

平成21年 5月 25日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590331

研究課題名（和文）ホルモン非依存性前立腺癌での特異的癌遺伝子産物発現異常の検討と
病理診断への応用研究課題名（英文） Genetic analysis of hormone-refractory prostate cancer
in relation to the pathological diagnosis

研究代表者

降幡 睦夫（FURIHATA MUTSUO）

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：10209158

研究成果の概要：ホルモン非依存性前立腺癌で腫瘍マーカーとなりうる癌関連遺伝子候補を同定することができた。これらは前立腺癌増殖の促進に関与する新規癌関連遺伝子や、既存の癌関連遺伝子で Gleason 分類に相関して発現が亢進するものも同定している。新規癌関連遺伝子産物として同定した PKIB の連遺伝子産物を抗原として抗体を作製した。作製した抗体を用いて免疫組織化学的に前立腺癌症例を検討したところ、その発現は、正常前立腺では減弱しているが、癌組織では高発現がみられ、ホルモン非依存性前立腺癌においては、特に Gleason score が高い症例に有意に高発現を示す結果となった。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 1,000,000 | | 1,000,000 |
| 2007年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 750,000 | 4,250,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：①前立腺癌 ②ホルモン療法 ③遺伝子解析 ④病理診断 ⑤組織化学

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は増加の一途をたどり、通常の病理診断においては特に前立腺癌検診を目的とする前立腺生検材料の病理検体全体に占める割合が急増していた。前立腺生検材料に基づく病理診断を行うにあたり、臨床から病理診断への新たな要求として、認められた癌症例における腫瘍動態の病理組織学的評価を挙げることが出来る。現在の前立腺癌生検材

料の病理診断報告においては、癌の分化度、Gleason 分類、そして可能な範囲での神経周囲浸潤及び脈管侵襲の有無を記載するよう努めており、これら診断情報は各々の前立腺癌症例における腫瘍動態の評価として重要である。これら評価項目に加え実践的に有効な診断情報として要求されるものは、診断を下した前立腺癌がホルモン依存性に進行するのか否かの判断である。ホルモン依存性前

立腺癌に対してはアンドロゲン遮断療法が奏功するが、非依存性癌に対してはほとんど無効であり、これらは悪性度が高く再燃癌となりうる可能性が高く、よって早期診断に基づく的確な治療方針の決定が患者の予後に影響を与える。しかし、これら非依存性癌を診断するための有用な腫瘍マーカーは、ほとんど同定されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、レーザーマイクロビームマイクロディセクション法にて、ヒト前立腺癌、特にホルモン非依存性前立腺癌の各症例組織切片の腫瘍部より目的とする細胞を採取し、cDNA マイクロアレイ解析法を応用することによりホルモン非依存性前立腺癌で特異的に発現している癌関連遺伝子を同定し、同定し得た新規もしくは既存の癌関連遺伝子産物を抗原として、これら前立腺癌の病理診断及び治療に応用可能な抗体を作製する。作製した抗体は、免疫組織化学的に前立腺癌におけるホルモン依存性の有無の鑑別診断に応用し、その後の外科療法、ホルモン療法、化学療法もしくは放射線療法の選択や、再燃癌治療方針決定に利用する。さらにこれら抗体を用いたホルモン非依存性前立腺癌症例における新規治療法としての分子標的治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

外科的に切除されたホルモン非依存性前立腺癌の未固定凍結材料を用い、これより作製したスライド切片にて、Nikon 社マイクロディセクションシステム EZCut を用いることで、前立腺癌の各腫瘍組織材料切片より正常部、前癌病変部、腫瘍部の目的細胞を観察後それぞれ個別に採取した。各腫瘍組織においては同一症例において腫瘍細胞の分化度、異型度の相違、表層部、進達部及び脈管侵襲部位を観察し、それぞれ個別に目的部位ごとに上記手法にて選択的に細胞を切除した。これらを Dnase 処理後 RNA を抽出し、RNA 増幅後、cDNA マイクロアレイ解析を行い、目的とする前立腺癌に特異的な新規癌関連遺伝子発現を検討した。cDNA マイクロアレイ解析に関しては、National center for Biotechnology Information の UniGene データベースを基に選択された 23,040 種の cDNA を有する cDNA チップを使用し、Imaging Research 社の Array Vision ソフトウェアを用いて解析を行った。ホルモン非依存性前立腺癌に特異的な新規もしくは既存の癌関連遺伝子産物に

関しては、これを抗原として病理組織診断に有効な抗体を作製した。免疫動物としてはマウス、ラビットを用い、より特異性の高い安定した抗体作製を行った。作製された抗体に関しては、前立腺癌生検及び手術材料の病理組織標本を用い、免疫組織科学的に抗体の癌細胞への特異性を検討した。免疫組織化学染色に関しては Ventana 社の自動免疫染色装置を使用し、染色の効率化及び染色性の均一化を図り、さらには癌の分化度、Gleason 分類に基づく癌の進展度及び転移性との関連を各症例について免疫組織学的にホルモン非依存性前立腺癌症例を検討し、これら臨床病理学的諸因子における統計学的な有意差の有無を検討した。

4. 研究成果

ホルモン依存性前立腺癌に比較した場合、非依存性前立腺癌に於いては AR, ANLN, SNRPE stanniocalcin2 などの幾つかの癌関連遺伝子過剰発現と NR4A1, CYP27A1, HLA-A 遺伝子発現低下を認めた (Cancer Res. 2007, 67, 5117-25)。これら発現状態を認めた遺伝子産物に関して、免疫組織学的に検討したところ、ホルモン依存性及び非依存性前立腺癌においてそれぞれの発現増加及び発現減少が認められた。

ホルモン非依存性前立腺癌における新規癌関連遺伝子産物として PKIB を同定し (投稿中)、その連遺伝子産物を抗原として抗体を作製した。作製した抗体を用いて免疫組織化学的に前立腺癌症例を検討したところ、その発現は、正常前立腺では減弱しているが、癌組織では高発現がみられ、特にホルモン非依存性前立腺癌の全 17 症例、およびホルモン依存性前立腺癌においては Gleason score が高い症例に有意に高発現を示す結果となった。前癌病変としての PIN についての発現に関しては、ホルモン非依存性前立腺癌症例における PIN 病変自体の同定が困難であり、今後の課題となった。

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 7 件)

- ① Tamura K, Furihata M, et al.: Stanniocalcin 2 overexpression in castration – resistant prostate cancer and aggressive prostate cancer. *Cancer Sci.* 100(5):914-919, 2009 (査読有・投稿中(掲載確定))
- ② Baba M, Furihata M, et al.: Kidney-targeted Birt-Hogg-Dube gene inactivation in a mouse model: Erk1/2 and Akt-mTOR activation, cell hyperproliferation, and polycystic kidneys. *J Natl Cancer Inst.* 100:140-154, 2008 (査読有)
- ③ Hosokawa M, Kashiwaya K, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Furihata M, et al.: Over-expression of cysteine proteinase inhibitor cystatin 6 promotes pancreatic cancer growth. *Cancer Sci.* 99:1626-1632, 2008 (査読有)
- ④ Takahashi M, Furihata M, et al.: A highly bone marrow metastatic murine breast cancer model established through in vivo selection exhibits enhanced anchorage-independent growth and cell migration mediated by ICAM-1. *Clin Exp Metastasis.* 25:517-529, 2008 (査読有)
- ⑤ Tamura K, Furihata M, et al.: Molecular features of hormone -refractory prostate cancer cells by genome-wide gene expression profiles. *Cancer Res.* 67 :5117-5125, 2007 (査読有)
- ⑥ Ashida S, Furihata M, et al.: Expression of novel molecules, MICAL2-PV (MICAL2 prostate cancer variants). Increases with high Gleason score and prostate cancer progression. *Clin Cancer Res.* 12:2767-2773, 2006 (査読有)
- ⑦ Anazawa Y, Nakagawa H, Furihata M, et al.: PCOTH, a novel gene over -expressed in prostate cancers, promotes prostate cancer cell growth through phosphorylation of oncoprotein TAF-I beta/SET. *Cancer Res.* 65: 4578-4586 , 2005 (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 鄭 秀蓮, 降幡睦夫, 田村賢司, 植村元秀, 柏谷琴映, Lianhua Piao, 醍醐弥太郎, 那須保友, 三木恒治, 執印太郎, 藤岡知昭, 中村祐輔, 中川英刀: ホルモン

療法抵抗性前立腺がんが発現上昇を認める新規分子標的遺伝子

PKA-associated protein (PKAP) に対する機能解析, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008, 名古屋

- ② 中川英刀, 植村元秀, チョンソヨン, 降幡睦夫, 田村賢司, 柏谷琴映, 朴 蓮花, 植田幸嗣, 那須保友, 三木恒治, 執印太郎, 藤岡知昭, 中村祐輔: 去勢抵抗性前立腺癌に標的を絞った, ゲノム研究により前立腺癌に対する治療分子標的の同定, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008, 名古屋
- ③ 竹内 保, 降幡睦夫: 低酸素環境におけるリガンド依存性 Notch 活性化の制御システム, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008, 名古屋
- ④ 笹野公伸, 佐々木功典, 降幡睦夫, 林 慎一, 井上正樹: がんの細胞異型に迫る一核異型に対する科学的アプローチ, 第 46 回日本臨床細胞学会秋季大会, 2007, 仙台
- ⑤ 中川英刀, 田村賢司, 降幡睦夫, 鄭秀蓮, 吉岡弘樹, 中鶴修一, 三木恒治, 藤岡知昭, 執印太郎: ホルモン不応性前立腺癌細胞の遺伝子発現解析, 第 65 回日本癌学会総会, 2006, 横浜
- ⑥ 鄭秀蓮, 中川英刀, 田村賢司, 吉岡弘樹, 中鶴修一, 降幡睦夫, 三木恒治, 藤岡知昭, 執印太郎, 中村祐輔: ホルモン不応性前立腺癌で発現上昇を認める kinase の同定とその機能解析, 第 65 回日本癌学会総会, 2006, 横浜
- ⑦ 田村賢司, 中川英刀, 降幡睦夫, 鄭秀蓮, 吉岡弘樹, 蘆田真吾, 中鶴修一, 三木恒治, 藤岡知昭, 執印太郎, 中村祐輔: 前立腺癌に対する分子標的 FARM (fatty acid related molecule) の機能解析, 第 65 回日本癌学会総会, 2006, 横浜
- ⑧ 佐竹宏文, 蘆田真吾, 降幡睦夫, 執印太郎: 前立腺癌悪性度を反映する新規分子マーカーの探索, 第 65 回日本癌学会総会, 2006, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

降幡 睦夫 (FURIHATA MUTSUO)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：10209158

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中川 英刀 (NAKAGAWA HIDEWAKI)
理化学研究所・ゲノム医科学研究センター
バイオマーカー探索開発チーム・チームリーダー
研究者番号：50361621