

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月18日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591323

研究課題名（和文） 前立腺癌のエストロゲン受容体の発現とそのリガンドを用いた新規 PET 画像診断法

研究課題名（英文） Development of New PET Imaging for Prostate Cancer using Estrogen Receptor Ligand

研究代表者

石田 泰一（ISHIDA HIROKAZU）

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00293431

研究成果の概要（和文）：前立腺癌におけるエストロゲン受容体（ER α ）の発現とその役割について、アンドロゲン除去下での前立腺癌細胞における ER 発現を ER α リガンドである PET トレーサー 16α -[^{18}F]fluoro- 17β -estradiol (FES) を用いて培養実験モデルおよび動物実験モデルにより検討した。その結果、前立腺癌細胞は、アンドロゲン除去下で ER α の発現が増加することが培養および動物実験レベルで示され、前立腺癌のアンドロゲン抵抗性獲得における ER α の関与の可能性が示唆された。また、FES を用いると組織の ER α 発現を非侵襲的に評価できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The expression and role of estrogen receptor (ER) in prostate cancer receiving androgen ablation therapy remains unclear. We assessed the expression of ER by using 16α -[^{18}F]fluoro- 17β -estradiol (FES) in prostate cancer following androgen ablation therapy in vitro and in vivo. The results of the studies indicate that ER α expression increased under androgen ablation in vitro and in vivo, showing the role of ER α in the acquaintance of androgen independency of prostate cancer. FES is a promising tracer in monitoring the expression of ER α in prostate cancer following androgen ablation therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：核医学（PETを含む）

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は米国においては 40 歳以上の男性の癌において、罹患率第一位、死亡率第二位の悪性腫瘍であり、本邦でも、生活様式や食生活の欧米化に伴い、罹患者数は年々増加している。ヒト前立腺癌にはアンドロゲンレセプターの他に、エストロゲンレセプター (ER) も多く発現しているが、その作用に関しては一定の見解が得られていない。前立腺癌患者の 90%以上は初診時にはホルモン依存性を示すため、進行性前立腺癌の治療の目的としては、従来精巣摘除術やエストロゲン製剤の投与が治療の中心であった。この前立腺癌に対するエストロゲン療法的作用機序については、エストロゲン投与によるネガティブフィードバックにより血清テストステロン値が低下することによるとされてきた。その後、エストロゲン製剤による循環器系の合併症が数多く報告されるようになると、エストロゲン製剤に代わって、もっぱら LH-RH analog や坑アンドロゲン製剤の投与による内分泌療法が用いられるようになった。ところが、内分泌療法開始後 1, 2 年の内に、前立腺癌患者の約 50%はアンドロゲン非依存性を獲得し (再燃前立腺癌)、その後 1-2 年で癌死に至る。この、再燃前立腺癌に対する有効な治療法はなく、その開発は急務である。

最近の研究では、エストロゲン療法がアンドロゲン依存性前立腺癌のみならず、再燃前立腺癌に対しても奏効する症例のあることが報告されている。再燃前立腺癌に対するエストロゲン療法的作用機序については不明な点も多いが、エストロゲン自体の ER を介した前立腺癌細胞への直接作用の存在が示唆されている。

ところが、この再燃前立腺癌に対するエストロゲン療法の治療効果は、症例に大きな差のあることが知られている。この相違の原因としては、癌の ER の発現および作用が患者間で大きく異なっている為であると考えられている。このような、患者間のエストロゲン製剤に対する治療効果の相違は、一律な内分泌療法を用いた進行前立腺癌の治療を困難かつ不十分なものにしていく。

これらの問題を克服し、より効果的な治療を施行するには、1) 前立腺癌の ER の発現を非侵襲的に定量的な評価可能な検査手段の開発、2) エストロゲン療法に対する反応の違いを考慮した癌治療の工夫、すなわち内分泌療法に加えた、化学療法、局所放射線療法の併用、3) 癌治療効果の正確な評価、4) 循環器系合併症を抑えた安全なエストロゲン製剤の開発、が重要となる。

前立腺癌に対するエストロゲン療法が再燃前立腺癌 (CRPC) に対しても奏効する症例のあることが報告されているが、その作用機序としてエストロゲン受容体 (ER) を介した前立腺癌への直接作用が示唆されている。よって、CRPC における ER 発現の評価はエストロゲン療法に対する治療効果予測に有用となる可能性がある。従来、組織の ER 発現を調べるには免疫組織学的手法や PCR 法を用いるのが一般的であるが、いずれも生検による組織標本の採取が不可欠である。しかも得られた結果が癌組織全体の ER 発現を反映しているとは限らない。ヒト前立腺癌にはエストロゲンレセプター (ER) が発現しているが、その作用に関しては一定の見解が得られていない。最近の研究からは、前立腺癌細胞において ER- α の発現量は ER- β の 3 倍にもなること、転移のある症例では ER- α レベルが低下

すること、また、アンドロゲン非依存性を獲得すると ER- β レベルが上昇することが報告されている。

16α -[F-18]-fluoroestradiol- 17β (FES) は陽電子放出核種でラベルしたエストラジオールの類似化合物として開発された (Kiesewetter D, J Nucl Med 1984;25:1212.)。このトレーサーは細胞内に取り込まれて、ER に結合する。ER には 2 種類 (ER α 、ER β) がクローニングされているが、FES はこの内の ER- α に特異的に結合することが分かっている。FES-PET はエストロゲン陽性臓器や乳腺・子宮関連疾患の診断やホルモン治療の効果判定に役立つと期待されており、既に ER 陽性乳癌の検出、病期診断、治療効果判定において FES-PET の有用性が報告されている (Dehdashti F, Eur J Nucl Med 1999;26:51.)。

2. 研究の目的

これまでの知見より、アンドロゲン依存性前立腺癌では ER- α が多く発現していること、転移性前立腺癌では ER- α が有意であること、前立腺癌がアンドロゲン依存性を喪失するに伴い ER- α の発現も低下すること、など、前立腺癌の病態には ER の発現が深く関わっている。新しいトレーサー (FES) を用いることで、前立腺癌の検出診断のみならず、転移病巣の検出を含めた病期診断、そして前立腺癌治療においてきわめて重要な情報である、癌のアンドロゲン依存性のモニタリングについても、同時に診断が可能になると期待される

(1) 本研究では、ER- α に特異的に結合する ER イメージング製剤である FES を用いて、前立腺癌に対する新規 PET 画像診断法の基礎を確立する。

(2) *in vitro*、*in vivo* モデルを用いて、各治療段階における前立腺癌の ER- α の発現量を FES-PET を用いて定量化することで、ヒト前立腺癌における ER の作用について検討する。

3. 研究の方法

前立腺癌培養細胞および動物移植前立腺癌組織を用いて、前立腺癌における FES の集積を定量評価し、癌細胞の ER- α 、ER- β の発現量を RT-PCR 法を用いて比較する。次に、前立腺癌にアンドロゲン除去療法を行い、前立腺癌にアンドロゲン非依存性を獲得させる。そして、その状態における FES の集積と ER の発現量の変化を比較する。FES-PET による前立腺癌描出能の評価は動物用 PET を用いて行う。FES-PET による癌病変の描出能、およびアンドロゲン非依存性獲得に応じた FES の集積の変化を PET を用いて検討する。

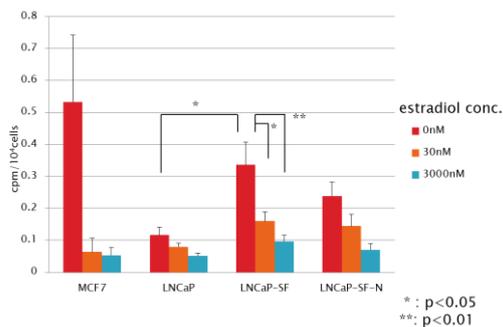
(1) アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP をあらかじめステロイド除去培地で培養した (LNCaP-SF)。通常の培地で培養した LNCaP と LNCaP-SF を 24well-plate に播種し、エストラジオールを 0nM、30nM、3000nM 添加した後に FES の細胞内集積を比較した。また、各細胞における ER の mRNA 発現を PCR 法により評価した。次に、LNCaP をヌードマウスに皮下移植し、腫瘍径が約 0.5cm になったところで去勢術を行った。去勢直後および去勢後 4、8 週後に FES をマウスの尾静脈より投与し、腫瘍における FES 集積を測定した。

(2) LNCaP をステロイド除去培地で培養した LNCaP-SF 細胞、この LNCaP-SF に発現する ER α を siRNA を用いてノックダウンした LNCaP-SF-KD 細胞、LNCaP-SF 細胞をジヒ

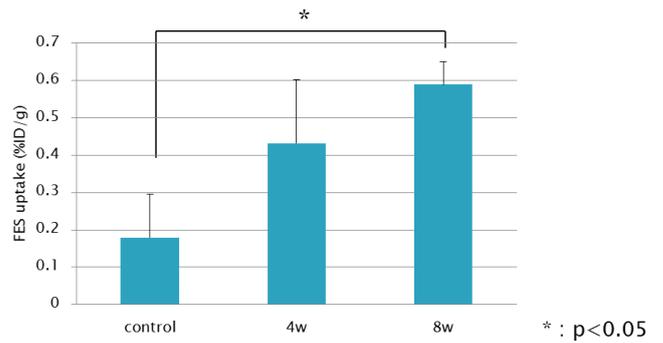
ドロテストステロンを添加したステロイド除去培地で培養したLNCaP-SF-DHT、の4種類の細胞を用いてFESの集積を比較した。また、各細胞におけるER α の核内発現を蛍光染色で、mRNA発現をPCR法により評価した。動物実験では、LNCaPを雄性ヌードマウスに皮下移植し、腫瘍径が約0.5cmになったところで去勢術を行った。去勢直後および去勢後4、8週後にFESを経静脈投与し、腫瘍組織内集積をガンマカウンターで測定した。また、小動物PETを用いて、腫瘍へのFES集積を非侵襲的に測定した。腫瘍組織におけるER α 発現は、PCR及び免疫染色法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた実験では、LNCaP細胞と比較してLNCaP-SF細胞でFESの高集積を認めた(0.11 \pm 0.02 vs. 0.33 \pm 0.07 cpm / 1x10⁴ cell, p=0.0043)。また、いずれの細胞においても、エストラジオール添加によりFES集積の低下を認めた。PCR法でもLNCaP-SF細胞のER α はLNCaP細胞より高発現であった。

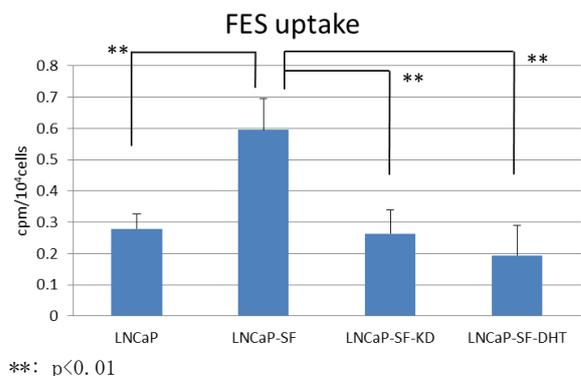


移植腫瘍を用いた実験では、腫瘍体積は去勢後4週間後より徐々に増加を認めた。FESの腫瘍集積は去勢後0週(0.18 \pm 0.171 %ID/g)に比して、4週(0.43 \pm 0.17 %ID/g)、8週(0.59 \pm 0.06 %ID/g)と、経時的な増加を認めた(0週 vs. 8週、p=0.01)。



本実験から、LNCaP細胞においては、アンドロゲン除去することでER α の発現が増加することが示され、前立腺癌のアンドロゲン抵抗性獲得におけるERの関与の可能性が示唆された。また、PETトレーサーであるFESを用いると前立腺癌細胞におけるER α 発現を非侵襲的に評価できることが示された。

(2) 培養細胞を用いたFES集積の比較では、LNCaP-SF細胞はLNCaP細胞と比較して高集積を示したが、LNCaP-SF-KDおよびLNCaP-SF-DHTではFES集積は低下した。また、移植腫瘍を用いた実験では、去勢後に一旦増殖速度が抑えられた腫瘍体積は、去勢後3週間後より再び増加した。FESの腫瘍集積は去勢後0週に比して、4週、8週と、経時的に増加することが、PETおよびガンマカウンターによる評価でも確認された。また、腫瘍におけるER α 発現とFES集積の間には正の相関を認めた。



本実験から、LNCaP 細胞においては、培地からアンドロゲン除去することで ER α の発現が増加することが培養実験および動物実験レベルで示され、前立腺癌のアンドロゲン抵抗性獲得における ER α の関与の可能性が示唆された。また、PET トレーサーである FES を用いると前立腺癌細胞における ER α 発現を非侵襲的に評価できる可能性が示された。

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3件)

- ① Hasegawa Y, Oyama N, Nagase K, Fujibayashi Y, Furukawa T, Murayama Y, Arai Y, Saito S, Welch MJ, Yokoyama O. (2012) Monoclonal antibody RM2 as a potential ligand for a new immunotracer for prostate cancer imaging. *Nuclear Medicine and Biology* 39:944-947. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2012.05.008. (査読有)
- ② Oyama N, Hasegawa Y, Kiyono Y, Kobayashi M, Fujibayashi Y, Ponde DE, Dence C, Welch MJ, Yokoyama O. (2011) Early response assessment in prostate carcinoma by 18F-fluorothymidine following anticancer therapy with docetaxel using preclinical tumour models. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38:81-89. doi: 10.1007/s00259-010-1613-z. (査読有)
- ③ 大山 伸幸, 横山 修 (2011) 前立腺癌の診断 画像診断 PET, PET-CT. *日本臨床* 69:280-284. (査読有)

[学会発表] (計5件)

- ① 長谷川陽子、大山伸幸、高原典子、三輪吉司、秋野裕信、森 哲也、清野 泰、横山 修 PET トレーサー FES を用いたアンドロゲン除去療法がおよぼす前立腺癌細胞における Estrogen 受容体発現の変化に関する基礎的検討 第 102 回日本泌尿器科学会総会、2013 年 4 月 25 日札幌
- ② Oyama N, Hasegawa Y, Takahara N, Miwa Y, Akino H, Mori T, Kiyono Y, Yokoyama O In vitro and in vivo assessment of 16 α -[¹⁸F]fluoro- 17 β - estradiol as a new PET tracer for evaluating ER expression of prostate cancer following androgen ablation therapy. 15th ICHSHC (International Congress on Hormonal Steroids and

Hormones & Cancer) 2012 年 11 月 17 日 金沢

- ③ 大山伸幸、長谷川陽子、高原典子、森 哲也、清野 泰 FES を用いたアンドロゲン除去療法が及ぼす前立腺癌のエストロゲン受容体発現の変化に関する基礎的検討 第 52 回日本核医学会学術総会、2012 年 10 月 11 日札幌
- ④ Hasegawa Y, Oyama N, Takahara N, Miwa Y, Akino H, Mori T, Kiyono Y, Yokoyama O In vivo assessment of 16 α - [¹⁸F]fluoro- 17 β -estradiol as a new PET tracer for evaluating ER expression of prostate cancer following androgen ablation therapy^{32nd} Congress of the Societe Internationale d'Urologie 2012 年 9 月 30 日福岡
- ⑤ 長谷川陽子、大山伸幸、高原典子、森 哲也、岡沢秀彦、横山 修 新規 PET トレーサー FES を用いたアンドロゲン除去療法がおよぼす前立腺癌細胞における Estrogen 受容体発現の変化に関する基礎的検討 第 101 回日本泌尿器科学会総会、2012 年 4 月 22 日福岡

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-fukui.ac.jp/home/ufms/file/kenkyu/welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 泰一 (ISHIDA HIROKAZU)
福井大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00293431

(2) 研究分担者

大山 伸幸 (OOYAMA NOBUYUKI)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20223977
森 哲也 (MORI TETSUYA)
福井大学・高エネルギー医学研究センター・助教
研究者番号：40397287
清野 泰 (KIYONO YASUSHI)
福井大学・高エネルギー医学研究センター・教授
研究者番号：50305603
高原 典子 (TAKAHARA NORIKO)
福井大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：50572426
横山 修 (YOKOYAMA OSAMU)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：90242552