

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390421

研究課題名（和文）前立腺癌再燃の分子機序解明とその治療戦略構築のための基礎的研究

研究課題名（英文）The basic research for elucidation of molecular mechanism of the prostate cancer recurrence and the treatment strategy construction

研究代表者

並木 幹夫 (NAMIKI MIKIO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70155985

研究成果の概要（和文）：1. 前立腺癌の再燃に関与する因子として重要なものに副腎性アンドロゲン DHEA があるが、これは、前立腺がん組織において癌細胞と間質細胞の協調的働きにより DHT に変換され、前立腺癌の再増殖に寄与することを証明した。2. 前立腺癌の骨転移に関しては骨由来 TGF- $\beta$  の作用が重要で、抗アレルギー薬であるトラニラストが、その作用を抑制し、抗腫瘍効果をもたらす可能性があることを示した。3. 再燃前立腺癌に対してはタキサン系抗癌剤を使用することが多いが、その薬剤に対する耐性メカニズムのひとつに CTEN の発現低下が関与していることを証明した。

研究成果の概要（英文）：1. Adrenal androgen, DHEA, is important for recurrence of prostate cancer. Prostate cancer stromal cells and prostate cancer cells coordinately activate the androgen receptor through synthesis of T and DHT from DHEA. 2. Tranilast inhibits hormone refractory prostate cancer cell proliferation and suppresses TGF- $\beta$ -associated osteoblastic changes. 3. We identified CTEN, one of important genes that is associated with paclitaxel resistance. Expression of CTEN recovered paclitaxel-resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

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、DHEA、間質細胞、トラニラスト、CTEN、パクリタキセル耐性

## 1. 研究開始当初の背景

PSA の導入により、限局性前立腺癌の発見率が増加し、前立腺全摘術・ブラキーセラピーなどの積極的治療により治癒率が高まってきた。一方、局所浸潤性前立腺癌や転移を有する前立腺癌に対してはホルモン療法が主に行われ、約 90% の症例に効果をあげてい

る。しかし、5年後には半数以上の症例で再燃をきたし、その後の治療に難渋しており、前立腺癌のホルモン療法抵抗性は臨床的に克服すべき重要課題である。したがって、前立腺癌再燃に対する治療戦略を考える場合、基礎研究においてなぜ再燃するのかその分子機序を明らかにすることが最も重要であ

る。

前立腺癌のアンドロゲン非依存性への変化の機序は、AR を中心にして考えた場合、様々な原因が考えられるが、大別して、(1)再燃しても AR がまだ十分な機能を果たしている「adaptation」と、(2)もはや AR とは無関係な細胞が増殖をしてしまう「clonal selection」がある。(1)では、我々は TNF $\alpha$  により前立腺癌が低濃度のアンドロゲン環境にも適応する androgen-hypersensitive となる可能性があることを示した)。これには他のサイトカインや AR の cofactor、Stat5 などの他の多くの因子の関与も考えられる。また副腎性アンドロゲンの代謝酵素の発現が DHT を産生する方向に亢進していること、結果として DHT がホルモン療法後も 25% は局所前立腺に残存していること、さらに Testosterone に変換される前の副腎性アンドロゲン androstenediol がホルモン療法後も前立腺組織にかなり残存し、かつ低濃度でも LNCaP 細胞の増殖を促進したことから、これらが前立腺癌の再燃に関与する可能性も考えられた (Intracrine のアンドロゲン合成の可能性)。これらの結果は副腎性アンドロゲンが血清中に低濃度で存在している限り、その環境に癌細胞が適応する可能性を示唆している。このような場合にはより確実な complete androgen blockade が必要となるであろう。しかし、これらの結果は間接的な証拠であり、直接的な証拠はまだ得られていない。TNF $\alpha$  などのサイトカインは周囲の環境、すなわち間質細胞や浸潤細胞からも分泌される可能性があり、間質細胞との相互作用も再燃に関与すると考えられる。また、再燃時に癌細胞が (2) のようになる場合には、様々な oncogene や AR promoter 活性の低下などが考えられる。しかし、このようになった前立腺癌ではもはや抗癌剤、分子標的治療や遺伝子治療しか治療の道は残されていない。また、再燃する場合、多くは原発巣ではなく、骨転移部位が悪化していることが多い。即ち、ホルモン療法は再燃時には骨転移巣に対して効果が弱いことを意味している。なぜ、原発巣が再燃しないにもかかわらず、骨転移巣のみが悪化するのは、ひとつには骨での様々なサイトカインの発現量の違いがあると考えられる。これらサイトカインが前立腺癌細胞にとって増殖しやすい環境を与えている可能性がある。このように、ホルモン療

法抵抗性の機序、間質細胞の影響、副腎性アンドロゲンの再燃への関与、造骨性骨転移の機序、骨転移巣での再燃の機序など、まだ明らかにしなければならないことは多い。これら再燃の分子機序を明らかにし、それに対する分子標的治療などの対策を立てるための基礎研究を行うことは、再燃前立腺癌に対する治療戦略を考える上で最も重要な課題であり、本研究が計画された。

## 2. 研究の目的

A. 前立腺癌間質細胞での副腎性アンドロゲンの代謝、間質細胞由来増殖因子の調査。ホルモン療法中の血清中の低アンドロゲン濃度の環境下でも、前立腺癌組織内では副腎性アンドロゲンが前立腺癌組織中に存在する代謝酵素により活性型アンドロゲンに変換されるために、前立腺癌の再燃が生じる可能性を示してきたが、これをより確実にするために患者の生検の検体を用いて間質細胞の培養を行い、intracrine、paracrine の現象を確認する。さらに間質細胞から放出される因子がどのように AR の活性に影響を及ぼすかを調査する。B. 前立腺癌は骨で悪化することが多いことから、骨に存在する様々な物質の前立腺癌のアンドロゲン感受性への影響を調べ、骨での再燃に関与する因子の同定を試みる。さらにその機序に対して有効な薬剤の同定を試みる。C. 再燃時にしばしば用いるタキサン系抗癌剤に対する耐性の機序として MDR (P-糖タンパク質) の過剰発現が知られているが、それ以外の耐性の機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

A. 前立腺癌間質細胞での副腎性アンドロゲンの代謝、間質細胞由来増殖因子の調査：まず、明らかに PSA が高値で、直腸診上も明らか前立腺癌と診断でき、前立腺がすべて癌で占められていると考えられる患者を選択する。患者の同意のもと、前立腺針生検で得られる前立腺癌組織をコラゲナーゼ、トリプシン処理して primary culture を行い、間質細胞を培養する。通常の場合、前立腺癌細胞などの上皮系細胞は primary culture することは困難と言われているため、primary culture で生きている細胞の多くは間質細胞と考えられる。LNCaP 細胞と間質細胞に PSA promoter で drive されるルシフェラーゼ発現

レポーターを導入後、間質細胞と共培養し、DHEA を添加すると DHEA が変換され、どのように PSA 活性を上昇させるかを調査する。特に Stage C 以上の high risk 前立腺癌患者においては、治療としてホルモン療法を行うことになるが、やがて再燃する可能性がかなり高いことが予想される。このためこの患者の針生検組織からの primary culture での活性型アンドロゲンへの変換能力と将来の再発の有無を比較検討する。

**B. 骨での増殖の機序解明：**前立腺癌の再燃は原発巣より骨転移巣が多いため、骨での環境が再燃を引き起こしている可能性がある。骨に比較的多く含まれる因子は IGF-1、TGF- $\beta$  や BMPs などである。これらの因子のアンドロゲン依存性 LNCaP 細胞の増殖に及ぼす影響を調べた後、アンドロゲン依存性 LNCaP 細胞への長期刺激により、どのようにアンドロゲン応答性が変化するかを調査する。アンドロゲン依存性 LNCaP から in vitro で樹立した LNCaP-SF は、SCID mouse の tibia に直接移植すると、造骨性増殖を示すことを既に報告している(業績 Cancer Res. 2007)。LNCaP-SF が骨芽細胞、骨由来間質細胞とどのような interaction を示すのか明らかにする。腎・副腎の手術の際に得られることのある肋骨片を細切後、primary culture を行い、骨芽細胞を含む間質細胞の培養を行う。LNCaP-SF と骨由来間質細胞を Boyden chamber を用いて coculture を行い、LNCaP-SF の増殖の変化を観察する。また、前立腺由来間質細胞との比較も行う。さらにどのような薬剤が骨との共培養において抗腫瘍効果を示すかを調査する。

**C. タキサン系抗癌剤に対する耐性化の機序解明：**タキサン系抗癌剤に対して耐性を示す細胞株 PC-3-TxR をすでに樹立してあるため、この細胞株と親株との遺伝子発現プロファイルを比較して、どのような遺伝子がタキサン系耐性に関与しているかを調査する。

#### 4. 研究成果

**A. 前立腺癌間質細胞での副腎性アンドロゲンの代謝、間質細胞由来増殖因子の調査：**LNCaP に PSA プロモーターで制御されるルシフェラーゼレポーターを導入後、正常前立腺由来間質細胞 PrSC と共培養し、DHEA を添加すると、PrSC は DHEA によるルシフェラーゼ誘導能をさらに亢進させた。肺由来の間質細胞

との共培養ではこの作用は弱かった。また、DHEA による LNCaP の増殖促進作用は軽度であったが、PrSC との共培養により、DHEA の増殖促進作用を増強させた。PrSC が DHEA によるルシフェラーゼ誘導能を亢進させる機序を明らかにするために、AR siRNA を LNCaP と PrSC にそれぞれ導入し、AR をノックダウンさせたところ、LNCaP の AR のみが発現し、PrSC の AR は発現していないことが判明した。我々は数名の進行性前立腺癌患者の前立腺針生検で得られた前立腺癌組織からの間質細胞 (PCaSC) の初代培養を行い、同様の実験を行った。PCaSC の多くは PrSC よりも DHEA による AR の活性化能を増強させた。また、PCaSC との共培養下では生理的濃度の DHEA でも LNCaP の増殖が促進された。間質細胞により DHEA がどのように変化するかを確認するため、DHEA 添加後の培養液中の T, DHT およびその前駆体の濃度を LC-MS/MS で測定した。LNCaP と PrSC あるいは PCaSC との共培養で、DHEA による AR 活性化の程度に平行して培養液中の T, DHT の濃度が間質細胞により上昇していた。以上より、DHEA は間質細胞により活性型の DHT に効率的に変換され、AR を活性化することが示唆された。

**B. 骨での増殖の機序解明：**トラニラスト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トラニラストを加えると、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 ではトラニラスト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 ではトラニラスト投与により有意に 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 ( $p=0.013$ )。

**C. タキサン系抗癌剤に対する耐性化の機序**

**解明:**我々は cDNA microarray により PC-3 とパクリタキセル耐性株 PC-3-TxR で発現の異なる遺伝子を探査し、パクリタキセル耐性の原因となる遺伝子の同定を試みていた。本研究では、耐性株で発現の抑制された遺伝子 CTEN に注目し、CTEN 発現とパクリタキセル感受性との関連を調べた。PC-3-TxR での CTEN 強制発現は感受性を回復させ、PC-3 での CTEN ノックダウンは、PC-3 の耐性化を誘導したことから、CTEN が耐性化の原因遺伝子の一つであることを証明した。さらに CTEN の発現減弱によるパクリタキセル耐性化の機序には、F-アクチン、EGFR の発現亢進が関与していた。Tissue microarray をもちいて CTEN の免疫染色を行ったところ、低分化型の前立腺癌組織で発現のレベルは低下していた。以上より、CTEN の発現の有無により Taxane 系抗癌剤に対する感受性の有無の予測が可能となるほか、再燃前立腺癌に対する Taxane 系抗癌剤と EGFR 阻害剤との併用療法の可能性を示した。

#### 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 3 件)

- ① Li, Y., Mizokami, A., Izumi, K., Narimoto, K., Namiki, M. (他4名)  
CTEN/tensin 4 expression induces sensitivity to paclitaxel in prostate cancer. *Prostate*, 70, 48-60 (2010), 査読有
- ② Izumi, K., Mizokami, A., Li, Y. Q., Narimoto, K., Namiki, M. (他6名)  
Tranilast inhibits hormone refractory prostate cancer cell proliferation and suppresses transforming growth factor beta1-associated osteoblastic changes. *Prostate* 69, 1222-34 (2009), 査読有
- ③ Mizokami, A., Koh, E., Izumi, K., Narimoto, K., Takeda, M., Honma, S., Dai, J., Keller, E., Namiki, M. Prostate cancer stromal cells and LNCaP cells coordinately activate the androgen receptor through synthesis of T and DHT from DHEA. *Endocr Relat Cancer* 16, 1139-1155 (2009), 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 溝上敦、高栄哲、泉浩二、成一本隆、小中弘之、角野佳史、北川育秀、並木幹夫、前立腺癌の再燃に対する副腎性アンドロゲン DHEA と前立腺癌間質細胞の役割、第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009 年 4 月 17 日、岡山コンベンションセンター (岡山県)
- ② 溝上敦、高栄哲、小中弘之、角野佳史、成一本隆、泉浩二、島崇、並木幹夫、前立腺癌間質細胞は副腎性アンドロゲン DHEA を変換し、アンドロゲン受容体を活性化する、第 18 回泌尿器分子細胞研究会、2009 年 2 月 14 日、鹿児島大学鶴陵会館 (鹿児島県)
- ③ YouQiang Li, Atsushi Mizokami, Kouji Izumi, Kazutaka Narimoto, Mikio Namiki. CTEN, A Gene Related with Paclitaxel-resistance and Tumor Progression in Prostate Cancer. *Advances in Prostate Cancer Research* 2009. 1. 22, The Westin San Diego Hotel (USA)
- ④ 泉浩二、溝上敦、李友強、成一本隆、杉本和宏、北川育秀、角野佳史、小中弘之、高栄哲、並木幹夫、前立腺癌に対するトラニラストの抗腫瘍効果の検討 第 24 回前立腺シンポジウム 2008 年 12 月 14 日 東京コンファレンスセンター (東京都)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 様々な細胞での DHEA から DHT に変換する酵素の活性測定法

発明者: 溝上敦, 並木幹夫

権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 特 2008-0010

出願年月日: 2008 年 7 月 16 日

国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

並木幹夫 (NAMIKI MIKIO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 70155985

(2) 研究分担者

溝上敦 (MIZOKAMI ATSUSHI)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号: 50248580

京 哲 (KYO SATORU)  
金沢大学・医学系・講師  
研究者番号：50272969

東 達也 (HIGASHI TATUYA)  
静岡県立大学・薬学部・准教授  
研究者番号：90272963