映できる実験系を確立し、生物学的プロファイル解明するとともに、pre-clinical 研究を実行することである。

### 3. 研究の方法

我々が PTEN conditional gene targeting にて確立した、前立腺特異的 PTEN ノックアウトマウスと同じ手法、Cre-LoxP システムを用い、 $PTEN^{+/+}/Trp53^{fl/fl}$  マウス ( NIH より入手 ) と  $PSA-Cre^+$  マウスを交配することにより、 $PSA-Cre^+/Trp53^{fl/fl}$  マウスを作製する ( 下図参照 )。我々が確立した  $PSA-Cre^+/PTEN$  homo deletion マウスと交配させ、 $PSA-Cre^+/PTEN^{fl/+}/Trp53^{fl/+}$  ( PTEN, Trp53 とともにヘテロ欠失型 ) を確立し、ヘテロ型同士の交配により、 $PSA-Cre^+/PTEN^{fl/fl}/Trp53^{fl/+}$  ( PTEN homo p53 hetero deletion )、 $PSA-Cre^+/PTEN^{fl/+}/Trp53^{fl/fl}$  ( PTEN hetero p53 homo deletion )、 $PSA-Cre^+/PTEN^{fl/fl}/Trp53^{fl/fl}$  ( PTEN, p53 homo deletion ) の 3 表現型 Colony を確立した。そのうち PTEN/p53 ホモ欠失マウスにつ

$PSA-Cre^+/PTEN^{fl/fl}/Trp53^{fl/fl}$  ( PTEN, p53 homo deletion ) の 3 表現型 Colony ができ、それぞれについて病理組織学的に経時的変化と増殖・進行に關係する分子について Characterize する。続いて各表現型において生後 10 週齡で去勢術を施行し CRPC モデルを確立し、同様に組織学的変化と関連分子について Characterize する。また、各表現型におけるラージスケール ( n=30-40 ) による生存期間の確認と転移臓器の確認 ( 死因 ) を行い、治療研究に有用なモデルであるか確認する。



### 4. 研究成果

我々が conditional gene targeting にて確立した、前立腺特異的 PTEN ノックアウトマウスと同じ手法である、Cre-LoxP システムを用い、 $PTEN^{+/+}/Trp53^{fl/fl}$  マウスと  $PSA-Cre^+$  マウスを交配することにより、 $PSA-Cre^+/Trp53^{fl/fl}$  マウスを作製し、 $PSA-Cre^+/PTEN$  homo deletion マウスと交配させ、 $PSA-Cre^+/PTEN^{fl/+}/Trp53^{fl/+}$  ( PTEN, Trp53 とともにヘテロ欠失型 ) を確立し、ヘテロ型同士の交配により、 $PSA-Cre^+/PTEN^{fl/fl}/Trp53^{fl/+}$  ( PTEN homo p53 hetero deletion )、 $PSA-Cre^+/PTEN^{fl/+}/Trp53^{fl/fl}$  ( PTEN hetero p53 homo deletion )、 $PSA-Cre^+/PTEN^{fl/fl}/Trp53^{fl/fl}$  ( PTEN, p53 homo deletion ) の 3 表現型 Colony を確立した。そのうち PTEN/p53 ホモ欠失マウスにつ

いて病理組織学的な経時的变化や増殖・進行について Characterize した。このモデルでは、早期から全身転移をきたし、生後 60 週までに癌死する転移として生存期間をエンドポイントとした研究が可能な実臨床に則したモデルとして有効であることが確認された。このマウスモデルを用いてランダム化前向き試験を模倣した治療研究が可能となり、Preclinical Researchとして新規の治療法の有用性の検討が可能となった。本マウスモデルの確立およびマウスモデルを用いた治療研究については、2016年日本癌学会(JCA)、2016年アメリカ癌学会(AACR)にて発表し、英文雑誌 Oncotarget に投稿し、報告した。

#### 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2件)

1. De Velasco MA, Kura Y, Yoshikawa K, Nishio K, Davies BR, Uemura H. Efficacy of targeted AKT inhibition in genetically engineered mouse models of PTEN-deficient prostate cancer. *Oncotarget*. 2016 Feb 21. doi: 10.18632/oncotarget.7557. [Epub ahead of print] 査読有
2. Yamamoto Y, De Velasco MA, Kura Y, Nozawa M, Hatanaka Y, Oki T, Ozeki T, Shimizu N, Minami T, Yoshimura K, Yoshikawa K, Nishio K, Uemura H. Evaluation of in vivo responses of sorafenib therapy in a preclinical mouse model of PTEN-deficient of prostate cancer. *J Transl Med*. 2015 May 8; 13:150. doi: 10.1186/s12967-015-0509-x 査読有

[学会発表](計10件)

1. De Velasco.M.A., Kura Y., Ando N.,

Fukushima E., Hatanaka Y., Oki T., Yoshimura K., Nozawa M., Davies B.R., Huszdai D., Yoshikawa K., Nishio K., Uemura H. The Jak 1/2 inhibitor AZD 1480 suppresses tumor growth and metastasis in genetically engineered mouse models of PTEN-deficient prostate cancer. AACR(New Orleans, USA) 2016.4.19.

2. Kura Y., De Velasco.M.A., Sakai K., Fujita Y., Togashi Y., Terashima M., Yoshikawa K., Nishio K., Uemura H. Alternative splicing is a frequent event in mouse PTEN-deficient prostate cancer. AACR(New Orleans, USA) 2016.4.19.
3. Hatanaka Y., De Velasco.M.A., Kura Y., Sakai K., Fujita Y., Togashi Y., Terashima M., Yoshikawa k., Nishio K., Uemura H. Analysis of noncoding RNA expression in a mouse of PTEN-deficient prostate cancer. AACR(New Orleans, USA) 2016.4.19.
4. Uemura H., De Velasco.M.A., Kura Y., Hatanaka Y., Oki T., Yamamoto Y., Sugimoto K., Mori Y., Yoshimura K., Nozawa M., Yoshikawa k., Nishio K. Effects of increased dietary fat consumption on prostate cancer progression in genetically engineered mice. AACR(New Orleans, USA) 2016.4.19.
5. Sugimoto K., De Velasco.M.A., Kura Y., Hatanaka Y., Yamamoto Y., Oki T., Yoshimura K., Nozawa M., Yoshikawa k., Nishio K., Uemura H. Effects of oral chloroquine

administration on a preclinical mouse model of PTEN/p53-deficient prostate cancer. AACR(New Orleans, USA) 2016.4.19.

6. 倉 由吏恵(近大)、デベラスコ・マルコ(近大、近大ゲノム)、坂井和子、藤田至彦、富樫庸介、寺嶋雅人(近大ゲノム)、吉川和宏(愛知医科大)、西尾和人(近大ゲノム)、植村天受(近大) PTENノックアウトマウス前立腺癌におけるノンコ - ディング RNAの検討. 第75回 日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜、神奈川) 2016.10.7.
7. 植村天受、倉 由吏恵、森 康範、畑中祐二、沖 貴士、杉本公一、吉村一宏、野澤昌弘(近大)、吉川和宏(愛知医科大)、西尾和人(近大ゲノム)、デベラスコ・マルコ(近大、近大ゲノム) PTENノックアウト前立腺癌マウスモデルにおけるJAK 1/2 阻害による腫瘍増殖及び転移抑制効果の検討. 第75回 日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜、神奈川) 2016.10.7.
8. デベラスコ・マルコ(近大、近大ゲノム)、倉由吏恵、坂井和子、藤田至彦、富樫庸介、寺嶋雅人(近大ゲノム)、吉川和宏(愛知医科大)、西尾和人(近大ゲノム)、植村天受(近大) PTENノックアウトマウス前立腺癌において選択的スプライシングは頻繁に認められる. 第75回 日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜、神奈川) 2016.10.7.
9. 杉本公一(近大)、デベラスコ・マルコ(近大、近大ゲノム)、倉 由吏恵、森 康範、畑中祐二、沖 貴士、吉村一宏、野澤昌弘(近大)、吉川和宏(愛知医科大)、西尾和人(近大ゲノム)、植村天受(近大) PTEN/p53 ダブルノックアウト前立腺癌マウスモデルにおけるクロロキン経口による治療効果. 第75回 日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜、神奈川) 2016.10.8.
10. 森 康範(近大)、デベラスコ・マルコ(近大、近大ゲノム)、倉 由吏恵、畑中祐二、沖

貴士、杉本公一、吉村一宏、野澤昌弘(近大)、吉川和宏(愛知医科大)、西尾和人(近大ゲノム)、植村天受(近大) 遺伝子改変と前立腺癌マウスモデルにおける高脂肪食摂取による腫瘍増殖について. 第75回 日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜、神奈川) 2016.10.8.

〔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：  
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

デベラスコ・マルコ (DEVERASCO, Marco)  
近畿大学・医学部・助教  
研究者番号：20449838

##### (2)研究分担者

植村 天受 (UEMURA, Hirotosugu)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：90213397

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

( )