

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11125

研究課題名（和文）去勢抵抗性前立腺癌のメタボローム解析を基にした新規診断法と創薬の開発

研究課題名（英文）Development of the new diagnostic method and drug discovery based on metabolic loam analysis of the castration-resistant prostate cancer

研究代表者

坂本 信一（Sakamoto, Shinichi）

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70422235

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：前立腺癌において、メタボロームの制御因子であるアミノ酸トランスポーターであるLAT1とヘテロダイマーを形成する4F2hcの腫瘍増殖における重要性を同定した。前立腺全摘標本における4F2hcの発現は、PSA再発と関連（ $P=0.0035$ ）。4F2hcの高発現は、the clinical tumors stage ($p=0.0255$) と Gleason score ($p=0.0035$)と関連した。Si4F2hcは、G0/G1 Arrestに関連し、MAPKとAKTのリン酸化を抑制した。Si4F2hcのRNA Seq解析から、下流シグナルとしてSKP-2蛋白を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌におけるアミノ酸トランスポーター LAT1/4F2hcの臨床的、基礎医学的意義を証明した。以前は、LAT1からの側面しか解析されていない中、結合蛋白である4F2hcの重要性を世界で初めて証明した。また、LAT1阻害剤は前臨床段階でPhase I試験が終了し、Phase II試験を去勢抵抗性前立腺癌において計画している。今回の結果は、今後の臨床試験の申請に活用されると思われる。平行して行った血清テストステロン値と去勢抵抗性前立腺癌患者の予後予測因子としての有用性の検討は、血清テストステロンの高低により新規AR剤が化学療法を選択すべきか示唆される実臨床に応用可能な内容であった。

研究成果の概要（英文）：In the prostate cancer, I identified the importance in the tumor increase of 4F2hc which formed LAT1 and the heterodimer which were the amino acid transporter which was the control factor of the metabolic loam. The expression of 4F2hc in the prostatic complete removal specimen is related to a PSA recurrence ($P=0.0035$). The overexpression of 4F2hc was related to the clinical tumors stage ($p=0.0255$) and Gleason score ($p=0.0035$). Si4F2hc controlled phosphorylation of MAPK and AKT in conjunction with G0/G1 Arrest. From RNA Seq analysis of Si4F2hc, I identified SKP-2 protein as the downstream signal.

研究分野：前立腺癌 アミノ酸トランスポーター

キーワード：前立腺癌 去勢抵抗性 アミノ酸トランスポーター テストステロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) の機序として、近年の次世代 Sequence の解析からもアンドロゲン受容体 (AR) の重要性が再認識されつつある。また、血液中のアミノ酸から癌の診断への応用なども一部報告されている。当科では、近年、AR が制御するアミノ酸トランスポーターを複数同定した。AR の刺激の有無やホルモン感受性から去勢抵抗性に变化する過程で、複数のアミノ酸トランスポーターの発現に変化を認めることから、去勢抵抗性獲得におけるアミノ酸代謝の変化に注目した。よって、今回、ホルモン感受性前立腺癌(HSPC)から CRPC に变化する過程で特徴となるアミノ酸の変化を追うべく患者血清から組織を用いたメタボローム解析を提案する。更に、各臨床病期で特徴となるプロファイルから責任となるアミノ酸トランスポーターを同定する中で、CRPC の診断から阻害剤を用いた創薬を目指すことを提案する。

2. 研究の目的

1. 前立腺癌、特に、CRPC に特徴的な、メタボロームを規定するアミノ酸トランスポーターを同定する。
 2. そのトランスポーターの前立腺癌細胞における機能と臨床的マーカーとしての有用性を検討する
 3. 血清の中で、予後と関連する蛋白分子を解析する。
- 最終的に、その過程の中で、新規トランスポーターX の阻害剤開発を進める

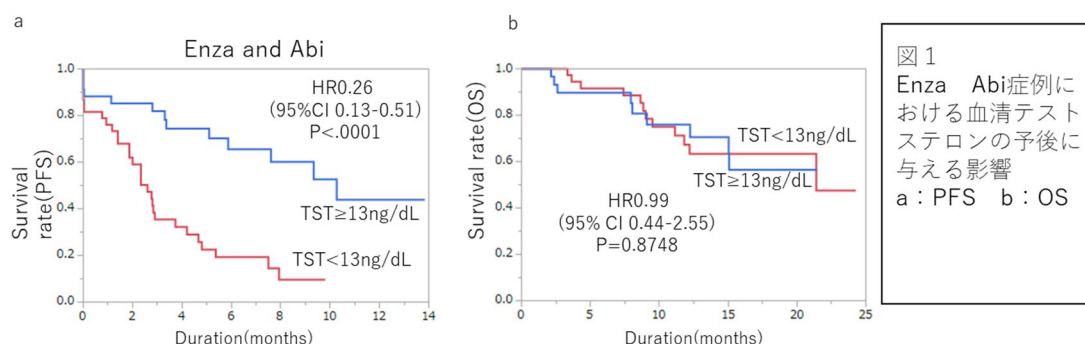
3. 研究の方法

1. CRPC 獲得過程で变化するメタボロームを規定しうる重要なアミノ酸トランスポーターX を同定。
2. 同定したトランスポーターX の去勢抵抗性前立腺癌細胞における機能と患者検体を用いた予後との相関解析を行った。同定したトランスポーターX の発現を調べるために、リアルタイム PCR とウェスタンブロッティングを用いた。siRNA を用いて PC 細胞株の機能実験を行った。X に関連する遺伝子を RNA-Seq を用いて解析した。臨床的意義を調べるために、前立腺全摘術を受けた 82 人の患者のデータを用いて解析した。
3. 血清蛋白の中で、血清テストステロンに注目して臨床情報を基に予後との関連について解析した。去勢抵抗性患者における血清テストステロンの予後解析においては、千葉大学を中心とする全国多施設の 104 例の新規アンドロゲン受容体阻害剤にて治療した患者情報と、千葉大学関連施設を中心とする 164 例のドセタキセルにて治療した患者情報を後方視的に解析した。

4. 研究成果

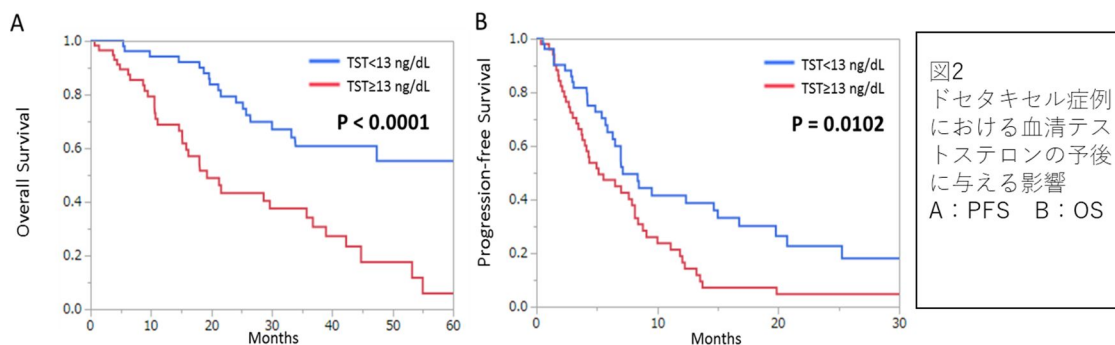
1. 去勢抵抗性前立腺癌において、メタボロームの制御因子であるアミノ酸トランスポーターとして、4F2hc を同定した。4F2hc は、必須アミノ酸を取り込む L-type Amino Acid Transporter 1 (LAT1) とヘテロダイマーを形成する結合蛋白であった。前立腺癌細胞株 (LNCAP、C4-2、PC-3、DU145) において、Si4F2hc は、細胞増殖と浸潤能と遊走能を有意に抑制した。Flow Cytometry を用いた細胞周期解析では、4F2hc のノックダウンは、G0/G1 Arrest に関連した。4F2hc のノックダウンは、MAPK と AKT のリン酸化を有意に抑制した。C4-2 細胞株を用いた Si4F2hc の網羅的 RNA Seq 解析から、下流シグナルとして SKP-2 蛋白を同定した。前立腺全摘標本において、4F2hc と SKP-2 の免疫染色における発現は、それぞれ PSA 再発と関連した ($p=0.0027$, $p=0.0029$)。多変量解析では、cT Stage (HR4.2, $p=0.028$) と 4F2hc (HR11.54, $p=0.0357$) が独立した予後予測因子であった。一方、LAT1 は、単変量解析において予後と相関しなかった ($P=0.086$)。相関解析では、4F2hc の高発現は、clinical tumors stage ($p=0.0255$) と Gleason score ($p=0.0035$) と関連した。4F2hc と SKP-2 の高発現は、前立腺癌患者検体においても、有意に PSA 再発と関連を認めた ($p<0.01$)。以上から、4F2hc は、前立腺癌の機能と予後において重要な役割を担うことが明らかとなった(現在論文投稿中)。

2. 新規 AR 剤治療を行う転移性去勢抵抗性前立腺癌患者において、Kaplan Meier 生存曲線において、血清テストステロン値が高い症例 (テストステロン 13ng/dL) において、有意に PFS が良好であった (HR0.26, $p<0.0001$) (図 1 a)。



個別解析では、Enzalutamide (Enza) 症例においては、有意に再発と関連した (HR 0.28, P=0.0044) が、Abiraterone (Abi) 症例においては、有意な傾向のみ認められた (HR 0.40, P=0.0891)。血清テストステロン値は、Enza/Abi の PFS と正の相関 ($r=0.32$, $p=0.0067$) を認めた。一方、全生存期間 (OS) に関しては、有意差を認めなかった (図 1 b) Sakamoto et al., J. Clin. Med. 2019, 8(4), 489

3. ドセタキセル化学療法を行う去勢抵抗性前立腺癌患者において、血清テストステロン 13ng/dL は、PSA 再発 (HR1.81, P=0.0108) と全生存期間 (HR3.37, P <0.0001) が有意に短い結果であった。血清テストステロン 13ng/dL は、内臓転移、High Volume、PSA 値と関連した。独立した予後予測因子である血清テストステロン値、High Volume、PSA 値からドセタキセル療法を受ける前立腺癌患者の予後予測モデルを構築した。Ando, Sakamoto et al., Prostate. 2020 Feb;80(3):247-255.



以上から、メタボロームの制御因子であるアミノ酸トランスポーター：LAT1/4F2hc の前立腺癌における臨床的重要性を示すとともに、4F2hc 下流シグナルを介した機能を証明した。また、前立腺癌において重要なメタボローム因子である血清テストステロンの予後予測因子としての有用性について、新規 AR 剤治療症例と化学療法症例において証明し報告した。

今後の方向性として、現在、アミノ酸トランスポーターLAT1/4F2hc の阻害剤を J-Pharma 株式会社と臨床応用に向けて計画している。固形癌 (胆管癌、肝臓がん、大腸がん、すい臓がん) において既に本邦で、第一層試験が終了しており、今後第二層試験を去勢抵抗性前立腺癌において施行すべく準備を進めている。

血清テストステロンについては、Chemiluminescence の測定方法では、低テストステロン値における値の正確さが課題となっている。これまで、LC/MS の解析システムを院内の検査部と構築した。今後、LC/MS 解析の結果と、日常臨床における Chemiluminescence の測定方法の Validation を行う。また、DHEAS、DHT を含めたテストステロン代謝に関与する複数の分子と去勢抵抗性前立腺癌患者の薬剤治療効果を含めた予後との関連について解析する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakamoto Shinichi, Maimaiti Maihulan, Xu Minhui, Kamada Shuhei, Yamada Yasutaka, Kitoh Hiroki, Matsumoto Hiroaki, Takeuchi Nobuyoshi, Higuchi Kosuke, Uchida Haruhito A., Komiya Akira, Nagata Maki, Nakatsu Hiroomi, Matsuyama Hideyasu, Akakura Koichiro, Ichikawa Tomohiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Higher Serum Testosterone Levels Associated with Favorable Prognosis in Enzalutamide- and Abiraterone-Treated Castration-Resistant Prostate Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 489 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8040489	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamada Y, Arai T, Kato M, Kojima S, Sakamoto S, Komiya A, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 7
2. 論文標題 Role of pre-miR-532 (miR-532-5p and miR-532-3p) in regulation of gene expression and molecular pathogenesis in renal cell carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Clinical and Experimental Urology	6. 最初と最後の頁 11-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakamoto Shinichi, Yamada Yasutaka, Amiya Yoshiyasu, Sasaki Makoto, Shima Takayuki, Komiya Akira, Suzuki Noriyuki, Akakura Koichiro, Ichikawa Tomohiko, Nakatsu Hiroomi	4. 巻 20
2. 論文標題 Treatment strategy for metastatic prostate cancer with extremely high PSA level: reconsidering the value of vintage therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Asian Journal of Andrology	6. 最初と最後の頁 432 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/aja.aja_24_18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakamoto Shinichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Editorial Comment to Local treatment for metastatic prostate cancer: A systematic review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 403 ~ 404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.13588	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamamoto S, Sakamoto S, Minhui X, Tamura T, Otsuka K, Sato K, Maimaiti M, Kamada S, Takei A, Fuse M, Kawamura K, Imamoto T, Komiya A, Akakura K, Ichikawa T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Testosterone Reduction of 480 ng/dL Predicts Favorable Prognosis of Japanese Men With Advanced Prostate Cancer Treated With Androgen-Deprivation Therapy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Genitourin Cancer	6. 最初と最後の頁 e1107-e1115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.clgc.2017.07.023. Epub 2017 Aug 3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeuchi N, Sakamoto S, Nishiyama A, Horikoshi T, Yamada Y, Iizuka J, Maimaiti M, Imamura Y, Kawamura K, Imamoto T, Komiya A, Ikehara Y, Akakura K, Ichikawa T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Biparametric Prostate Imaging, the Reporting and Data System, Version 2, and International Society of Urological Pathology Grade Predict for Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Genitourin Cancer	6. 最初と最後の頁 e817-e829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.clgc.2018.02.011. [Epub ahead of print]	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takei A, Sakamoto S, Wakai K, Tamura T, Imamura Y, Xu M, Maimaiti M, Kawamura K, Imamoto T, Komiya A, Akakura K, Ichikawa T.	4. 巻 25
2. 論文標題 Duration of androgen deprivation therapy and nadir of testosterone at 20 ng/dL predict testosterone recovery to supracastrate level in prostate cancer patients who received external beam radiotherapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Urol.	6. 最初と最後の頁 352-358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/iju.13521. Epub 2018 Jan 11.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Shinichi Sakamoto
2. 発表標題 PC-Localized prostate cancer treatment choice
3. 学会等名 2nd AUOF and the 11th annual meeting official Invitation of TUOA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinichi Sakamoto
2. 発表標題 Treatment strategy of Japanese advanced prostate cancer patients based on serum testosterone level
3. 学会等名 The Japan Society of Andrology The37th (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本信一
2. 発表標題 前立腺がんの個別化治療
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinichi Sakamoto, Satoshi Yamamoto, Koji Kawamura, Takashi Imamoto, Akira Komiya, Tomohiko Ichikawa
2. 発表標題 Testosterone Reduction of 480 ng/dL Predicts Favorable Prognosis of Japanese Men With Advanced Prostate Cancer Treated With Androgen-Deprivation Therapy.
3. 学会等名 アメリカ泌尿器科学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinichi Sakamoto
2. 発表標題 Management of androgen based therapy in prostate cancer, Unique characteristics of Japanese Cystinuria patients.
3. 学会等名 Taiwan urological oncology association (TUOA) meeting 24th-25th February 2018 Tungs' Taichung MetroHarbor Hospital Taichung Taiwan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinichi Sakamoto
2. 発表標題 Treatment strategy of prostate cancer based on testosterone level,
3. 学会等名 Asia Urological Oncology Forum 19th August 2017 Kaohsiung Chang Gung Memorial Hospital, Kaohsiung, Taiwan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 ;Shinichi Sakamoto
2. 発表標題 Beyond the PSA in treating PC patients
3. 学会等名 Taiwan Maple Urology Association (TMUA) meeting 7th April 2017 Taipei, Janssen Medical Education 8th April 2017 Kaohsiung (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今村 有佑 (Imamura Yusuke) (10568629)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	
研究分担者	安西 尚彦 (Anzai Naohiko) (70276054)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	高山 達也 (Takayama Tatsuya) (90324350)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	