

平成 21 年 1 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591876

研究課題名 (和文) 前立腺癌に対する、次世代分子治療戦略

研究課題名 (英文) Novel molecular therapeutic strategies in prostate cancer.

研究代表者

田中 基幹 (TANAKA MOTYOSHI)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：30347562

研究成果の概要：我々はPTENという癌抑制伝子を中心に前立腺癌の研究を重ねてきた。今回樹立したPTEN 遺伝子改変マウスは、前立腺における多段階発癌と徐率術によりホルモン抵抗性前立腺癌へ移行する前立腺癌発症モデルである。このモデルを中心に前立腺癌の発癌機序解明およびホルモン抵抗性獲得の分子機構の網羅的な解析を行った。また、選択的Cox2阻害薬 (Meloxicam) による癌予防研究、さらに新規合成したペプチドによる創薬の有用性をこのモデルを用いて検証した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腫瘍学

キーワード：前立腺癌、動物モデル、分子標的治療、ペプチド

1. 研究開始当初の背景

近年、前立腺特異抗原 (PSA) によるスクリーニングにより早期前立腺癌と診断の頻度は欧米に習い増加傾向にあるが、治癒可能な前立腺癌も少なくない。しかしながら、前立腺癌が生命を脅かす疾患とされるのは治療法の確立していない、いわゆる“ホルモン抵抗性前立腺癌”であり、その予後は放射線療法や化学療法などの集学的治療にも関わらず全世界的に極めて予後不良で有効な治療法がない。残念ながら、前立腺癌の発癌もしくは進展の過

程におけるホルモン抵抗性獲得の機序はいまだ不明である。また、前立腺癌の早期発見、診断や治療効果判定などにPSAはその威力が発揮され評価されている半面、その功罪として insignificant cancerまで捉えてしまうことが指摘されている。PSAは再燃性前立腺癌やホルモン抵抗性前立腺癌の指標としてももちろん有用であるが、ホルモン抵抗性前立腺癌特異的のマーカールとは言い難くその予測因子としても不十分である。近年の分子生物学的アプローチにより、前立腺癌の予後や治療予

測因子としてBcl-2 やリン酸化AktなどMolecular Markerが提唱され臨床的に用いられるようになってきた。このように、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Molecular Markerの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。各種治療に対する反応性を事前に予測することにより、PSA failureなどホルモン抵抗性難治性前立腺癌への進行を食い止め適切な治療の個別化が今後重要と思われる。

2. 研究の目的

我々はリン酸化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。我々はPTEN flox/PSA-Creの系を用い、マウス前立腺において PTEN癌抑制伝子を特異的に欠損させ、dysplasia, low grade prostatic intraepithelial neoplasm (PIN), high grade PIN, carcinoma, metastasisといった多段階発癌モデルを確立した。また、成熟後早期に徐手術を施行することによりホルモン抵抗性前立腺癌に移行する。このように、PTEN癌抑制伝子は前立腺の癌発生や進展ばかりではなく、ホルモン抵抗性獲得の機序にも関わっていることが示唆され、PTEN癌抑制伝子を中心としたPI3' K-Aktシグナル伝達系は前立腺癌の発癌機序解明の更なる糸口として非常に興味深い。我々はPTEN遺伝子治療の実現に向け遺伝子の製薬化、つまり安全でしかも高効率に細胞へ導入可能な遺伝子薬をはじめとした分子治療薬の開発研究を検討してきた。ウイルスベクターは遺伝子治療の武器として有用であるが、その弊害も多い。PTEN発現プラスミドベクターとカチオン化ゼラチンによる遺伝子徐放製剤を考案し、ヒト前立腺癌マウスモデルにおいて腫瘍増殖の抑制、血管新生阻害、apoptosisの誘導、またPTENによる活性型AktおよびBcl-2抑制作用に伴う放射線療法感受性増強などを認め、PTEN遺伝子徐放製剤を用いた治療法の可能性を示してきた。

以上の観点から、ヒト前立腺癌組織およびPTEN flox/PSA-Creマウスの癌組織におけるPI3' Kを中心としたPTENおよびその関連分子の

発現解析を行い、前立腺の癌化およびホルモン抵抗性に関連する分子を探り、これらの情報をもとにPSA以外の前立腺癌の予後や治療予測因子に有用なMolecular Markerの検索を行う。さらに、治療の個別化に必要な分子を発現解析結果よりピックアップし、治療標的候補としての可能性を検討する。治療分子は脱遺伝子治療を目指し機能ペプチドを基本としsiRNAまたはタンパク質なども使い分け、治療の個別化を目指したテーラーメイドを目指した。

3. 研究の方法

2007 および 2008 年度の 2 年間にわたり、以下に示す方法で研究を進めた。

(1) 前立腺癌治療個別化に向けた発現プロファイル解析

研究の目的に記したように、PTEN癌抑制伝子は前立腺の癌発生や進展、またホルモン抵抗性獲得の機序に重要な分子である。これに鑑み、PTEN-PI3' K-Aktシグナル伝達系を中心とした関連分子の発現解析を網羅的に行う。これらは今までに行って来た前立腺癌手術標本や生検標本材料を用いPTENを始めリン酸化AktなどPI3' Kシグナル伝達系関連分子を中心にその発現を免疫組織学的染色法により検討する。さらに、これらを発展的効率的な免疫組織染色システムである tissue microarrayの技術を利用し免疫組織学的染色を網羅的に行う。次に、PTEN conditional gene targeting (PTEN flox/PSA-Cre) の手法を用い、前述したようにマウス前立腺多段階発癌モデルおよびホルモン抵抗性前立腺癌モデルから得られる normal, dysplasia, low grade prostatic intraepithelial neoplasm (PIN), high grade PIN, carcinoma, metastasisおよびホルモン抵抗性前立腺癌組織を採取、tissue microarray法に従いPTENを始めリン酸化AktなどのPI3' Kシグナル伝達系関連分子を中心に免疫組織学的染色法による網羅的発現解析を行い、以下の前立腺癌個別化治療の分子の候補選択へつなげる。PTEN conditional gene targeting (PTEN flox/PSA-Cre) から得られる発現解析結果を参考に、前立腺の癌発生や進展、またホルモン抵抗性獲得の機序に重要な分子選定に役立てる。さらに、手術療法、ホルモン療法、放射線療法や化学療法の経過とその予後やホルモン抵抗性の有無に注目し患者記録をもとに前立腺癌手術標本や生検標本材料を用い、前立腺癌における有用なMolecular Markerとして検証する。

(2) 前立腺癌個別化治療への次世代分子治療戦略 -*in vitro* -

以上の発現プロファイルの結果から新たな治療標的分子候補の抽出を行う。5-10種類程度の治療標的分子候補を選定し、それらのドメイン解析により1分子につき数種類の機能ペプチドを設計合成する。ここで言う機能性ペプチドとは各種機能性タンパク質の機能ドメインを有しその機能を肩代わりできるものや、またリセプターや機能性タンパク質などに直接的に競合作用しその機能を阻害するブロッキングペプチドも含まれる。以上の結果を踏まえ、前立腺癌発現解析で得られた治療分子候補の機能ペプチドの作用を*in vitro*で検証し、発現解析を参考に治療カクテルによるテーラーメイド型分子治療として*in vivo*への基礎データを得る。

(3) 前立腺癌個別化治療への次世代分子治療戦略 -*in vivo* -

前立腺癌個別化治療に向けた*in vivo*分子薬物動態で得られたデータを参考に、実際の臨床応用に有用性のあるDDSを採用し検討する。用いる動物モデルは、ヒト前立腺癌細胞株PC-3にGFPを導入した PC-3/GFP細胞をヌードマウス前立腺 (dorsolateral prostate) に同所性移植する。このモデルはリンパ節転移を実体顕微鏡下に*in situ*でGFP発色により観察でき治療効果も追跡可能である。PC-3/GFP細胞を前立腺に同所移植した1週間後のマウスに、カチオンカゼラチンまたはアテロコラーゲンの2種類の基材による治療ペプチド徐放化製剤をマウス前立腺に注入する。徐放化することによりペプチドの節約と長期安定的な効果が持続する。徐放化製剤を経口 (po) または腹腔内 (ip) 投与し全身投与による治療の可能性もこのマウスモデルを用いて容易に検討できる。ここで興味深いのは、*PTEN flox/PSA-Cre*マウスの多段階マウスモデルで発癌した前立腺癌における機能ペプチドによる治療効果である。この多段階マウスモデルでは生後20週例までにほぼ100%前立腺に癌を形成してくる。5-6週よりこれらマウスに治療ペプチド徐放化製剤をマウス前立腺に注入し治療効果を検証する。上記マウスモデルを治療後1ヶ月から3ヶ月を目処にネクロプシーを行い、治療効果、さらに前立腺癌部位における病理組織学的評価、治療関連分子の発現、アポトーシスの誘導、血管新生の状況など免疫組織学的評価を行う。さらに、これらの結果から適切な治療スケジュールや投与方法など臨床応用に向けた基礎データを得る。

4. 研究成果

(1) 前立腺癌治療個別化に向けた発現プロファイル解析

PTEN conditional gene targetingにおける前立腺癌の発癌機序解明およびホルモン抵抗性獲得の機序の網羅的な解析であるが、論文化およびその特許の可能性もありここでの詳細は割愛させていただくが、新たな分子マーカーや治療候補遺伝子などの分子候補が見つかり、RT-PCRやsiRNAでの検証を行い、その成果のあり方について目下検討中である。これらの結果をもとに、前立腺癌手術標本や生検標本材料を用い免疫組織学的染色法による網羅的発現解析を行い、今後の前立腺癌個別化治療の分子の候補選択へつなげる。

(2) 前立腺癌個別化治療への次世代分子治療戦略 -*in vitro* -

我々は p16 の inhibitory sequence "FLDTLVLHR" を用い poly-Arg モチーフを持つ protein transduction domain (PTD) である Wr-t と複合体を形成させ receptor independent に細胞内に取り込ませた後、p16 の機能を回復させる PTD トランスポーターシステムを用いた分子標的治療の有用性を実証してきた。今回の研究では新規デザイン合成した機能性ペプチドの有用性の screening として *in vitro* high throughput assay を構築した。これにより、*in house* でさまざまな治療ペプチドを合成し、さらにその効果予測を効率的に screening 可能となった。さらに、ペプチドの分解による demerit および細胞内への取り込み効率向上を補うため、コラーゲンによる Drug delivery system (DDS) も樹立した。これらの方法により、候補治療ペプチドを高効率に選定し *in vivo* assay 系へ展開可能となった。

(3) 前立腺癌個別化治療への次世代分子治療戦略 -*in vivo* -

以前の予備実験では治療ペプチドの細胞内導入には Wr-t による PTD トランスポーターシステムが必要であった。今回の検討ではここでは企業との共同研究のため“ある種のコラーゲン”と言うが、このコラーゲンによりペプチドの DDS が効率的に *in vivo* で機能することが確認され、Wr-T を省くことが可能となりこのコンパウンドによる徐放効果も確認された。この結果をもとに、動物実験を行った。PC-3/GFP 細胞の同所性移植ヌードマウス前立腺 (dorsolateral prostate) では腫瘍増殖の状態を麻酔下に real-time に観察可能である。P16 機能性ペプチド局所投与と放

射線との併用では有意な腫瘍増殖の抑制として、また PTEN ペプチドの前立腺内投与により前立腺癌特異的にアポトーシス誘導が見られ、腫瘍の増殖抑制が病理組織学的に観察された。これによりペプチドを用いた新たな分子標的治療の可能性が示唆された。

Cre-LoxP のシステムによる PTEN conditional gene targeting によるとトランスジェニックニックマウスでは、前立腺における多段階発癌と徐率術によりホルモン抵抗性前立腺癌へ移行する前立腺癌 no novo モデルを確立した。このモデルを中心に PTEN 癌抑制伝子に関連した前立腺癌の発癌機序解明およびホルモン抵抗性獲得の機序の網羅的な解析を行った。さらに、この前立腺癌モデルの前臨床試験や新規治療への応用性を確認するため、選択的 Cox2 阻害薬 (Meloxicam) による Chemoprevention study、さらに新規にデザイン合成した p16 および PTEN 機能性ペプチドによる新規分子標的治療の有用性をこのモデルを用いて検証した。選択的 Cox2 阻害薬 (Meloxicam) による Chemoprevention study ではコントロール (無治療) に比べ明らかに前立腺癌の進展が有意に抑制されていた。さらに興味深いことに前立腺癌の前癌病変である PIN (prostatic intra ductal neoplasia) の発現頻度も有意に抑制していた。これらの結果から、PSA 高値、PIN 陽性患者、家族性に高リスク患者、さらに手術や放射線療法後の再発予防など幅広い応用が期待され、今後選択的 Cox2 阻害薬 (Meloxicam) による前立腺癌臨床治験が期待される。

(4) 総括

ヒト前立腺癌組織および *PTEN flox/PSA-Cre* マウスの癌組織における PI3' K を中心とした PTEN およびその関連分子の発現解析を行い、前立腺の癌化およびホルモン抵抗性に関連する分子、PSA 以外の前立腺癌の予後や治療予測因子に有用な Molecular Marker の検索を行った。さらに、治療の個別化に必要な分子を発現解析結果より選定し、治療標的候補としての可能性を検討する。治療分子は脱遺伝子治療を目指し機能ペプチドを基本とし siRNA またはタンパク質なども使い分け、治療の個別化を目指した日本オリジナルのテーラーメイド型を目指して行く。

本研究の遂行に当たり、貴重なサンプルを御提供して頂いた患者様、また的確な御指導・御助言を賜った諸先生方にこの場をかりて厚く御礼申し上げます。最後になりました

が、本研究に対する御支援を頂いた文部科学省科学研究費助成に対して深謝致します。

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)

1. Shimada, K., Nakamura, M., Ishida, E., Higuchi, T., Tanaka, M., Ota, I., and Konishi, N. c-Jun NH2 terminal kinase activation and decreased expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 play important roles in invasion and angiogenesis of urothelial carcinomas. *American Journal of Pathology*, 査読有, 171, 2007, 1003-1012.
2. Anai, S., Tanaka, M., Shiverick, K. T., Kim, W., Takada, S., Boehlein, S., Goodison, S., Mizokami, A., and Rosser, C. J. Increased expression of cyclooxygenase-2 correlates with resistance to radiation in human prostate adenocarcinoma cells. *Journal of Urology*, 査読有 177, 2007, 1913-1917.
3. Tomioka, A., Tanaka, M., DeVelasco, M., Anai, S., Takada, S., Kushibiki, T., Tabata, Y., Rosser, C. J., Uemura, H., and Hirao, H. Delivery of PTEN via a novel gene microcapsule sensitizes prostate cancer cells to irradiation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 査読有, 7, 2008, 1864-1870.
4. DeVelasco, M., Tanaka, M., Anai, S., Tomioka, A., Nishio, K., and Uemura, H. GFP image analysis in the mouse orthotopic bladder cancer model. *Oncology Report*, 査読有, 20, 2008, 537-542.
5. Haga, K., Tomioka, A., Liao, C. P., Kimura, T., Matsumoto, H., Ohno, I., Hermann; K., Logg, C. R., Tanaka, M., Hirao, Y., Hong Wu, H., Kruse, C. A., Roy-Burman, P., Kasahara, N. PTEN-Knockout Prostate Cancer as a Model for Experimental Immunotherapy. *Journal of Urology*, 査読有, 181, 2009, 354-362.

〔学会発表〕(計13件)

国内学会

1. 田中基幹 表在性膀胱癌マウスモデルを用いたリポソーム化ドキソルビシンの治療効果 第16回日本腎泌尿器予防医学研究会 2007年7月13日 大阪
2. 田中基幹 Metabolic syndrome accelerates mouse prostate cancer development 第17回泌尿器分子・細胞研究会 2008年2月16日 東京
3. 田中基幹 PTEN機能ペプチドによる前立腺癌治療への応用 第96回日本泌尿器科学会総会 2008年4月25日 横浜
4. Tanaka, M. A novel PTEN functional peptide therapy for prostate cancer. 第14回日本遺伝子治療学会 2008年6月12日 札幌
5. Tanaka, M. p16 peptide therapy radiosensitizes in prostate cancer orthotopic model. 第67回日本癌学会総会 2008年10月28日 名古屋
6. Tanaka, M. Pten functional peptide therapy in prostate cancer. 第67回日本癌学会総会 2008年10月29日 名古屋
7. 田中基幹 Pten gene targeting の手法を用いたマウス前立腺癌モデルとその臨床に向けた応用 前立腺シンポジウム 2008年12月13日 東京

国際学会

8. Tanaka, M. The Role of PTEN Tumor Suppressor Gene in Prostate Cancer Derived by Prostate Specific Deletion of PTEN. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Seattle (USA), May 30 2007, Seattle (USA).
9. Tanaka, M. Intravesical instillation of liposomal doxorubicin nanoparticles in mouse superficial bladder cancer. The 102nd Annual Meeting, American Urological Association, Inc., May 21 2007, Anaheim (USA).
10. Tanaka, M. Intravesical treatment of liposomal doxorubicin nanoparticles in mouse orthotopic bladder cancer model. The 98th Annual Meeting, American Association for Cancer Research, Apr. 15 2007, Los Angeles (USA).
11. Tanaka, M. The role of PTEN in carcinogenesis of mouse prostate. The

23rd Annual Meeting of Urological Research Society, ct. Oct. 27 2007, Napa (USA).

12. Tanaka, M. Pten functional peptide therapy in prostate cancer. The 99th Annual Meeting, American Association for Cancer Research, Apr. 15 2008, San Diego (USA).
13. Tanaka, M. Prostate cancer mouse model derived by PTEN conditional gene targeting; Towards pre-clinical application. The 24th Annual Meeting of Urological Research Society, Sept. 19 2008, Amsterdam (Netherlands).

〔その他〕

本研究に関しては、平成21年1月末に完結し、そのデータをまとめ報告した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 基幹 (TANAKA MOTYOYOSHI)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：30347562

(2) 研究分担者

植村 天受 (UEMURA HIROTSUGU)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：90213397
野澤 昌弘 (NOZAWA MASAHIRO)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：00441080
デベラスコ マルコ (DEVELASCO MARCO)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号：20449838

(3) 連携研究者

吉川 和宏 (YOSHIKAWA KAZUHIRO)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60109759
島田 啓司 (SHIMADA KEIJI)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：90336850