

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861259

研究課題名(和文) 前立腺におけるWntシグナル機能解明と去勢抵抗性癌の新規治療の探索

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms of Wnt signal on prostate and trial to develop the new treatment of metastatic Castration Resistant Prostate Cancer

研究代表者

高橋 さゆり (TAKAHASHI, SAYURI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40313217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺全摘症例のホルマリン包埋切片よりWntのRNA発現を計測したところGleason Scoreにより有意に差を認め、前立腺細胞癌株のWnt5BのRNAノックダウンにより各成長因子の発現が低下。またWnt5B投与にて細胞増殖、浸潤能は亢進。さらに当院外来受診患者で骨転移を有する去勢抵抗性前立腺癌と診断された59症例を非転移性前立腺癌患者群と、ELISA法にて血清Wnt5Bを比較した結果、Wnt5Bの前立腺癌骨転移との有意な関連性を認めた。Wnt5Bは前立腺癌の悪性度と相関し、増殖、浸潤能を亢進、さらに転移の過程で血中分泌量が増大することが解明され臨床応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We compared the mRNA expression levels of non-canonical Wnts of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples from radical prostatectomy patients. mRNA levels of Wnt5B were associated with GS by quantitative-PCR. we knock-downed RNA expression of Wnt5B of prostate cancer cells and found the gene expression of growth factors reduced. Wnt5B promoted proliferation and invasion of PC3 cells by MTT and invasion assay. We preserved serum samples of 112 patients at our out clinic for the follow-up. We measured serum Wnt5B levels by ELISA. 59 patients were diagnosed as metastatic prostate cancer and 53 patients were not found any metastases. Serum Wnt5B levels of metastases group were significantly higher than those of non-metastases group. This result suggests that increasing serum Wnt5B strongly associated with increased risk of metastases of prostate cancer. Wnt5B may be a novel target for treatment of metastatic prostate cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：前立腺癌 Wntシグナル

1. 研究開始当初の背景

本邦において前立腺癌罹患率は上昇の一途をたどり、現在では、部位別癌罹患率の第3位を、部位別癌死の第6位を占めている。高齢化の進むなか、ますます臨床的課題の多い疾患と言える。外科的治療が適応とならない症例においては、抗アンドロゲン薬やLH-RHアナログ、LH-RHアンタゴニスト投与によるホルモン療法が第一選択である。治療開始時90%以上にホルモン療法は有効であるが、数年後には多くがPSAの再上昇、病状の悪化を伴い再燃癌、去勢抵抗前立腺癌へと移行していく。去勢抵抗性前立腺癌に対しては、ドセタキセルを用いた抗がん剤治療が行われているものの、十分に有効な治療法とは言えず、新規治療薬の開発が急務である。前立腺癌が去勢抵抗性を獲得する分子細胞学的機序としては、ARの増幅、AR遺伝子の突然変異体、ARの共役因子の活性化、リガンド非依存性のARのリン酸化、ARを介さない増殖シグナル伝達の活性化などが考察されている。しかし、臨床的な病態を十分に説明するには至っていない。

我々は過去に、去勢抵抗性前立腺癌の特に骨転移巣で多く同定されるAR点変異T877Aを、前立腺のみに組織時期特異的に発現できるコンディショナルマウスを作成することに成功した。このマウスはAR機能の亢進した去勢抵抗性前立腺癌モデルマウスであり、これを前立腺癌を強制発生するトランスジェニックマウス (TRAMP マウス) と交配することでAR点変異導入マウスが癌の増殖を促進することを証明した。この系を用いてWnt5a蛋白が前立腺癌を増悪させることを突き止めた。Wnt5aは胎生期に、生物の発生、形態形成に関わる必須の蛋白で成体での発現、役割は十分には知られていない。ヒト前立腺癌組織でも免疫染色でWnt5aが発現していることを確認し、実験の臨床的意義を裏付けした。しかしこのWnt5aが前立腺癌に作用するメカニズムは不明である。

Wnt5aは19種類のWntsファミリーの一つであるが、Wntsファミリーが骨組織において何等かの役割を担っているという研究報告がある。去勢抵抗性前立腺癌において骨転移の急速な進行が併発しておこる病態を考えると、このWnt5aが骨転移巣において重要な蛋白であることが疑われる。

前立腺癌組織は上皮細胞と間質細胞が混在しており、一般に報告されている遺伝子やRNA発現は癌細胞の発現を評価しているとは言い難い。我々は顕微鏡下レーザーマイクロダイセクション法を用い、ヒト前立腺組織を上皮、間質、癌細胞に分離し、Wnt5aが上皮細胞よりも間質細胞に優位に発現して上皮-間質コミュニケーションでの意義を提示した(平成25年日本泌尿器科学会総会賞受賞)。しかし、前立腺におけるARシグナルとの関連および、骨組織におけるこれら分子機構に関する詳細は不明である。

2. 研究の目的

前立腺と骨におけるWnt5aとARシグナルのクロストークを精査し、治療標的を検出することを着想した。またWntsは分泌蛋白でありWnt5が前立腺癌で多く産生されるという我々の得た知見より、転移性前立腺癌において前立腺癌から分泌されたWnt5が血中で検出できるのではないかと考えバイオマーカーとしての可能性を探索した。

本研究の目的は、予後不良の去勢抵抗性前立腺癌の分子機序を解明し、新たな標的治療のとなりうる機構を同定し臨床応用への足掛かりを作ることである。

3. 研究の方法

1. 前立腺全摘症例のホルマリン包埋切片 (FFPE) をGleason Score (GS) 別に50サンプルRNA抽出を行いWnt5A/BmRNA発現レベルをreal time PCRで計測。

2. LNCaP細胞株のWnt5BをsiRNAにてノック

クダウン、RNA 抽出し各遺伝子の発現の変動を解析。PC3 細胞にヒトリコンビナント Wnt5B を加え 18 時間培養、MTT アッセイおよび invasion アッセイを施行。

3 .2014 年 8 月 1 日から 2015 年 8 月 30 日の期間、当院外来受診患者で画像診断により骨転移を有する去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)と診断された 59 症例および無作為に抽出した非転移性前立腺癌患者 53 例をコントロールとした。9ml 血液を採取し血清を分離、凍結保存、検出には 1 サンプルあたり血清 100ul 使用し 2 回ずつ計測した。ヒト Wnt5B を抗原とした Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) を行い血清中の Wnt5B の蛋白量を定量。EZR ソフトにより統計解析。研究の実施にあたりすべての患者にインフォームドコンセントを得た。

4. 血清 Wnt5B 測定 18 か月後の病勢・予後の前向き調査を施行。予後と血清 Wnt5B 蛋白量の関連について単変量解析を施行。

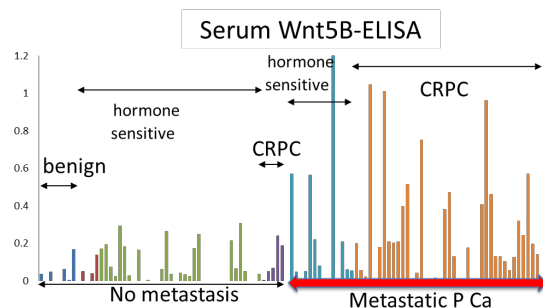
4 . 研究成果

1 . 各 GS 群で Wnt5AmRNA 発現レベルに有意差はなかったが、Wnt5BmRNA は GS6 群で 0.19 ± 0.05 と低値、GS>8 群で 0.94 ± 0.6 と高値で、発現レベルに GS<3+4 と GS>4+3 で優位に相関があった ($P=0.028$)。

2 . Wnt5B ノックダウンにより TNF、IGF、IL6、EGF の成長因子が低下した。Wnt5B 投与にて PC3 の増殖は亢進し、LNCaP、PC3 の浸潤能は増大した。

3 .骨転移症例の血清 Wnt5B 値は 0.23 ± 0.4 、非転移症例では 0.097 ± 0.1 と転移性 CRPC で優位に高かった ($P=0.29$)。血清 Wnt5B 値は、単変量解析の結果、前立腺癌骨転移との優位な関連性が示された ($OR9.82$ 、 $95\%CI$ $1.070-89.9$ 、 $P=0.03$)。また PSA 値と血清 Wnt5B 値に相関はなかった。

4 . 血清 Wnt5B 値は、測定 18 か月後の PD (progressive disease) 症例 (PSA 増大、転移増悪、緩和ケア、前立腺癌死) で有意に高値であった。 ($OR48.5$ 、 $95\%CI$ $3.9-603$ 、 $P=0.0026^*$)



Wnt5B は前立腺癌において発現量が多いほど悪性度が高く、前立腺癌細胞において成長因子の分泌を促進し、細胞増殖、浸潤能を亢進する。さらに前立腺癌骨転移症例で血中への分泌量が増大し、PSA から独立した前立腺癌骨転移および予後予測のバイオマーカーとしての臨床応用および去勢抵抗性前立腺癌の新規治療ターゲットとしての可能性が示唆された。

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 1 件)

Takahashi S, Shiraishi T, Miles N, Trock BJ, Kulkarni P, Getzenberg RH.

Nanowire analysis of cancer-testis antigens as biomarkers of aggressive prostate cancer.

Urology 2015, 85(3):704.e1-7. 査読有
doi: 10.1016/j.urology.2014.12.004

[学会発表](計 9 件)

Sayuri Takahashi

Invited lecture

The Role of Androgen Receptor and Microenvironment of Prostate Cancer

PCS World Congress of Urology2015

30 Oct, 2015 Warsaw (Poland)

Sayuri Takahashi

Androgen receptor positive stromal cells regulate prostate cancer proliferation through non-canonical Wnt Signaling
AUA Annual Meeting
16 May, 2015 New Orleans, TX (USA)

Sayuri Takahashi

Androgen receptor positive stromal cells regulate prostate cancer proliferation through non-canonical Wnt Signaling
28th Annual EAU Congress
21 March, 2015 Madrid (Spain)

高橋さゆり

Clinical Application of Serum Wnt5B as Novel Biomarker of Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer
第 105 回日本泌尿器科学総会総

2017 年 4 月 21 日 城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市)

高橋さゆり

Non-canonical Wnt シグナルと前立腺癌悪性度の関連性の検討
第 26 回泌尿器分子細胞研究会

2017 年 3 月 10 日 全労災ソレイユ (大分県大分市)

高橋さゆり

招請講演

骨転移性前立腺癌における Non-canonical Wnt シグナルを軸とする骨微小環境の分子ネットワークの解明

第 32 回前立腺シンポジウム

2016 年 12 月 10 日 東京コンファレンスセンター (東京都品川区)

高橋さゆり

招請講演

第 8 回ヤングリサーチグラント受賞者講演
「Wnt シグナルを利用した前立腺癌骨転移に対する新規治療標的とバイオマーカーの探索」

第 103 回日本泌尿器科学会総会

2015 年 4 月 19 日 石川県立音楽堂 (石川県金沢市)

高橋さゆり

若手フロンティアシンポジウム

「The Role of Androgen Receptor and Microenvironment of Prostate Cancer」

第 103 回日本泌尿器科学会総会

2015 年 4 月 18 日 ANA クラウンプラザホテル金沢 (石川県金沢市)

高橋さゆり

前立腺癌 micro-environment における Non-canonical Wnt シグナルの機能解析

第 4 回前立腺生物学シンポジウム伊勢志摩 2014

2014 年 6 月 26 日 鳥羽国際ホテル (三重県鳥羽市)

〔図書〕(計 2 件)

高橋さゆり 技術情報協会株式会社出版、

「がん」「次世代のがん治療薬・診断のための研究開発」 第 11 章 がんホルモン療法の臨床効果と最新の研究開発 第 3 節 前立腺がんにおけるホルモン療法の臨床効果
2016、284-290

高橋さゆり 技術情報協会株式会社出版、

「先端治療技術の実用化と開発戦略 (核酸医薬、免疫療法、遺伝子治療、細胞医薬品)」
第 5 章 がん領域における医療技術 (核酸医薬、免疫療法、遺伝子治療、細胞医薬品) の現状と課題 第 10 節 前立腺がんに対する免疫療法の現状 2017、284 - 290

〔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 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋さゆり (TAKAHASHI, Sayuri)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40313217

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()