

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 4 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591774

研究課題名（和文） 前立腺癌でのレニン-アンジオテンシン系のアンドロゲンレセプター発現調整の解明

研究課題名（英文） Analysis of the regulation of androgen receptor by renin-angiotensin system in prostate cancer

研究代表者

上村 博司 (UEMURA HIROJI)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号：50244439

研究成果の概要（和文）：前立腺癌細胞におけるアンドロゲンレセプターの発現調節がレニン-アンジオテンシン系によって影響を受けるかどうか、in vitro および in vivo 実験によって確認した。また、臨床研究として、アンジオテンシン II レセプターブロッカー (ARB) が前立腺癌の進展に影響するかについて検討した。その結果、ARB は AT1 レセプターを介して、アンドロゲンレセプターの発現を抑制することが、in vitro および in vivo 系実験によって証明され、さらに前立腺全摘後の PSA 再発にも、ARB が抑制的に作用することが臨床研究でも分った。

研究成果の概要（英文）：We have confirmed that renin-angiotensin system have the potential to

Regulate the expression of androgen receptor in prostate cancer cells via in vitro and in vivo experiment. Furthermore, we conducted a clinical study to confirm whether angiotensin II receptor blocker (ARB) would influence the development of prostate cancer. As a result, ARB has the potential to inhibit the expression of androgen receptor through AT1 receptor. Furthermore, clinical study revealed that ARB treatment delayed PSA rising in patients with PSA recurrence after prostatectomy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：泌尿器科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌、アンドロゲンレセプター、レニン-アンジオテンシン系

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌細胞の増殖は、アンドロゲンおよびそのレセプターである AR を介して促進されるが、再燃癌においてはアンドロゲン非依存的に増殖が起きている。しかし、アンドロゲン非依存的であっても多くの再燃癌細胞は AR を有していることは、AR が再燃癌発生の

key molecule であることを意味している。従って、AR の発現を抑制することが、再燃前立腺癌の発生や進展に有効であることが予想される。そこで、私たちはアンドロゲン非依存的に AR 発現を調整する因子として、精液中に高濃度に存在する血管収縮ペプチドである Ang II に注目した。ヒトが生殖期間を含

めた性活動を営むのは数十年と長期間にわたるのが一般的であり、それは取りも直さず前立腺細胞が Ang II や ET-1 など血管収縮ペプチドに長期間にわたって曝露されることに他ならない。ET-1 は、アンドロゲン非依存的に前立腺癌細胞の AR 発現を促進することが分かっているが、Ang II については未だ報告はない。

2. 研究の目的

この研究によって、Ang II が AR 発現に対してどのように影響するか、前立腺癌細胞を用いて分子生物学的手法を以て解析した。また、Ang II の結合する AT1 や AT2 レセプターの発現を siRNA などによって抑制することによって、AR 発現が影響を受けるかどうかを検討した。さらに、Ang II だけでなく Ang III や Ang IV、Ang(1-7) などでも、同様に AR 発現調整について解析した。

3. 研究の方法

(1) アンジオテンシンによる、ヒト前立腺癌細胞での AR 発現解析

AR を有する前立腺癌細胞の LNCaP を Ang II および Ang III を 10^{-10} M で刺激し、24 および 48 時間後に細胞を採取する。それら細胞から ISOGEN を使って total RNA を抽出し、cDNA を作成した後、AR のプライマーを用いて real-time PCR を行い、AR 発現を定量した。さらに、同細胞からタンパクを抽出してウェスタンブロットを行い、ヒト抗 AR 抗体でタンパク発現を解析した。また、LNCaP 細胞を Ang IV や CGP、Ang(1-7) で刺激し、上記と同様の方法で RT-PCR やウェスタンブロット法を行って、AR 発現の変化を調した。

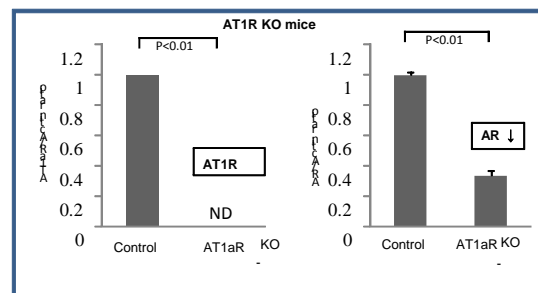
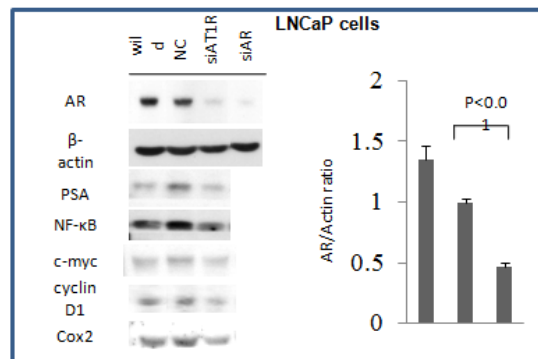
(2) AT1, AT2 レセプターのノックアウトによる AR 発現解析

AT1, AT2 レセプターそれぞれの siRNA を 3 種類作成した。それぞれを、LNCaP 細胞にリポフェクティン法で遺伝子導入し、24 時間後の細胞を採取、total RNA およびタンパクを、上記 (1) の方法と同様に抽出した。Real-time PCR 法およびウェスタンブロット法により、AR 発現を調した。また、遺伝子導入してから、7 日間培養を続け、0、1、3、5、7 日のポイントで細胞数を Cell counter で算出した。

4. 研究成果

1) Ang II および AT1 によるアンドロゲンレセプターの発現調節
前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞を Ang II で

刺激したところ、アンドロゲンレセプター (AR) の発現が誘導された。さらに、Ang II の細胞膜レセプターである AT1R の発現を、siRNA で抑制すると、ウェスタンブロット法で AR のタンパク発現は有意に抑えられた。また同時に転写因子である NFkB や cMyc などのタンパク発現を調べてみると、siRNA を遺伝子導入したがん細胞では、それぞれ発現抑制されていることが確認された。細胞形態は、顕微鏡的に観察するとアポトーシス様になっており、実際にフローサイトメトリーで測定すると、siRNA 導入細胞ではアポトーシス細胞の割合が有意差を以て増加していることが分かった。AT1R の発現をノックアウトしたマウスの前立腺での AR 遺伝子の発現を、RT-PCR で確認すると、AT1R ノックアウトマウスの方がコントロールマウスに比べ、約 70% 近く抑制されていることが分かった。以上の結果より、Ang II および AT1R を介したシグナルは、前立腺癌細胞において AR 発現を調整していることが推察された。



2) アンジオテンシン II レセプターブロッカー (ARB) による AR 発現調整の解析

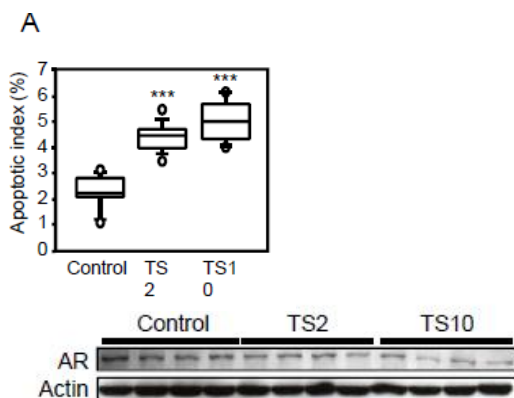
前立腺癌を発生するラット (TRAP ラット) に ARB を 12 週間投与し、前立腺癌の発生および組織形態を分子生物学的ならびに病理学的に調べた。その結果、ARB 投与した TRAP ラットは有意に前立腺癌の発生が抑制されていた (Table1)。病理学的にも、ARB 投与群の前立腺は間質の増大が認められ、アポトーシス所見も強く見られた (図 A)。前癌病変である high grade PIN の発現も、ARB 投与で

有意に抑えられていた。さらに、前立腺での AR 発現が ARB 投与群で有意に抑制されていることもウェスタンブロットで確認された (図 A)。TRAP ラットのの前立腺から RNA を抽出して cDNA に転換し、DNA マイクロアレイを行ったところ、ARB 投与群で Estrogen receptorb (ER β) の発現が増えていることが確認された。エストロゲンは AR の作用を抑制することが分かっており、ARB 投与にける AR 発現の抑制に ER β 発現亢進が一つの要因であることが推察された。

Table 1 Incidences of adenocarcinoma of the prostate glands of TRAP rats

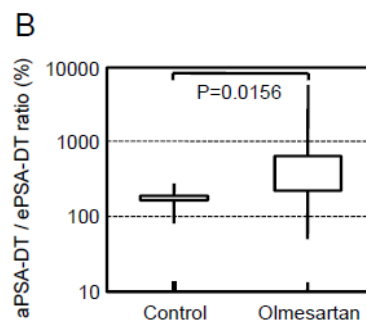
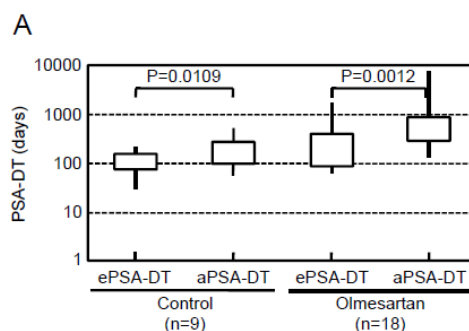
Treatment	No. of rats	Ventral AC (%)	Lateral AC (%)	Dorsal AC (%)
<Experiment 1>				
Control	11	11 (100)	9 (82)	0
TS 2 mg/kg/day	12	11 (92)	8 (67)	0
TS 10 mg/kg/day	12	9 (75)	4 (33)*	0
<Experiment 2>				
Control	12	12 (100)	12 (100)	0
CS 2 mg/kg/day	12	12 (100)	10 (83)	0
CS 10 mg/kg/day	12	11 (92)	5 (42)**	0
TS 10 mg/kg/day	12	12 (100)	4 (33)**	0

*,** P<0.05 and 0.01 vs control;
TS, telmisartan; CS, candesartan; AC, adenocarcinoma.



(3) 前立腺癌に対する ARB の抗腫瘍効果 (臨床試験)

以前、我々は去勢抵抗性前立腺癌に対して ARB 投与によって PSA の減少および全身状態の安定を来す臨床結果を得たが、今回はホルモン療法ナイーブな前立腺癌に対し、ARB が抗腫瘍効果を有するかどうかをみる臨床試験を行った。前立腺全摘術後の PSA 再発に対し、PSA: 0.2 ng/mL 以上になった時点から ARB を投与開始し、PSA 上昇速度を測定した。その結果、ARB 投与前に比べ ARB 投与後は PSA 上昇速度 (PSA 倍加時間) が 2 倍に遷延していることが統計的に確認された (図 A, B)。この結果により、ARB は前立腺癌に対し抗腫瘍効果を有することが確認された。



4) AT2 および AT4 レセプターによる前立腺癌細胞における AR 発現調節の解析

LNCaP 細胞に AT2 および AT4 レセプターの siRNA をそれぞれ遺伝子導入し、AR 発現をウェスタンブロットで調べた。その結果、両者とも AR 発現が抑制されていることが確認された。しかし、AT2 レセプターは AT1R と拮抗作用を示すシグナルを介すと推測されており、今回 AR 発現を抑制すると言った結果は予想外である。今後、このメカニズムについてさらに解明していく予定である。

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 13 件)

- (1) S Takahashi, H Uemura, A Seeni, M Tang, M Komiya, N Long, H Ishiguro, Y Kubota and T Shirai. Therapeutic targeting of angiotensin II receptor type 1 to regulate androgen receptor in prostate cancer. 2012, Prostate, 72(14):1559-72. 【査読あり】
- (2) Kobayashi N, Uemura H, Nagahama K, Okudela K, Furuya M, Ino Y, Ito Y, Hirano H, Inayama Y, Aoki I, Nagashima Y, Kubota Y, Ishiguro H. Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer. Oncotarget. 2012 Nov;3(11):1455-71.

- 【査読あり】
- (3) H Uemura, F Sano, A Nomiya, T Yamamoto, M Nakamura, Y Miyoshi, K Miki, K Noguchi, S Egawa, Y Homma and Y Kubota. Usefulness of Perflubutane Microbubble-Enhanced Ultrasound in Imaging and Detection of Prostate Cancer: Phase 2 Multicenter Clinical Trial. World J Urol. 2012, in press. 【査読あり】
- (4) H Uemura, Answer by Dr. Uemura to case 2 discussion: Castration-resistant prostate cancer, Int J Urology, 2012, 19: 379-381 【査読なし】
- (5) H Uemura, M Yanagisawa, I Ikeda, K Fujinami, A Iwasaki, S Noguchi, K Noguchi, Y Kubota, Possible Anti-tumor Activity of Initial Treatment with Zoledronic Acid with Hormonal Therapy for Bone-Metastatic Prostate Cancer in Multicenter Clinical Trial. 2012, Int J Clin Oncol, in press 【査読あり】
- (6) R Minamimoto, H Uemura, F Sano, H Terao, Y Nagashima, S Yamanaka, K Shizukuishi, U Tateishi, Y Kubota, T Inoue. The potential of FDG-PET/CT for detecting prostate cancer in patients with an elevated serum PSA level. Ann Nucl Med. 2011, 25: 21-27 【査読あり】
- (7) H Uemura, K Hoshino, Y Kubota. Engagement of renin-angiotensin system in prostate cancer. Curr Cancer Drug Targets 2011, 11(4): 442-450. 【査読あり】
- (8) K Endoh, M Nishi, H Ishiguro, H Uemura, Y Miyagi, I Aoki, H Hirano, Y Kubota, A Ryo. Identification of phosphorylated proteins involved in the oncogenesis of prostate cancer via Pin1-proteomic analysis. Prostate, 2011, 72(6): 626-637 【査読あり】
- (9) Ishiguro H, Akimoto K, Nagashima Y, Kagawa E, Sasaki T, Sano JY, Takagawa R, Fujinami K, Sasaki K, Aoki I, Ohno S, Kubota Y, Uemura H. The co-expression of aPKC . . . and IL-6 in prostate cancer tissue correlates with biochemical recurrence. Cancer

- Sci 2011, 102(8): 1576-1581 【査読あり】
- (10) K Hoshino, H Ishiguro, J Teranishi, S Yoshida, S Umemura, Y Kubota, H Uemura. Regulation of androgen receptor expression through angiotensin II type 1 receptor in prostate cancer cells. Prostate, 2011, 71 (9):964-975 【査読あり】
- (11) F Sano, H Terao, T Kawahara, Y Miyoshi, T Sasaki, K Noguchi, Y Kubota, H Uemura, Contrast-enhanced ultrasonography of the prostate: Various imaging findings that indicate prostate cancer. BJU Int, 2011, 107(9): 1404-1410 【査読あり】
- (12) Kawahara T, Oshiro H, Sekiguchi Z, Ito H, Makiyama K, Uemura H, Kubota Y. High-grade invasive urothelial carcinoma with focal plasmacytoid differentiation successfully treated by transurethral resection followed by chemoradiotherapy. Int J Urol. 2011 Dec;18(12):851-3. 【査読あり】
- (13) T Kawahara, H Ishiguro, KHoshino, J Teranishi, Y Miyoshi, Y Kubota, H Uemura. Analysis of NSAID-activated gene-1 (NAG-1) expression in prostate cancer. Urol Int. 2010, 84:198-202. 【査読あり】

〔学会発表〕 (計 24 件)

- (1) H Uemura, Possibility and Limitation of Androgen Receptor as a Molecular Target for Prostate Cancer, 19th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research, 2013年2月16日、鹿児島大学 (鹿児島)
- (2) 上村博司、前立腺癌薬物療法、今後の展開、前立腺癌 Expert Meeting Sat、2013年2月9日、ホテルニューオータニ (東京)
- (3) 上村博司、前立腺癌薬物治療の新戦略、第56回 TEUS(Tokyo Expert Urology Seminar)、2012年12月3日、東京ドームホテル (東京)
- (4) H Uemura, Y Itoh, Y Kubota, Possibility an limitation of androgen receptor as molecular target for

- prostate cancer, 15th International Congress on Hormone Steroids and Hormone & Cancer, Symposium 8, Prostate cancer, Invited. 2012年11月17日 石川県立音楽堂 (石川県)
- (5) 上村博司、限局性前立腺癌に対する放射線治療について、イブニングセミナー、「限局性前立腺癌に対する治療選択」、第62回日本泌尿器科学会中部総会、2012年11月2日富山国際会議場 (富山県)
- (6) 上村博司、去勢抵抗性前立腺癌の話題「去勢抵抗性前立腺癌－治療の現状と分子メカニズム」、学術セミナー、2012年10月27日、第50回日本癌治療学会学術集会、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (7) 上村博司、ハイリスク前立腺癌の治療戦略、症例検討パネルディスカッション、2012年10月25日、第50回日本癌治療学会学術集会、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (8) 上村博司、前立腺癌の画像診断とPSA、日本臨床検査自動化学会第44回大会、インテグレーションセミナー、2012年10月13日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (9) 上村博司、我が国における去勢抵抗性前立腺癌の現状、第19回東京前立腺癌フォーラム、シンポジウム、2012年10月6日、丸ビル (東京)
- (10) 上村博司、伊藤悠亮、石黒斉、窪田吉信、Regulation of androgen receptor by angiotensin1-7 in prostate cancer cells. (口演) 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月21日、ロイトン札幌 (北海道)
- (11) 上村博司、これから期待される前立腺癌内分泌治療薬、第9回日本臨床泌尿器科医会学術講演会、2012年7月18日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (12) 上村博司、伊藤悠亮、星野耕二、高橋智、窪田吉信、アンジオテンシンIIレセプターブロッカーの前立腺癌発生予防の実験的検証、第21回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会、2012年7月13日、高知文化プラザ (高知県)
- (13) H Uemura, Safety and efficacy of docetaxel in prostate cancer patients: based on the post-marketing surveillance in Japan. Asia-Pacific genitourinary conference, 2012年6月12-13日、台北 (台湾)
- (14) 上村博司、治療法から見た去勢抵抗性前立腺癌の進展とその対策、2012年6月1日、第25回日本老年泌尿器科学会イブニングセミナー、あわぎんホール (徳島県)
- (15) H Uemura, Answer to case discussion2, Case discussion 2 “Castration-resistant prostate cancer-CRPC”, The 7th AUA/JUA International Affiliate Society Meeting, 2012年5月20日、アトランタ、(米国)
- (16) H Uemura, Usefulness of Contrast Enhanced Ultrasound in Imaging and Detection of Prostate Cancer, Symposium “Genitourinary”, The 4th Asian Conference on Ultrasound Contrast Imaging, 2012年5月13日、ソウル (韓国)
- (17) 上村博司、去勢抵抗性前立腺癌に対するアンドロゲンレセプターの標的分子としての可能性と限界、2012年4月22日、第100回日本泌尿器科学会総会シンポジウム「前立腺癌の内分泌治療の新しい展開」、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (18) 上村博司、去勢抵抗性前立腺癌に対する新規ホルモン療法について、2011年11月25日、Urology Seminar、帝国ホテル (東京)
- (19) 上村博司、前立腺癌の新たな治療の探索、教育講演、2011年10月21日、第76回日本泌尿器科学会東部総会パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (20) Hiroji Uemura, Narihiko Hayashi, Futoshi Sano, Hitoshi Ishiguro, Kouji Hoshino, Yasuhide Miyoshi, Jun-ichi Teranishi, Kazumi Noguchi, Yoshinobu Kubota, ANGIOTENSIN II RECEPTOR BLOCKER HAS THE POTENTIAL TO SUPPRESS PSA FAILURE AFTER PROSTATECTOMY, アメリカ泌尿器科学会総会、2011年5月16日、米国ワシントンDC
- (21) 上村博司、去勢抵抗性前立腺癌の新しい標的分子と臨床への応用について、シンポジウム：前立腺癌研究の最新の進歩：基礎研究から臨床に向けて、2011年4月21日、第99回日本泌尿器科学会総会、名古屋国際会議場 (愛知県)

- (22) 上村博司、リスク分類に基づいた早期癌の治療戦略、パネルディスカッション「早期前立腺癌の治療戦略」、第48回日本癌治療学会総会、2010年10月30日、国立京都国際会議場（京都）
- (23) Hiroji Uemura, Satoru Takahashi, Kouji Hoshino, Hitoshi Ishiguro, Yoshinobu Kubota, Role of Renin-Angiotensin System in Prostate Cancer, Symposium “Angiotensin”, 14th International Congress on Hormone Steroids and Hormones & Cancer. 2010年9月22日、エンジンバラ、英国
- (24) 上村博司、前立腺癌におけるレニン-アンジオテンシン系の役割、第3回前立腺生物学シンポジウム伊勢志摩 2010、2010年6月18日、鳥羽国際ホテル（三重県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 博司 (UEMURA HIROJI)
横浜市立大学・附属病院・准教授
研究者番号：50244439

(2) 研究分担者

窪田 吉信 (KUBOTA YOSHINOBU)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：10106312

(3) 連携研究者

()

研究者番号：