

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19890084  
 研究課題名（和文） 前立腺癌骨転移形成に関わる癌-骨細胞間微小環境の解析と分子標的治療の確立  
 研究課題名（英文） The analysis of cancer-bone cells micro-environment and the establishment of molecular targeting therapy for bone metastases of prostate cancer  
 研究代表者 北川 育秀 (KITAGAWA YASUhide)  
 金沢大学・医学系・助教  
 研究者番号：00452102

## 研究成果の概要：

前立腺癌の特徴として造骨性骨転移の形成がある。我々は癌-骨細胞間の微小環境について研究計画を立案した。前立腺癌細胞 LNCaP-SF を SCID マウスに接種することで前立腺再燃癌および前立腺癌骨転移の動物モデルを樹立し、トラニラスト (TRN) の抗腫瘍効果および作用機序について検討した。in vitro において TRN は前立腺癌細胞の増殖を抑制し、遺伝子、蛋白レベルでアポトーシス関連因子の発現を誘導した。骨関連細胞に対しては TGF- $\beta$  1 の産生を抑制した。in vivo において皮下への移植、脛骨への移植いずれも TRN 投与群は有意に腫瘍の増殖が抑制された。以上の結果より、TRN には前立腺癌細胞に対するアポトーシスの誘導と、骨転移巣における間質細胞などに対する TGF- $\beta$  1 産生抑制とを介した抗腫瘍効果があることが示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：医歯薬学

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，転移性骨腫瘍，癌骨細胞間環境，分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の特徴として、比較的早期から造骨性骨転移を起こすことが挙げられる。この

現象は他の癌種が溶骨性骨転移を起こしやすいのと対照的であり、前立腺癌特有の癌細胞-骨細胞間の相互作用の存在が考えられ、骨転移の形成には様々な骨関連因子、増殖因

子が関与していると考えられている。

具体的に前立腺癌が骨転移を形成するまでに、

- ① 前立腺癌細胞が産生する骨吸収促進因子によって活性化された破骨細胞が骨を浸食し、溶骨性変化がおこって骨組織内に腫瘍増殖スペースが確保される。
- ② 破骨細胞の作用で形成された骨組織内のスペースに前立腺癌細胞が浸潤、接着する。
- ③ 癌細胞-骨細胞間の微少環境内で、骨吸収の促進と前立腺癌細胞の増殖、および**骨芽細胞の分化**が誘導され、造骨性骨転移が形成される。

というステップがあり、各段階に関与する因子についての解析が進んでいる。

我々は以前よりマウスを用いて前立腺癌骨転移モデルを作成することで骨転移における微少環境についての研究を進めてきた。まず、ビスフォスフォネート製剤がマウス前立腺癌骨転移モデルにおいて、造骨性骨転移、溶骨性骨転移の両方を抑制することを見出した (Cancer Res. 65: 8818-8825, 2005)。この機序として骨細胞由来因子である SDF1 の減少により、骨組織への浸潤に関与するとされるケモカイン CXCR4 の前立腺癌細胞における発現が減少するという経路が確認された。この結果は分子生物学的に前立腺癌骨転移の形成に癌-骨細胞間の相互作用が存在することを証明し、関連因子の一つを見出したものと考えている。

また、我々は第三世代ビスフォスフォネート製剤ミノドロネートを用いて、前立腺癌細胞に対する直接抗腫瘍効果を *in vitro* で検討し、ミノドロネートがアポトーシス誘導に起因する癌細胞に対する直接殺細胞効果を有することを報告した (Int J Urol 13: 593-600, 2006) 実際に臨床的にビスフォスフォネート製剤を使用することで、癌患者の PSA が低下し、臨床症状も改善した症例を経験した (J Urol 169: 281-282, 2003)。このことから、前立腺癌-骨細胞間の微少環境に関与する薬剤は癌細胞に対する直接効果を有している可能性も示唆されている。

別の因子として、我々は血管新生因子である VEGF が骨由来因子の BMP4 による調節を受けていることを確認した (Cancer Res. 64:

994-999, 2004) ため、VEGF が造骨性骨転移の形成に関与しているという仮説をたて、実際に VEGF inhibitor が *in vivo* において造骨性骨転移の形成を抑制することを見出した。*in vitro* においては、造骨性骨転移を形成する C4-2B 細胞の培養上清が前骨芽細胞の骨芽細胞への分化を誘導すること、分化には VEGF の関与が必要であることを示した (Cancer Res. 65: 10921-10929, 2005)。

一方で、現在においても新規抗癌剤の開発は課題であり、様々な研究が行われている。特に最近では、他疾患で臨床的に使用されている経口治療薬について抗腫瘍効果が認められる事例があり、作用機序の解明を目指す研究が散見される。例えば、気管支喘息などのアレルギー性疾患に対しすでに広く臨床で使用されている経口薬であるトラニラスト (TRN) による抗腫瘍効果は胃癌細胞、口腔扁平上皮癌細胞、乳癌細胞等ですでに報告されており、その機序は細胞周期の G1 停止の誘導など、様々である。また、TRN はヒト単球やマクロファージからの TGF- $\beta$  産生抑制作用が報告されているとともに、線維芽細胞の TGF- $\beta$  を介したコラーゲン産生を抑制することによるケロイド治療薬としても使用されている。

TRN の前立腺癌に対する抗腫瘍効果の報告はない。ただし、TRN が TGF- $\beta$  1 を介して抗腫瘍効果を発揮するのであれば、TGF- $\beta$  1 は前立腺全摘除術後の再発を予測するバイオマーカーとして注目されているばかりなく、骨基質に豊富に存在し、前立腺癌の骨転移巣においては骨芽細胞や前立腺癌細胞の活性化をもたらすと報告されており、TRN が前立腺癌の腫瘍増殖に対して十分効果を有するのではないかと考えられた。

## 2. 研究の目的

前述のように我々が有する分子生物学的手法で前立腺癌-骨細胞間の微少環境に関与する因子をさらに解明するとともに、各因子を総合的にとらえ、微少環境についての理解をすすめたいと考えた。各因子、経路を総合的に解明すれば、効果的な分子標的治療も可能だと考えられるため、最終的には前立腺癌

骨転移に対する臨床応用を目標とした。具体的には TRN に注目し、分子生物学的手法により前立腺癌細胞増殖、前立腺癌-骨細胞間の微少環境における作用機序の解明を行った。

### 3. 研究の方法

TRN の前立腺癌細胞株 (LNCaP、LNCaP-SF、PC-3) に対する直接的な作用を検討するために増殖実験、フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析、TUNEL アッセイによるアポトーシスの検出、そしてこれらに関連する蛋白のウェスタンブロット法による検出を行った。特に骨転移巣での作用を検討するため、骨芽細胞様細胞株 (SaOS-2) と手術に際し得られたヒトの骨組織から初代培養して得られた骨間質細胞 3 検体と LNCaP-SF との共培養を行った。TGF- $\beta$ 1 の前立腺癌細胞および SaOS-2、骨間質細胞に対する作用も検討した。また、これらの細胞の TRN 投与による TGF- $\beta$ 1 産生抑制効果を ELISA にて検討した。In vivo では SCID マウスの皮下および、造骨性転移モデルとして脛骨に LNCaP-SF を移植し、TRN を経口投与し抗腫瘍効果を検討した。倫理委員会での承認のち、HRPC 患者 16 例に対し TRN (300mg/day) を投与し、PSA により治療効果を評価した。

### 4. 研究成果

TRN は濃度依存性にすべての前立腺癌細胞株の増殖を抑制し、細胞周期の主に G1 期停止とアポトーシスを誘導した。また、これらに関連していると考えられる p53, p21, p27, Fas や cleaved PARP の蛋白レベルも増加させた。SaOS-2 や骨間質細胞と共培養させると、LNCaP-SF の増殖は著明に促進された。TGF- $\beta$ 1 を投与された骨間質細胞は、濃度依存的に細胞の形態が変化するとともに osteopontin の発現が亢進し、分化誘導されていることが示唆された。これらの変化は抗 TGF- $\beta$  抗体を投与することにより認められなくなった。TGF- $\beta$ 1 を投与された骨間質細胞に TRN を加えると、抗 TGF- $\beta$  抗体を加えたときと同様に、分化誘導が認められなくなった。ELISA では TRN を投与することにより、

SaOS-2 や骨間質細胞からの TGF- $\beta$ 1 の産生抑制が認められた。In vivo では TRN 投与により有意に SCID マウスの皮下腫瘍の増殖が抑制され ( $p=0.048$ )、脛骨での造骨性変化も阻害された ( $p=0.013$ )。臨床使用においては、TRN 投与により骨転移を有する HRPC 患者 3 例と局所進行した HRPC 患者 1 名で PSA 上昇の抑制が認められた。それぞれ PSA が投与前値をこえて明らかに上昇するまでに 13 ヶ月、10 ヶ月、1 ヶ月、3 ヶ月 (PSA 上昇抑制持続中) の奏功期間が得られた。患者背景による効果の差は認められなかった。有害事象として、肝酵素の上昇と軽度の頭痛がそれぞれ 1 例に認められたが、TRN 投与中止により速やかに改善した。

基礎的には、TRN には前立腺癌細胞に対する直接的な抗腫瘍効果と骨転移巣における骨間質細胞や骨芽細胞からの TGF- $\beta$ 1 産生抑制や間質細胞の分化誘導阻害作用を介した間接的な抗腫瘍効果があることが示された。臨床的にも、25%の HRPC 患者において PSA の上昇が抑制され、有害事象も軽度であり、一定の効果があることが示された。以上のことから、今後、TRN が前立腺癌に対する新たな治療薬となる可能性が示唆された。

### 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 1 件)

① Kouji Izumi, Atsushi Mizokami, You Qiang Li, Yasuhide Kitagawa, et al. Tranilast inhibits hormone refractory prostate cancer cell proliferation and suppresses transforming growth factor  $\beta$  1-associated osteoblastic change. The Prostate, in press.

[学会発表] (計 1 件)

①前立腺癌に対するトラニラストの抗腫瘍効果の検討. 泉浩二, 溝上敦, 李友強, 成一隆, 杉本和弘, 北川育秀, 角野佳史, 小中弘之, 高栄哲, 並木幹夫 第 24 回前立腺シンポジウム, 2008. 12. 13-14 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 育秀 (KITAGAWA YASUHIDE)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：00452102

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし