

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20791118

研究課題名（和文） サイクリン依存性キナーゼインヒビター p57 の前立腺癌ホルモン耐性獲得への関与

研究課題名（英文） The contribution of cyclin dependent kinase inhibitor p57 to prostate cancer hormone resistance

研究代表者

永田 大介（NAGATA DAISUKE）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：20336689

研究成果の概要（和文）：アンドロゲン受容体はステロイド受容体に属する核内受容体でアンドロゲン依存性に前立腺癌の発生、増殖に関与している。正の細胞周期制御因子であるサイクリンE、サイクリンD1はアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞で高発現を認めたが、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞では低下していた。一方、負の制御因子であるサイクリン依存性キナーゼインヒビターp57の発現はアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞で明らかに低下していた。前立腺組織免疫染色でも、p57の発現が前立腺正常組織と比較して前立腺癌組織では低下し、ホルモン耐性となった前立腺癌組織ではp57の発現が殆ど認められなかった。

研究成果の概要（英文）：The androgen receptor occurs the prostate cancer in the androgen dependence by the nuclear receptor that belongs to the steroid receptor, and takes part in proliferation. It has decreased in the androgen dependency prostate cancer cell though cyclin E and cyclin D1 that was the positive cell cycle restrictor admitted the high expression by the androgen non-dependency prostate cancer cell. On the other hand, the appearance of cyclin dependent kinase inhibitor p57 that is a negative restrictor has decreased obviously by the androgen non-dependency prostate cancer cell. Also as for the prostate tissue immunity dye, the appearance of p57 decreased in the prostate cancer lesion compared with the prostate normal lesion, and the appearance of p57 was hardly admitted in the prostate cancer lesion that had become a hormone resistance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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、細胞周期、サイクリン依存性キナーゼインヒビター

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の大部分はアンドロゲン存在

下で発癌、増殖し、アンドロゲン除去（ホルモン療法）により、癌細胞はアポトーシ

スを起こし、制癌される。しかし、その制癌効果は長期持続せず、転移病期においては2年以内に約半数が、5年以内に約70%がアンドロゲンの除去にもかかわらず再増殖し、ホルモン耐性となる。従って、前立腺癌におけるホルモン耐性機構を解明することが重要で治療にもつながると考えられる。

本研究では、前立腺癌のホルモン耐性機構獲得に関与する因子を明らかにするとともに治療への応用を図る。

アンドロゲン受容体はステロイド受容体に属する核内受容体でアンドロゲン依存性に前立腺癌の発生、増殖に関与している。長年の間、前立腺癌のホルモン耐性機構は不明であったがアンドロゲン受容体の遺伝子変異が報告されてから徐々にではあるが希望がみえてきた。しかし、アンドロゲン受容体の変異のないホルモン耐性前立腺癌が圧倒的に多く、アンドロゲン受容体の変異のみでは説明できないことが現状である。最近ではアンドロゲン受容体の転写を活性化する転写共役因子の基礎研究が報告されるようになった。これまでにアンドロゲン依存性ヒト癌細胞株を用いた研究で、正の細胞周期制御因子であるサイクリンがアンドロゲン受容体の転写を活性化する一因子であることを証明した。しかし、サイクリンだけではアンドロゲン非存在下でアンドロゲン受容体の転写を十分に活性化することはできなかった。そこで、細胞周期の負の制御因子であるサイクリン依存性キナーゼインヒビター (p21、p27、p57) に着目した。前立腺癌や同じホルモン依存性癌である乳癌や卵巣癌ではサイクリン依存性キナーゼインヒビターの発現が癌の悪性度や予後との関連が報告されている。

今回の研究では、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 LNCaP-HR で発現が消失した p57 を前立腺癌のホルモン耐性機構及び前立腺癌の増殖抑制に影響を与える重要な因子と考え、そのメカニズムを解明す

る。

2. 研究の目的

アンドロゲン受容体に関しては、細胞周期制御因子がアンドロゲン受容体転写共役因子として働き、前立腺癌のホルモン療法抵抗性及び悪性度の上昇に影響を与える重要な因子であることが予想される。最近では、様々なステロイド受容体の転写活性を増強する因子がクローニングされているが、前立腺癌のホルモン耐性のメカニズムとの関係は全く報告されていない。

サイクリン依存性キナーゼインヒビター：p21、p27、p57 と他のステロイド受容体転写共役因子との関連をアンドロゲン受容体の転写レールで解析することで、前立腺癌のホルモン耐性機構獲得のメカニズムの解明と前立腺癌におけるホルモン療法抵抗性の早期診断、治療への応用を研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) 内分泌療法に対する効果の異なる前立腺癌臨床検体を総数 120 例用いてアンドロゲン受容体、サイクリン依存性キナーゼインヒビター (p21、p27、p57) の mRNA レベルおよびタンパクレベルでの前立腺癌組織内発現量を調べる。

さらにホルモン療法の反応性、再発の有無、Stage、Gleason Grade、PSA 値と発現陽性例との関係を検討する。

(2) アンドロゲン依存性前立腺癌株 LNCaP と既に確立しているアンドロゲン非依存性前立腺癌株 LNCaP-HR、他のアンドロゲン非依存性前立腺癌株として PC3、DU145 を用いて細胞周期制御因子 (サイクリン A、サイクリン D1、サイクリン E、Cdk2、Cdk4、p21、p27、p57) の発現量、増殖能等を測定する。

(3) サイクリン依存性キナーゼインヒビタ

ー (p21、p27、p57) の cDNA とネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだ発現ベクターを作製する。この発現ベクターをアンドロゲン依存性前立腺癌株 LNCaP、アンドロゲン非依存性前立腺癌株 LNCaP-HR に各々導入し、永久発現細胞を樹立する。

(4) 樹立した LNCaP と LNCaP-HR の p21、p27、p57 の高発現細胞株の発現量を分析し、増殖能、アンドロゲン感受性を比較検討する。また、確立された永久発現細胞の増殖能を個体レベルで見るとするためにヌードマウスに移植し、腫瘍塊を経時的に計測する。また、腫瘍塊形成後にヌードマウスを去勢し、アンドロゲンの有無による増殖の変化を解析する。

(5) p57 はアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP で多く発現しており、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞 LNCaP-HR では極端に発現が低下する。目的遺伝子の発現を拮抗させて抑制する siRNA 法を用いて p57 の発現を抑制したときのアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP の増殖能、アンドロゲン感受性等を検討する。

4. 研究成果

前立腺癌のホルモン耐性機構を解析する実験モデルを作製するために、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP を長期間アンドロゲン非存在下で継代培養し、アンドロゲン非依存性 LNCaP (LNCaP-HR) を樹立した。

細胞周期制御因子の発現をこれらの細胞株で比較した結果、正の細胞周期制御因子であるサイクリン E、サイクリン D1 は LNCaP-HR で LNCaP の約 2~4 倍発現しており、逆に負の制御因子であるサイクリン依存性キナーゼインヒビターである p21、p27、p57 の発現は LNCaP より LNCaP-HR で低下していた。

なかでも p57 の発現に関しては、LNCaP で認められた十分な発現が LNCaP-HR では消失していた。

前立腺癌患者から手術または検査で摘出

した組織標本、コントロールとして前立腺肥大症、膀胱癌患者から摘出した前立腺肥大、正常前立腺の組織標本を用いて、p57 の発現を組織レベルで確認し、患者の予後、再発、ホルモン療法の感受性、悪性度とどの程度相関性があるかを p21、p27 と比較検討した。

他のサイクリン依存性キナーゼインヒビター p21、p27 に関しては、組織内の発現では悪性度や予後に関係していたが、p57 は悪性度ではなく予後に関係していた。サイクリン依存性キナーゼインヒビター : p21、p27、p57 を前立腺癌細胞に導入し、フローサイトメトリーで調べた結果、増殖能と DNA 合成能は低下し、細胞周期の G1 期での停止が認められた。

次に、これまでとは逆に、発現を抑えて細胞の変化を解析した。

p57 はアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP で多く発現しており、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞 LNCaP-HR では極端に発現が低下していた。

siRNA 法を用いて p57 の発現を抑制させると LNCaP の増殖能と DNA 合成能は増加した。

前立腺組織免疫染色でも、p27、p57 の発現が前立腺正常組織と比較して前立腺癌組織では低下し、ホルモン耐性となった前立腺癌組織では p57 の発現が殆ど認められなかった。同様の核内受容体である PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ) は前立腺癌組織内での発現が高く、その内因性リガンドである Prostaglandin J2 や外因性リガンドのチアゾリジン誘導体である Troglitazone、Pioglitazone、Rosiglitazone により前立腺癌細胞の増殖は抑制された。

これまでの研究で、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株や前立腺癌組織内で発現が低下したサイクリン依存性キナーゼインヒビター p57 及び前立腺癌組織内で高発現していた核内受容体 PPAR γ は前立腺癌のホルモン耐性機構、前立腺癌の増殖抑制に影響を与える重要な因子と考えられた。

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_r Nagata Daisuke, Hashimoto Yoshihiro, Nakanishi Makoto, Naruyama Hiromichi, Okada Shinsuke, Ando Ryosuke, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ and growth inhibition by its ligands in prostate cancer. Cancer Detection and Prevention, 32:259-266, 2008 (査読有)

[学会発表] (計5件)

- ①_r 戸澤 啓一、橋本 良博、梅本 幸裕、永田 大介、秋田 英俊、伊藤 恭典、安井 孝周、芝本 雄太、郡 健二郎：限局性前立腺癌に対する治療選択－腹腔鏡下前立腺全摘除術 vs 強度変調放射線治療 (IMRT)－。第23回日本 Endourology・ESWL 学会総会、2009.11.11-13、東京都
- ②_r 戸澤 啓一、梅本 幸裕、橋本 良博、郡 健二郎、河合 憲康、永田 大介、秋田 英俊、安井 孝周、伊藤 恭典：腹腔鏡下前立腺全摘除術後の再発予測因子の検討。第59回日本泌尿器科学会中部総会、2009.10.29-31、金沢市
- ③_r 戸澤 啓一、橋本 良博、河合 憲康、永田 大介、秋田 英俊、岡村 武彦、安藤 亮介、芝本 雄太、郡 健二郎：限局性前立腺癌の治療選択－腹腔鏡下前立腺全摘除術 vs IMRT－。第47回日本癌治療学会学術集会、2009.10.22-24、横浜市
- ④_r 戸澤 啓一、橋本 良博、梅本 幸裕、永田 大介、秋田 英俊、伊藤 恭典、

安井 孝周、馬場二三八、芝本 雄太、郡 健二郎：限局性前立腺癌に対する治療成績－腹腔鏡下前立腺全摘除術 vs 強度変調放射線治療 (IMRT)。第21回日本内分泌外科学会総会、2009.5.29-30、岡山市

- ⑤_r 戸澤 啓一、橋本 良博、安藤 亮介、池上 要介、永田 大介、秋田 英俊、林 祐太郎、馬場二三八、芝本 雄太、郡 健二郎：限局性前立腺癌に対する治療成績－腹腔鏡下前立腺全摘除術 vs 強度変調放射線治療 (IMRT)。第97回日本泌尿器科学会総会、2009.4.16-19、岡山市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 大介 (NAGATA DAISUKE)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：20336689