

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 年～2010 年

課題番号：21791523

研究課題名(和文) ホルモン抵抗性前立腺癌の進展の機序

研究課題名(英文) The mechanism about the progression of hormone refractory prostate cancer.

研究代表者

玉田 聡 (TAMADA SATOSHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20382179

研究成果の概要(和文)：前立腺癌のホルモン抵抗性への進展機序に対しては未だ解明されていないことが多い。我々は新規蛋白 ERas を発見し、この新規 Ras 蛋白は恒常的に活性化していることを突き止めた。このことから ERas は癌の無限の増殖能力に関わるばかりでなく、前立腺癌においてはホルモン抵抗性への進展機序にこの ERas が関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is not clearly elucidate about the progression of hormone refractory prostate cancer. We discovered the newly protein, so called ERas and this protein is constitutive active. The newly discovered protein, so called ERas, not only the proliferative capacity about the cancer, but also plays a key role in the progression of hormone refractory prostate cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年	300,000	90,000	390,000
2010 年	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
年度			
総計	500,000	15,000	650,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科

キーワード：前立腺癌, ホルモン抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌も年々増加しており、その治療は手術、放射線、ホルモン療法など多岐にわたる。前立腺癌は血清中の前立腺特異抗原 prostate specific antigen(PSA)の発現と強く関連しており、PSA 測定により早期より発見できるようになった。しかし前立腺癌は無症状であることが多く未だに進行癌で発見される場合も少なくない。進行癌となった場合はホルモン療法(男性ホルモンの作用を減弱させる治療)が第一選択で、治療開始当初は、ホルモン療法によりその病勢の進行を遅らせることが可能である。しかし、ホルモン

療法には限界があり、次第にその効果は消失する。一度ホルモン抵抗性になると、その後の治療には未だに有益な薬物などは存在せず、前立腺癌を扱う我々にとっては、そのメカニズムを解明し治療に役立てることが不可避の課題である。

前立腺癌のアンドロゲン非依存性の獲得に関しては多くの研究がなされているが、いずれもメカニズムの一端は担っている可能性はあるものの、その発症機序には複数の要素が関わっていると推察され、未だ現実的な解明、治療には至っていない。その中でもある種のシグナル伝達が、アンドロゲン非依存

性に活性化していることは想像に難くないが、どのようなシグナル伝達が関与しているかは判然としていない。

本研究が明らかにしようとしている新規 Ras 蛋白によるシグナル伝達経路は未だ世界中において検討されていない、全く独創的な研究である。私はこの新規蛋白 ERas が前立腺癌の発育のみならず、ホルモン抵抗性の獲得に関与していると考えている。本研究により今までに考えられているホルモン抵抗性のメカニズムの解明に新たな知見を加えるのみならず、画期的な治療法の開発に結びつく可能性があると考えている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、前立腺癌の発育に新規のシグナル伝達が関与すること、また前立腺癌の治療において最も困難な状況を生み出すホルモン抵抗性のメカニズムを解明することを目的とする。

まず、前立腺癌細胞の発育に ERas が関与していることをその遺伝子を欠失させるなどして検討する。次に、前立腺癌細胞をホルモン依存性、ホルモン抵抗性においてそれぞれにおける ERas の役割を検討する。

前立腺癌は男性ホルモンの作用により発育する。よって男性ホルモンの作用を減弱することによりその発育は一時的に停止する。しかし次第にホルモン抵抗性を獲得し、男性ホルモんに依存しない発育様式を呈するようになる。ひとたびホルモン抵抗性を獲得するとその後の治療は困難であるのが現状である。

よってホルモン抵抗性の獲得機序を分子生物学的に検討することは臨床上、急務の課題である。

本研究において、そのメカニズムを担う可能性を秘めた新しいシグナル伝達経路を同定し、動物実験をのみならず、臨床応用可能な形式に発展させる。

本研究では新規蛋白 E-Ras に注目し、それが前立腺癌のホルモン抵抗性に進展する機序にどのように関わっているかを検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

高橋ら (Role of ERas in promoting tumor-like properties in mouse embryonic stem cells. Nature 423, p541-545, 2003) は ES 細胞が多能性に分化する過程で、新規蛋白 ERas が恒常的に活性化していることを報告した。通常 Ras 蛋白はその上流からのシグナル伝達により活性化されるものであるが、この ERas はそれらシグナル伝達とは無関係に常時活性化している。そこで私は、この蛋白は癌細胞の無限の増殖能力と結びつくのではないかとの仮説を立て解析を行っ

た。

これまでに前立腺癌の cell line において ERas が発現しており、正常細胞では発現していないことは検討済みである。そこでまず ERas の関与を確実なものにするために RNA interference の技術を用いて遺伝子をノックダウンする。siRNA を作成し、それを癌細胞にトランスフェクションさせ、細胞の増殖能力に影響が見られることを確認する。siRNA には複数の候補があり、いかなる配列をもつ siRNA が最も効率よくノックダウンするかどうかの検討も今後の研究のために必要となる。通常のトランスフェクションではノックダウンの期間が短いため、増殖能力の差を確認できない可能性があり、また次の段階では in vivo での検討を行うので、より長期的にノックダウンするためにアデノウイルスもしくはレトロウイルスを用いる。具体的には siRNA 発現組み換えアデノウイルスもしくはレトロウイルスを作成しそれを癌細胞に感染させ、持続的にノックダウンさせる方法をとる。

上記で得られた癌細胞を、ヌードマウスに投与し、ノックダウンの有無により癌細胞の発育に影響が見られるかどうかを検討する。

前立腺癌細胞系にはホルモン依存性の系 (LNCap) と非依存性の系 (DU145, PC3) がある。まずそれぞれの細胞に抗アンドロゲン剤を添加し、ERas の発現の変化を検討する。LNCap では ERas の発現に低下がみられ、DU145 や PC3 で ERas の発現に変化がなかった場合、ERas はホルモン治療には影響されない可能性が高くなる。ERas は恒常的に活性化されているシグナル伝達物質であり、このような結果は十分予測される。

もし上記のような結果が観察されれば、先ほどと同様の方法 (「前立腺癌細胞の発育における ERas の関与」の項を参照) で、抗アンドロゲン剤を添加した上で、ノックダウンの細胞の発育の変化を観察する。

次に in vivo の状態で、ERas がホルモンによる影響を受けるかどうか検討するために、ヌードマウスに LNCaP, DU145, PC3 を移植したうえで、抗アンドロゲン剤を服用させる、もしくは除睾術を施行し、低アンドロゲンの状態とし、その後、腫瘍を摘出し、ERas の発現の変化を検討する。

以上のことが確認された場合、実際の臨床標本での ERas の発現を検討する。通常前立腺癌細胞では臨床検体において ERas の発現がみられることは確認済みであるため、更なる段階として、ホルモン抵抗性となった前立腺癌患者から患者の同意のもと前立腺の組織を一部採取 (針生検) し、ERas の発現を確認する。ERas の発現を見る手法としては、RT-PCR 法を用いた遺伝子解析や、western blot 法を用いた蛋白発現解析、また発現部

位の確認のため免疫染色などを行う予定である。Western blot 法や免疫染色を施行するためには ERas の抗体が必要となる。ERas は京都大学の山中伸弥博士が発見した新規蛋白であり抗体は山中研究室から提供して頂いている。

#### 4. 研究成果

上記のような仮説のもとに、まず、前立腺癌細胞において ERas が発現しているかどうかの検討を行った。正常前立腺細胞を培養し蛋白、遺伝子を抽出した。それらを western blot、および RT-PCR で解析したところ ERas は発現していないことが確認された。次に前立腺癌細胞で同様の解析を行った。前立腺癌細胞の cell line での検討では、ホルモン依存性に発育する系である LNCaP やホルモン非依存性に発育する系である PC3 両者共に ERas は強く発現していることが判明した。

さらに他癌腫および該当する正常組織（膀胱癌と正常膀胱粘膜、精巣癌と精巣正常組織、腎癌と腎実質正常組織）でも同様の解析を行い、各々が、正常組織では発現しておらず、癌細胞では発現していることが判明した。

また前立腺癌、膀胱癌、腎癌、精巣癌の手術サンプルから得られた病理組織標本をもとに免疫染色を行った。

免疫染色を行ったところ、前立腺癌では腺癌細胞の細胞質に、腎癌では淡明細胞癌の細胞質に、膀胱癌では癌上皮細胞の細胞質に陽性細胞を認めた。精巣癌の免疫染色ではどの場所が陽性なのかは判然としなかった。

前立腺癌の発育に ERas が関与しているかどうかを確実なものにするために RNA interference の技術を用いて遺伝子のノックダウンを試みた。まず複数の siRNA を作成し、いかなる配列をもつ siRNA が最も効率よくノックダウンできるかどうかを検討し、候補を絞った。それを癌細胞にトランスフェクションさせたのだが、より長期的にノックダウンさせるためにアデノウイルスもしくはレトロウイルスを用いてトランスフェクションを行った。標的配列を検索し、オリゴ DNA を作成、pBAsi ベクターにクローニングを行い、シークエンサーでシークエンスを確認。確認したうえで、再度トランスフェクションを行い、アデノウイルスベクターにサブクローニングを行い、アデノウイルスを調整したうえで感染させ細胞の増殖能力に影響が見られるかどうか確認を行った。まだ安定したノックダウンが得られるところまで行きついていないが、ある程度の効果を確認することができた。以上の結果から前立腺癌の発育には ERas が深く関与していることが推定された。

臨床的には、前立腺全摘で得られた前立腺癌組織において ERas の抗体を用いて免疫染

色したところ、その発現は強く見られ、ERas の発現が前立腺癌の発育に関して何らかの役割を果たしてい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 7 件)

- ① 加藤実, 玉田聡, 田中智章, 川嶋秀紀, 岩井謙仁, 仲谷達也. 排尿筋過反射型収縮不全を認めた間質性膀胱炎. 臨床泌尿器科, 64:2010, 427-430. (査読:有)
- ② 玉田聡, 大町哲史, 伊藤哲二, 川嶋秀紀, 仲谷達也. 肉腫瘍変化を伴った前立腺尿路上皮癌の 1 例. 日泌尿会誌, 101:2010, 698-702. (査読:有)
- ③ 玉田聡. 透析患者の検査結果の読み方、PSA、尿路系、腎と透析, 68:2010, 773-774. (査読:有)
- ④ 二宮典子, 出口隆, 西原千香子, 玉田聡, 川嶋秀紀, 仲谷達也. 小腸転移をきたした腎細胞癌. 臨床泌尿器, 64:2010, 589-592. (査読:有)
- ⑤ 加藤実, 玉田聡, 北本興市郎, 川嶋秀紀, 岩井謙仁, 仲谷達也. 化学療法が著効したペリニ管癌. 臨床泌尿器, 64:2010, 857-860. (査読:有)
- ⑥ Nomura H, Kawashima H, Masaki S, Hosono T, Matsumura K, Tamada S, Tanaka T and Nakatani, T. Effect of selective estrogen receptor modulators on cell proliferation and estrogen receptor activities in normal human prostate stromal and epithelial cells. Prostate Cancer and Prostatic Diseases. 12:2009, 375-381. (査読:有)
- ⑦ 加藤実, 玉田聡, 田中智章, 鞍作克之, 園田哲平, 岩井謙仁, 川嶋秀紀, 仲谷達也. 内分泌療法抵抗性前立腺癌に対するドセタキセル療法の長期成績. 泌尿器外科, 22:2009, 151-155. (査読:有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 玉田聡. ハンドアシスト腹腔鏡下ドナー腎摘出術の臨床的検討. 24 回日本 Endourology・ESWL 学会総会 (京都, 国際会議場, 2010.11.3)
- ② 玉田聡. 転移性腎癌に対する分子標的薬の治療成績. 98 回日本泌尿器科学会総会 (盛岡, 県民情報交流センター, 2010.4.20)
- ③ 玉田聡. ハンドアシスト腹腔鏡下ドナー腎摘出術の臨床的検討. 60 回日本泌尿器科学会中部総会 (名古屋, マリオットホテル, 2010.12.1)

- ④ 玉田聡、転移性腎癌に対するソラフェニブの治療成績. 58回日本泌尿器科学会中部総会（金沢，金沢県民文化会館，2009.10.30）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 聡 (TAMADA SATOSHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20382179

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし