

## 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24年 5月10日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390420

研究課題名（和文） 進行性前立腺癌に対する分子マーカーの同定と癌進展の分子機構の解明

研究課題名（英文） IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS FOR ADVANCED PROSTATE CANCER AND CLARIFICATION OF MOLECULAR MECHANISM DURING PROGRESSION OF PROSTATE CANCER

研究代表者

市川 智彦（ICHIKAWA TOMOHIKO）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20241953

研究成果の概要（和文）：去勢抵抗性前立腺癌患者の血清を SELDI-TOF MS システムを用いて解析し、病状の進行に関連するマーカーとして Apolipoprotein C-I (ApoC-1) を同定した。遺伝子の発現を制御する翻訳領域を持たない低分子 RNA であるマイクロ RNA (miR-145, miR-1 and miR-133a) について解析し、前立腺癌の標的となり得る遺伝子として、fascin homolog 1 (FSCN1) と purine nucleoside phosphorylase (PNP) を同定した。ラットおよびマウス前立腺癌動物モデルを用いてセンダイウイルスベクター活性化樹状細胞療法が肺転移を抑制することを示した。

研究成果の概要（英文）：Using SELDI-TOF MS, we performed protein mass profiling of the sera from the patients with castration-resistant prostate cancer and identified apolipoprotein C-I (ApoC-I), which level increased with disease progression. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate gene expression. We examined the functional significance of such miRNAs (miR-145, miR-1 and miR-133a) in prostate cancer cells and identified the novel molecular targets, purine nucleoside phosphorylase (PNP) and Fascin homolog 1 (FSCN1). We showed that lung metastases were suppressed by the use of dendritic cells (DCs) activated by replication-competent, as well as nontransmissible-type, recombinant Sendai viruses (rSeV), in both rat and mouse prostate cancer models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：泌尿器科学

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、遺伝子解析、Apolipoprotein C-1、マイクロアレイ解析、センダイウイルスベクター、樹状細胞療法、マイクロ RNA

1. 研究開始当初の背景  
前立腺癌は、早期に診断できれば手術療法や

放射線療法などの根治療法が可能である。しかし、既に骨やリンパ節などに転移している

場合には、これらの根治療法の適応はなく、内分泌療法を行うことになる。進行癌であっても当初は内分泌療法が有効であるが、その多くはやがて去勢抵抗性癌となり死に至る。現時点では去勢抵抗性前立腺癌に対する有効な治療法は確立されておらず、抗癌剤耐性や転移能獲得を含めた癌進展の分子機構の解明と治療法の確立は、我々泌尿器科医が解決すべき重要な研究課題である。

## 2. 研究の目的

前立腺癌進展の分子機構の解明と治療法の確立を目指して本研究では以下の点を明らかにすることを目的とする。

(1) 発癌から転移能獲得、去勢抵抗性に至る分子機構に関連する分子マーカーをヒト臨床検体、前立腺癌細胞、ラット前立腺癌モデルを用いて同定する。

(2) 候補として同定した分子マーカーの解析を進め臨床上の意義を明らかにする。

(3) 新規治療法の開発に関する基礎実験を行い、臨床応用の可能性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床検体の解析

① 生検・手術・病理解剖で得られたパラフィン切片や凍結切片から LCM 装置を用いて癌組織を採取する。

② 癌組織から DNA や RNA などを抽出し遺伝子解析を行う。

③ マイクロ RNA について解析を加え、癌の進展との関連性について解析する。

④ 治療の前後、再発の前後などの時点で、患者の末梢血から得られた血液を凍結保存する。

⑤ 進行癌において特徴的な血液中のマーカーについて解析し、臨床上の意義について解析を進める。

### (2) 癌細胞の解析

① 前立腺癌細胞、正常前立腺、前立腺肥大症などについてマイクロアレイ解析を行い、癌に特徴的な遺伝子プロファイルについてさらに解析を進める。

② これらの遺伝子プロファイルとアレイ CGH 解析などの結果を比較し、遺伝子の増幅や欠失と発現の変化の関連性について解析する。

### (3) 前立腺癌動物モデルを用いた解析と新規治療法の検討

新規治療法開発の一環として、転移抑制遺伝子同定のために用いたラット前立腺癌モデ

ルやマウス前立腺癌モデルを用いて、進行癌に対する新規治療法に関する基礎実験を行い、臨床応用への可能性について解析する。

## 4. 研究成果

(1) 分子マーカーの同定では以下の成果を得た。

① 前立腺癌手術標本の解析では、染色体 CGH 解析により、多病巣性に発癌する前立腺癌はそれぞれ独立して染色体異常が蓄積し増殖・進展していることを明らかとし論文として報告した。また、マイクロアレイ解析を行い、癌組織において 5 倍以上の発現増強あるいは 5 分の 1 以下の発現減弱を呈した遺伝子のパターンから、前者では 5 つ、後者では 8 つの機能的ネットワークが存在することを明らかとし論文として発表した。

② 去勢抵抗性前立腺癌患者の血清について SELDI-TOF MS システムを用いて解析し、病状の進行とともに変化するマーカーとして Apolipoprotein C-I を同定し論文として発表した (図 1)。

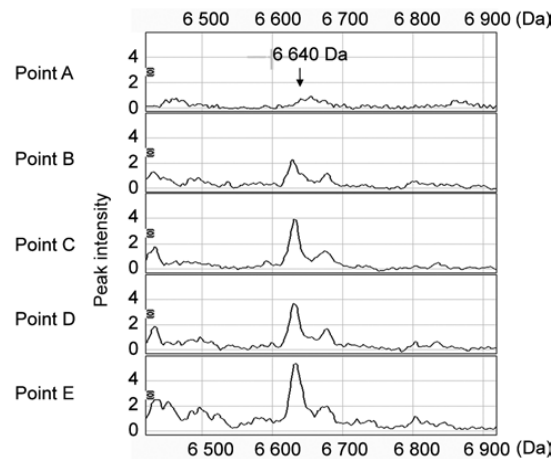


図 1 SELDI-TOF MS システムによる去勢抵抗性前立腺癌患者の血清の解析。癌の進展とともに (Point A→E)、6,640Da の peak が上昇している。この peak から Apolipoprotein C-I を同定した。(雑誌論文④)

③ 最近注目されているマイクロ RNA の 1 つである miR-145 について臨床上の意義を解析した。miR-145 がアクチン結合タンパクの 1 つである fascin homolog 1 (FSCN1) を直接制御することによりヒト前立腺癌細胞株である PC3 と DU145 の増殖、遊走、浸潤を抑制することを明らかとし、論文として報告した (図 2)。

④ さらに、miR-1 と miR-133a について解析し、前立腺癌では有意に発現が低下していることを示した。PC3 および DU145 前立腺癌細胞において、これらの miRNA を発現させると増殖や運動性、浸潤能などが有意に抑制されることを示した。遺伝子解析を進めた結果、purine nucleoside phosphorylase (PNP) が

これらのmiRNAによって直接制御されることが明らかとなった(図3)。

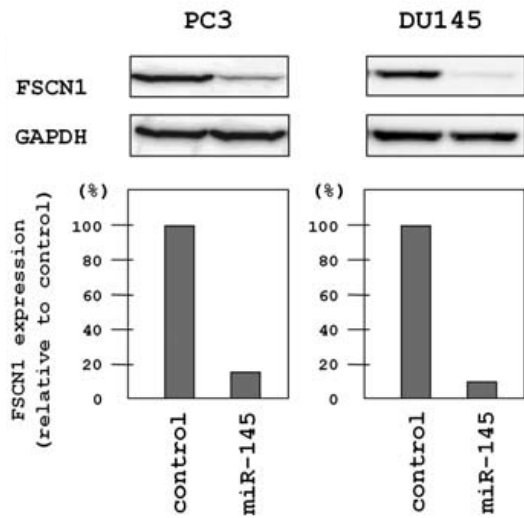


図2 miR-145によるFSCN1蛋白の発現低下(雑誌論文②)

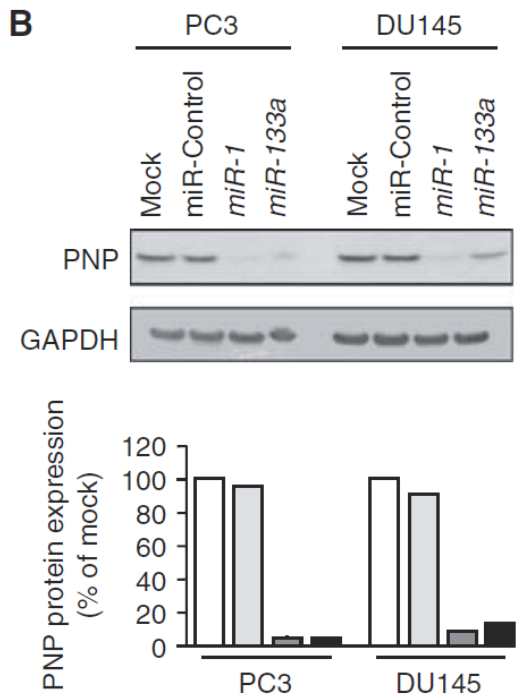


図3 miR-1およびmiR-133aによるPNP蛋白の発現低下(雑誌論文①)

(2) 同定した分子マーカーの解析

- ① (1)②で同定した Apolipoprotein C-I が血清中のマーカーとして期待できることを論文として発表した。
- ② (1)④で同定した遺伝子の発現を臨床検体で解析し、前立腺癌における標的遺伝子の候補となる可能性を示した。これらの成果を論文として報告した。

(3) 進行性前立腺癌に対する新規治療法の確立を目指して、センダイウイルスベクター活性化樹状細胞療法について解析した。この樹状細胞療法はマウスならびにラットの前立腺癌実験モデルの肺転移を抑制した(図4)。マウスモデルにおける転移抑制ではNK細胞活性が重要でありまたCD4陽性細胞も関与していることも明らかとし、論文として発表した(図5)。

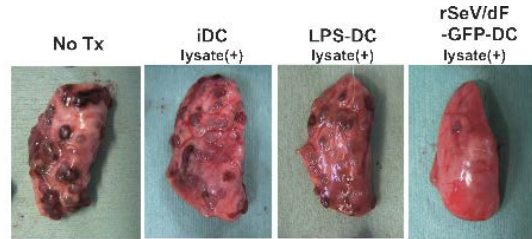


図4 センダイウイルスベクター活性化樹状細胞によるラット前立腺癌の肺転移の抑制(雑誌論文③)

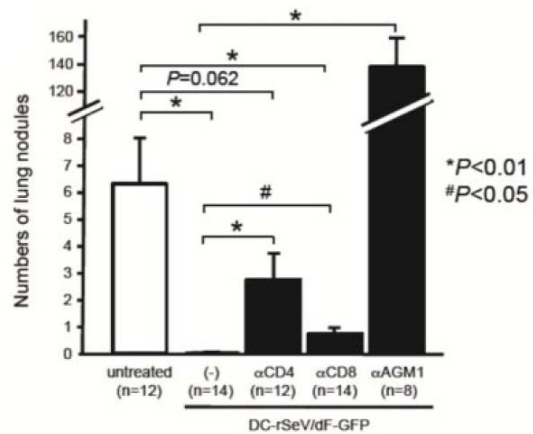


図5 マウス前立腺癌ではNK細胞活性を抑制することにより、センダイウイルスベクター活性化樹状細胞による肺転移抑制がキャンセルされる(雑誌論文⑤)

## 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25件)

- ① Kojima S, Chiyomaru T, Kawakami K, Yoshino H, Enokida H, Nohata N, Fuse M, Ichikawa T, Naya Y, Nakagawa M, Seki N. Tumour suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer. *Br J Cancer* 106(2):405-413, 2012. 査読有 DOI:10.1038/bjc.2011.462.

- ② Fuse M, Nohata N, Kojima S, Sakamoto S,

- Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1. *Int J Oncol* 38(4):1093-1101, 2011. 査読有  
DOI:10.3892/ijo.2011.919.
- ③ Kato T, Ueda Y, Kinoh H, Yoneyama Y, Matsunaga A, Komaru A, Harada Y, Suzuki H, Komiya A, Shibata S, Hasegawa M, Hayashi H, Ichikawa T, Yonemitsu Y. RIG-I helicase-independent pathway in sendai virus-activated dendritic cells is critical for preventing lung metastasis of AT6.3 prostate cancer. *Neoplasia* 12(11):906-14, 2010. 査読有  
DOI:10.1593/neo.10732
- ④ Yamamoto-Ishikawa K, Suzuki H, Nezu M, Kamiya N, Imamoto T, Komiya A, Sogawa K, Tomonaga T, Nomura F, Ichikawa T. The isolation and identification of apolipoprotein C-I in hormone-refractory prostate cancer using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Asian J Androl* 11(3):299-307, 2009. 査読有  
DOI:10.1038/aja.2008.38
- ⑤ Komaru A, Ueda Y, Furuya A, Tanaka S, Yoshida K, Kato T, Kinoh H, Harada Y, Suzuki H, Inoue M, Hasegawa M, Ichikawa T, Yonemitsu Y. Sustained and NK/CD4+ T cell-dependent efficient prevention of lung metastasis induced by dendritic cells harboring recombinant sendai virus. *J Immunol* 183(7):4211-4219, 2009. 査読有  
DOI:10.4049/jimmunol.0803845
- ⑥ Endo T, Uzawa K, Suzuki H, Tanzawa H, Ichikawa T. Characteristic gene expression profiles of benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *Int J Oncol* 35(3):499-509, 2009. 査読有  
DOI:10.3892/ijo\_00000361
- ⑦ Kobayashi M, Ishida H, Shindo T, Niwa S, Kino M, Kawamura K, Kamiya N, Imamoto T, Suzuki H, Hirokawa Y, Shiraishi T, Tanizawa T, Nakatani Y, Ichikawa T. Molecular analysis of multifocal prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Prostate* 68(16):1715-1724, 2008. 査読

有  
DOI: 10.1002/pros.20832

[学会発表] (計2件)

- ① Ichikawa T, et al. Testosterone, Androgen Receptor, and Prostate Cancer. 5th Congress of Asia Pacific Society for the Study of Aging Male. 2009年10月17日、大阪国際会議場(大阪府)
- ② Ichikawa T. Basic Research for Prostate Cancer. Third Joint Meeting of the American Urological Association and the Japanese Urological Association International Program at the 103rd Annual Meeting of the American Urological Association. 2008年5月18日、Orlando(米国フロリダ州)

[図書] (計1件)

- ① 編集:市川智彦、鈴木啓悦、メジカルビュー社、前立腺癌のすべて 基礎から最新治療まで 第3版、2011、368

[その他]

ホームページ等  
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/urology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

市川 智彦 (ICHIKAWA TOMOHIKO)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 20241953