

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 15日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590372

研究課題名（和文）ホルモン抵抗性前立腺癌の抵抗性獲得に至る遺伝子発現産物の解析と診断治療への応用

研究課題名（英文）The analysis of the specific gene expression for castration-resistant prostate cancer in relation to the diagnostic and therapeutic application

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（和文）：cDNA マイクロアレイ解析法にてホルモン抵抗性前立腺癌で特異的に発現している癌関連遺伝子の同定を試みた。その結果癌関連遺伝子産物としてRAM (SNRPE) 及びKURO3 (SHISA2)を同定し、それらを抗原として抗体を作製した。同定し得た両遺伝子とも、ヒト前立腺癌細胞株にて過剰発現させると細胞増殖が亢進し、siRNAによるノックダウン効果の判定では細胞増殖が抑制された。さらに免疫組織化学的な前立腺癌症例における発現は、ホルモン抵抗性前立腺癌においてGleason scoreが高い症例に高発現を示す結果となった。

研究成果の概要（英文）：I analyzed the gene expression profiles of castration-resistant prostate cancers (CRPCs) using cDNA microarrays combined with laser microbeam microdissection and found *SNRPE* and *SHISA2*, as overexpressed genes in CRPCs. Semi-quantitative RT-PCR confirmed that *SNRPE* and *SHISA2* were overexpressed CRPCs. Knockdown of *SNRPE* or *SHISA2* expression by short interfering RNA resulted in the marked suppression of PC cell proliferation. By contrast, *SNRPE* or *SHISA2* overexpression promoted PC cell proliferation. These findings suggest that *SNRPE* and *SHISA2* are essential for the cell proliferation and progression of CRPC and that they could be potential diagnosis biomarkers for the patient's prognosis and a molecular target for cancer drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：前立腺癌・ホルモン療法・遺伝子解析・病理診断・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尿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

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、ホルモン抵抗性前立腺癌の組織切片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、ホルモン抵抗性前立腺癌において、その発症から依存性獲得に至るまでの多段階において、特異的に発現している癌関連遺伝子を同定し、抵抗性癌の腫瘍動態を明らかにする。そして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た抗体を作製し、免疫組織化学的に依存性癌から抵抗性癌へ移行するか否か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、ホルモン抵抗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

ホルモン抵抗性前立腺癌の症例を中心にして、マイクロディセクション法で前立腺癌の各腫瘍組織材料切片より正常部、PIN病変部、腫瘍部の目的細胞を採取し、cDNA マイクロアレイ解析を行い、それぞれの部位に特異的かつ独立した、あるいは重複した癌関連遺伝子発現を検討し、ホルモン抵抗性前立腺癌での、癌化の初期段階から抵抗性獲得に至るまでの多段階変化を遺伝子レベルで解析する。さらにそれぞれの段階での病変特異的な遺伝子発現産物に対して抗体を作製し、前立腺生検材料を基に、早期の段階、すなわちPIN病変あるいはホルモン依存性の段

階で、その症例がホルモン抵抗性前立腺に移行するか否かを検討する。さらにこれら作製された抗体を用いて、その遺伝子産物の機能解析を試み、分子標的治療にも応用可能であるか否かを検討する。

4. 研究成果

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の道程を試みた。cDNAマイクロアレイ解析に関しては、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Array Vision ソフトウェアを用いて解析を行った。その結果ホルモン非依存性前立腺癌における癌関連遺伝子産物としてRAM (SNRPE) 及びKURO3 (SHISA2)を同定し、その癌関連遺伝子産物を抗原として抗体を作製した。今回同定し得た両遺伝子とも、ヒト前立腺癌細胞株にて過剰発現させると、それら細胞増殖が亢進し、それぞれの遺伝子に対応するsiRNAによるノックダウン効果を判定したところ、用いた前立腺癌細胞株にて細胞増殖が抑制された。さらに作製した抗体を用いて免疫組織化学的に前立腺癌症例における発現を検討したところ、その発現は正常前立腺組織では減弱しているが、癌組織では、症例により程度の差がみとめられるものの過剰発現がみられ、特にホルモン非依存性前立腺癌症例、およびホルモン依存性前立腺癌においてはGleason scoreが高い症例に高発現を示す結果となったが、Gleason scoreが低い症例との間には有意差は認めなかった。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病変自体の組織学的同定が困難であり、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11件)

- ① Morita T, Kakinuma Y, Kurabayashi A, Fujieda M, Sato T, Shuin T, Furihata M, Wakiguchi H : Conditional VHL gene deletion activates a local NO-VEGF axis in a balanced manner reinforcing resistance to endothelium-targeted glomerulonephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 査読有, 26:4023-4031, 2011
- ② Satake H, Tamura K, Furihata M, Anchi T, Sakoda H, Kawada C, Iiyama T, Ashida S, Shuin T : The ubiquitin-like

- molecule interferon-stimulated gene 15 is overexpressed in human prostate cancer.
- Oncol Rep.*** 査読有, 23(1):11-16, 2010
- ③ Uemura M, Honma S, Chung S, Takata R, Furihata M, Nishimura K, Nonomura N, Nasu Y, Miki T, Shuin T, Fujioka T, Okuyama A, Nakamura Y, Nakagawa H : 5alphaDH-DOC(5alpha-dihydro-deoxyco rticosterone) activates androgen receptor in castration-resistant prostate cancer. ***Cancer Sci.*** 査読有, 101(8):1897-1904, 2010
- ④ Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Furihata M, Yokoyama A : AZ960, a novel Jak2 inhibitor, induces growth arrest and apoptosis in adult T-cell leukemia cells. ***Mol Cancer Ther.*** 査読有, 9(12):3386-3395, 2010
- ⑤ Ikezoe T, Takeuchi T, Yang J, Adachi Y, Nishioka C, Furihata M, Koeffler HP, Yokoyama A : Analysis of Aurora B kinase in non-Hodgkin lymphoma. ***Laboratory Investigation*** 査読有, 89(12):1364-1373, 2009
- ⑥ Takahashi M, Miyazaki H, Furihata M, Sakai H, Konakahara T, Watanabe M, Okada T : Chemokine CCL2/MCP-1 negatively regulates metastasis in a highly bone marrow-metastatic mouse breast cancer model. ***Clin Exp Metastasis.*** 査読有, 26(7):817-828, 2009
- ⑦ Adachi Y, Takeuchi T, Nagayama T, Ohtsuki Y, Furihata M : Zeb1-mediated T-cadherin repression increases the invasive potential of gallbladder cancer. ***FEBS Lett.*** 査読有, 22;583(2):430-436, 2009
- ⑧ Chung S, Furihata M, Tamura K, Uemura M, Daigo Y, Nasu Y, Miki T, Shuin T, Fujioka T, Nakamura Y, Nakagawa H : Overexpressing PKIB in prostate cancer promotes its aggressiveness by linking between PKA and Akt pathways. ***Oncogene*** 査読有, 28(32):2849-2859, 2009
- ⑨ Tamura K, Furihata M, Chung SY, Uemura M, Yoshioka H, Iiyama T, Ashida S, Nasu Y, Fujioka T, Shuin T, Nakamura Y, Nakagawa H : Stanniocalcin 2 overexpression in castration - resistant prostate cancer and aggressive prostate cancer. ***Cancer Sci.*** 査読有, 100(5):914-919, 2009
- ⑩ Chung S, Tamura K, Furihata M, Uemura M, Daigo Y, Nasu Y, Miki T, Shuin T, Fujioka T, Nakamura Y, Nakagawa H : Overexpression of the potential kinase serine/ threonine/tyrosine kinase 1 (STYK 1) in castration-resistant prostate cancer. ***Cancer Sci.*** 査読有, 100(11):2109-2114, 2009
- ⑪ Tamura K, Makino A, Hullin-Matsuda F, Kobayashi T, Furihata M, Chung S, Ashida S, Miki T, Fujioka T, Shuin T, Nakamura Y, Nakagawa H : Novel lipogenic enzyme ELOVL7 is involved in prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism. ***Cancer Res.*** 査読有, 69(20):8133-8140, 2009
- [学会発表] (計7件)
- ① 田村賢司, 庵地孝嗣, 降幡睦夫, 佐竹宏文, 蘆田真吾, 山崎一郎, 井上啓史, 執印太郎: 前立腺癌細胞で高発現する KURO3 遺伝子の同定, 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月4日, 名古屋
- ② 庵地孝嗣, 田村賢司, 降幡睦夫, 佐竹宏文, 蘆田真吾, 山崎一郎, 井上啓史, 執印太郎: 前立腺癌細胞で高発現する RAM 遺伝子の同定, 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月4日, 名古屋
- ③ 庵地孝嗣, 田村賢司, 降幡睦夫, 佐竹宏文, 山崎一郎, 執印太郎: 前立腺癌細胞で高発現する RAM 遺伝子の同定, 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月24日, 大阪
- ④ 田村賢司, 降幡睦夫, 庵地孝嗣, 佐竹宏文, 山崎一郎, 執印太郎: 前立腺癌で高発現する KURO3 の同定と機能解析, 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月24日, 大阪
- ⑤ 竹内 保, 降幡睦夫: Adiponectin 類似分子 C1qTNF6 の肝癌血管新生作用, 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月2日, 横浜
- ⑥ 庵地孝嗣, 田村賢司, 降幡睦夫, 佐竹宏文, 執印太郎: 前立腺癌細胞で高発現する RAM 遺伝子の同定, 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月2日, 横浜
- ⑦ 酒井弘文, 高橋宗久, 降幡睦夫, 小中原猛雄, 岡田知子: マウス乳癌骨髄高転移モデルにおける単球走化性因子

CCL2 の役割, 第 68 回日本癌学会学術総
会, 2009 年 10 月 3 日, 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) 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