

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861411

研究課題名(和文)CTOS法を用いた前立腺癌アンドロゲン維持機構の解明とオーダーメイド治療の可能性

研究課題名(英文)Maintenance of intratumoral androgens and possibility of personalized medicine in prostate cancer by using cancer tissue-originated spheroid method

研究代表者

新井 誠二 (ARAI, SEIJI)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10636210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌組織からの癌細胞塊(CTOS)作成を試みたが、おそらく組織採取の問題および前立腺癌細胞そのものの性質(初代培養が困難)から、残念ながらCTOSの形成には至らなかった。去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)組織において、副腎性アンドロゲンであるデヒドロエピアンドロステロン・サルフェート(DHEA-S)が最も高濃度に存在していた。また、CRPC組織内DHEA-S濃度は血清DHEA-S濃度とも高度に相関しており、CRPC進展メカニズムとしてDHEA-S供給によるアンドロゲン維持機構の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I tried to establish cancer tissue-originated spheroid (CTOS) from castration resistant prostate cancer (CRPC) tissues by using CTOS method. Unfortunately, however, it was impossible to make it probably due to the problems of tissue collections and an original feature of prostate cancer cells that is difficulties of establishment of primary culture from prostate cancer patient tissues. In CRPC tissues, DHEA-S was most existing androgens. Moreover, the DHEA-S concentrations in CRPC tissues were highly correlated with the serum DHEA-S concentrations, which suggest that supply of DHEA-S from serum is important for the maintenance of androgens in CRPC tissues.

研究分野：医歯薬学

キーワード：前立腺癌 CRPC CTOS法 スフェロイド アンドロゲン

1. 研究開始当初の背景

アンドロゲン除去療法は進行性前立腺癌に対しての標準治療となっているが、進行性前立腺癌の多くは約2年で治療抵抗性となり、去勢抵抗性前立腺癌(Castration resistant prostate cancer : CRPC)へと移行する。去勢抵抗性前立腺癌の増殖および進展メカニズムとして、去勢後にも関わらず前立腺癌組織内に残存する精巣性アンドロゲン(テストステロン:T、ジヒドロテストステロン:DHT)とアンドロゲンレセプターを介した細胞内シグナル伝達が重要な役割を果たすことが知られている。その供給源として、デヒドロエピアンドロステロン・サルフェート(DHEA-S)を中心とした血中副腎性アンドロゲンが知られており、前立腺癌細胞にはこれらアンドロゲンを細胞内に取り込むためのトランスポーター(SLC トランスポーター)が存在し、その遺伝子多型と予後との関連が示唆されている。したがって、CRPC 組織内におけるアンドロゲン維持機構を明らかにすることは、CRPC の増殖・進展メカニズムを解明する上で重要である。

これまでの患者個々の前立腺癌組織内ホルモン環境に関する研究の問題点として、手術もしくは生検検体を用いての研究では、正常前立腺上皮組織や間質組織を含んでしまい、前立腺癌細胞固有のホルモン環境を調べられないことであった。この問題を解決する方法として、癌細胞初代培養法に関する新たな報告がなされ(cancer tissue-originated spheroid method : CTOS 法)、癌腫によって癌組織より短時間に腫瘍細胞のみの塊(CTOS)を得る事が可能となった。前立腺癌組織検体からの安定した CTOS 作成法は確立していないが、CTOS 法による前立腺癌組織からの初代培養を確立することで、前立腺癌細胞固有のホルモン環境の解明、さらには個々の患者における治療感受性試験モデルの作成が可能となると考えた。

2. 研究の目的

- (1) CRPC 進展における前立腺癌組織内アンドロゲン維持機構の解明
- (2) CRPC 組織からの CTOS 作成とその応用

3. 研究の方法

(1) アンドロゲン維持機構に関する遺伝子発現解析：アンドロゲン依存性前立腺癌株化細胞(LNCaP)およびこれをアンドロゲン除去下に継代培養可能としたアンドロゲン非依存性前立腺癌株化細胞(LNCaP-LA)を用いて、それぞれの細胞株間におけるステロイドサルファターゼおよび SLC トランスポーターの遺伝子発現解析を行った。

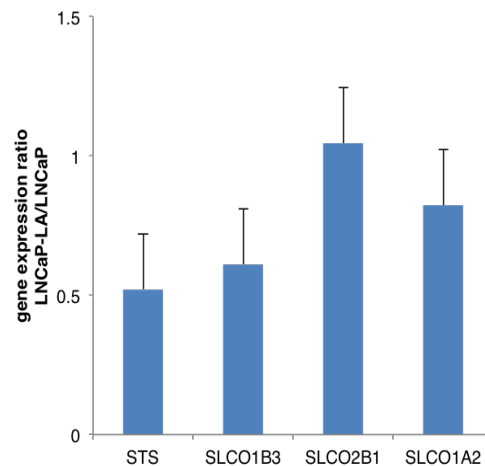
(2) CRPC 組織からの CTOS 作成および移植片マウス作成：倫理委員会の承認の下、CRPC の治療経過中に尿閉を来し、その解除目的に経尿道的前立腺切除術を施行された CRPC 患者より、前立腺癌組織を採取した。CTOS 法を

用いて、採取された CRPC 組織の一部をただちに機械的・化学的に処理し、適切な篩にかけ、直径数 100 μm の腫瘍細胞塊を回収した。これを、幹細胞培地で数時間浮遊培養し、CRPC 組織からの初代培養を試みた。また、CTOS 作成と並行して、採取した CRPC 組織の一部を数 mm の組織片に細分した後に、マトリゲルとともに免疫不全マウスの背部皮下に移植し、CRPC 移植片マウスの作成を試みた。(3) CRPC 組織におけるアンドロゲン維持機構：液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリーを用いて、CRPC 患者より採取した前立腺癌組織および血清における副腎性および精巣性アンドロゲンの定量を行い、ホルモン感受性前立腺癌患者(hormone sensitive prostate cancer : HSPC; n=4)および前立腺肥大症患者(benign prostatic hyperplasia : BPH; n=15)の組織および血清におけるアンドロゲン濃度と比較した。

4. 研究成果

(1) CRPC への進展メカニズムの一つとして、アンドロゲン除去後の前立腺癌細胞における SLC トランスポーターあるいはステロイドサルファターゼの発現上昇を想定したが、LNCaP 細胞においては、アンドロゲン非依存性獲得による SLC トランスポーターおよびステロイドサルファターゼ遺伝子発現の上昇は認められなかった。

LNCaP-LA/LNCaP 遺伝子発現の比較



(2) 以下の臨床的な背景を有した CRPC 患者に対して、経尿道的前立腺切除術により採取した CRPC 組織からの CTOS 作成を試みた。

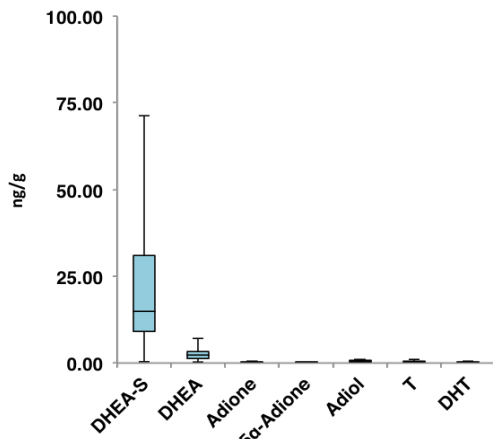
	CRPC 患者背景	
治療前 Gleason score	≤6	1
	7	2
	≥8	9
治療前病期	TanyN0M0	7
	TanyN1Many and TanyNanyM1	5
組織採取前ホルモン治療の回数	≤2	7
	≥3	6

できるだけ新鮮な状態での前立腺癌組織採取を行うため、経尿道的前立腺切除術終了後まで組織採取を待つのではなく、術中に組織を採取し、さらに電気メスによる前立腺癌細胞へのダメージを抑えるために、なるべく大きな切片で素早く切離し、組織周囲を素早くトリミングした上で、CTOS 法を行ったが、CTOS 作成には至らなかった。そのため、前立腺癌組織からの CTOS 作成のためには、原発巣ではなく例えば転移リンパ節からの組織採取等、採取部位を改める必要が考えられた。

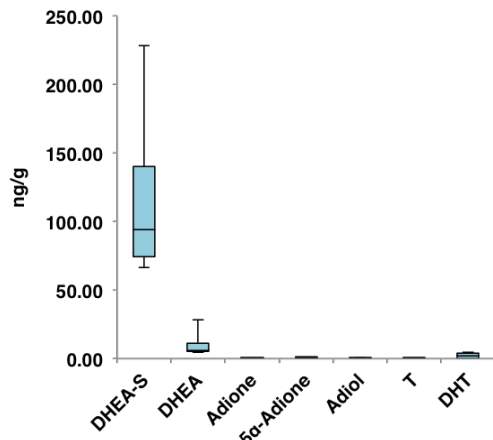
また、同時に CRPC 組織からのマウス移植片作成を試みたが、移植片の増殖を認めず、上記の組織採取部位の変更に加えて、CRPC 組織採取からマウスへの CRPC 組織移植までの時間短縮をはかる必要が考えられた。

(3) CRPC の有無に関わらず、前立腺癌組織内においては、これまで最も高濃度に存在すると考えられていた DHEA よりも DHEA-S が約 5-10 倍も高濃度に存在していた。HSPC で最も DHEA-S が高濃度となったのは、症例数が少なかったためと考えられた。CRPC 組織内での DHT 合成に関与するとされる 5-アンドロステンジオン(5-Adione)は CRPC 組織と HSPC 組織間でその差は認められなかった。

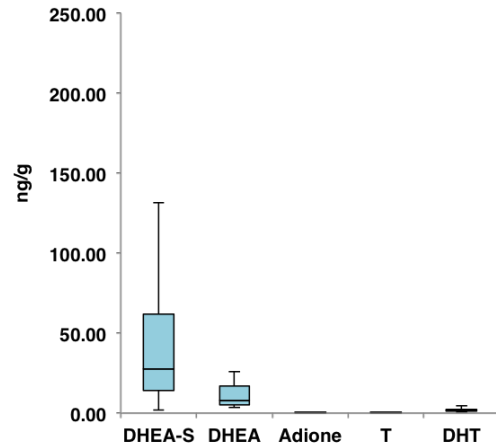
CRPC組織内アンドロゲン



HSPC組織内アンドロゲン

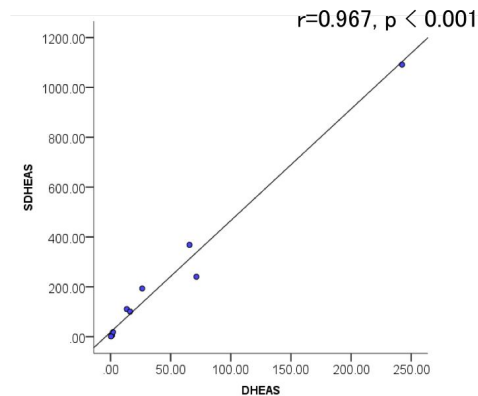


BPH組織内アンドロゲン

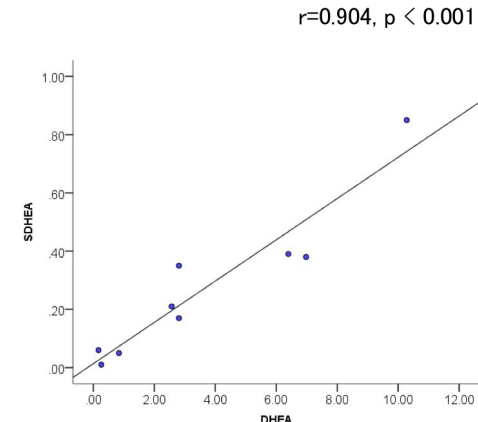


(4) CRPC 患者における血清アンドロゲン濃度と CRPC 組織内アンドロゲン濃度の比較から、血清 DHEA-S 濃度と CRPC 組織内 DHEA-S 濃度が高度に相関していた。また、CRPC 組織において、DHEA-S 濃度は DHEA 濃度とも高度に相関していた。血清においては、副腎性および精巣性アンドロゲンのうち DHEA-S が最も高濃度に存在しており、CRPC 組織は DHEA-S をアンドロゲン供給源として使用することで、組織内アンドロゲンを維持している可能性が示唆された。

血清DHEA-Sと組織内DHEA-Sの相関関係



血清DHEAと組織内DHEAの相関関係



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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 誠二 (SEIJI ARAI)
群馬大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10636210

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし