

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890120

研究課題名（和文） 新規樹立前立腺癌 Xenograft を用いた新たな癌進展機構の解明

研究課題名（英文） Research for a novel mechanism of prostate cancer progression using a newly established xenograft model

研究代表者

清水 洋祐 (SHIMIZU YOSUKE)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00542094

研究成果の概要（和文）：ヒト前立腺癌の特徴をそなえた、新規の異種移植片マウスモデルを樹立した。このマウスモデルはアンドロゲンレセプターに H874Y という点突然変異を有していた。この点突然変異を有したアンドロゲンレセプターにおける、各種薬剤の反応性を検討した結果、女性ホルモンであるエストラジオールが強い agonist 作用（受容体を活性化させる作用）を示すことを解明した。

研究成果の概要（英文）：We established a novel xenograft mouse model mimicking a human prostate cancer. Immunohistochemistry showed AR and PSA protein expression in epithelial cells. Sequencing analysis revealed the AR with a point mutation at amino acid 874(H874Y). Promoter assay revealed agonistic effect of estradiol against the AR with a point mutation H874Y.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	980,000	294,000	1,274,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,930,000	579,000	2,509,000

研究分野：前立腺癌

科研費の分科・細目：泌尿器科学 腫瘍学

キーワード：前立腺癌、Xenograft、アンドロゲン受容体変異、ホルモン不応性

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌研究の大きな問題点として、細胞株を用いた治療モデルの構築が非常に困難であることが挙げられる。そこで我々は新たな実験系を確立するためヒト前立腺癌組織をSCID mouseに移植するxenograftの樹立を試みてきており、現在までに2系統のxenograftの樹立に成功した。これらのxenograftを用いて、ホルモン治療抵抗性獲得機序の解明を試みてきた。今回我々はさらに新たなxenograftの樹立に成功した。(図1)

本xenograftもARおよびPSAの発現を認めた。さらに去勢により一旦腫瘍の縮小を認めることよりその増殖はアンドロゲン依存性であることが示唆された。

またARのシークエンスの結果codon874に点変異(H→Y)を有するのみならず、(図2) PSAの発現も他の2系統に比べ著明に高いことがわかった。

2. 研究の目的

新規に樹立したxenograftの解析を行い、前立腺癌の進展や前立腺癌微小環境の解明をめざす。

3. 研究の方法

(1)

ARのcodon874の点変異(H→Y)による各種ホルモン療法に対する反応性の検討：野生型ARに対してantagonistとして作用する抗アンドロゲン剤のフルタミドが、codon874の点変異(H→Y)を有するARに対しては、agonistとして作用するというも過去の報告が散見される。このことを、PSAプロモーターを用いたレポーターアッセイにより確認する。また、マウスに直接各種薬剤を投与することにより腫瘍サイズを測定しin vivoでの各種薬剤に対する反応性を検討する予定である。

(2)

本xenograftにおける前立腺癌微小環境の解明：今回樹立したxenograftは以前我々が樹立した2株と病理学的所見が大きく異なる。以前の2株では腫瘍のほとんどを上皮成分（前立腺癌）が占めるのに対し、本xenograftでは、間質細胞に裏付けされ乳頭状に増殖する上皮細胞を認める。レーザーマイクロダイセクション法を用いて間質成分のDNAを採取し、間質成分の由来がヒトであるかマウスであるかを検証するためにヒト特異的βアクチンなどを調べる。去勢前の組織と去勢後1日目、3日目、7日目、14日目、30日目の組織を採取し、その形態の変化をHE染色で観察する。さらに去勢後14日目に再度テストステロンペレットをマウスの皮下に投与し、再増殖した際の、形態も確認する。また去勢前後の各腫瘍の間質成分よりmRNAを採取し、増殖因子関連遺伝子のPCRarrayを用いて上皮成分の増殖を刺激するような分子の中で差があるものの同定を試みる。同定した分子は免疫染色にて組織での発現を確認する。その分子の同定は前立腺癌の増殖に関与し新規治療薬の開発の一助となる可能性が示唆される。

(3)

細胞株の樹立：現在はxenograftをSCID mouseに移植し継代し続ける必要があり、ウイルスの感染などにより貴重なxenograftが失われる危険が常に存在する。一方、一旦細胞株の樹立に成功すればそのような危険から回避できるのみならず、in vitroでの実験も可能となり継代の手間も省ける。

4. 研究成果

我々は現在までに2系統のxenograftの樹立に成功しそれぞれの系におけるホルモン不応性増殖能獲得機構についての解析・報告を行ってきた。

(1)

今回新たに樹立に成功した3番目のxenograftはヒト前立腺癌の特徴（アンドロゲン依存性、AR・PSAの発現）をしめし、ARのシークエンスの結果codon874に点変異(H→Y)を有し、またPSAの発現も他の2系統に比べ著明に高いことがわかっている。

(図3)

過去の報告では、野生型ARに対してantagonistとして作用する抗アンドロゲン剤のフルタミドが、codon874の点変異(H→Y)を有するARに対しては、agonistとして作用するというものが散見される。しかし、我々の行ったレポーターアッセイの結果では、フルタミドはagonist作用を示さず(図4)、女性ホルモンであるエストラジオールが強いagonist作用を示していた。今後細胞株を変更し再度検討する予定である。また、マウスに直接各種薬剤を投与することにより腫瘍サイズを測定しin vivoでの各種薬剤に対する反応性を検討する予定である。

(2)

本xenograftでは病理学的所見において、間質細胞に裏付けされ乳頭状に増殖する上皮細胞を認める。(図5)

本xenograftの著明なPSA上昇と関係している可能性があり、上皮間質相互作用に関してもレーザーマイクロダイセクション法などを用いて検討を行っていく予定である。間質成分の由来については、レーザーマイクロダイセクション法を用いて間質成分のDNAを採取し、間質成分の由来がヒトであるかマウスであるかを検証するためにヒト特異的βアクチンの発現をRT-PCR法にて調べた結果、マウス由来であることがわかった。

(図6)

(3)

細胞株の樹立に関しては、腫瘍を摘出する際に試みてはいるが、生着はするものの増殖が遅く、樹立には至っていない。アンドロゲン非依存性増殖能を獲得したと考えられるものは去勢後6カ月を経過した時点で10匹中1匹のみであり、(図7)

現在のところcDNA microarrayによるアンドロゲン非依存性増殖能獲得に関与する分子の同定は困難な状況である。

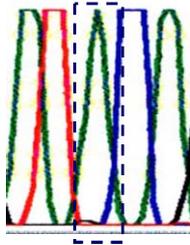
(図1) 新規xenograft



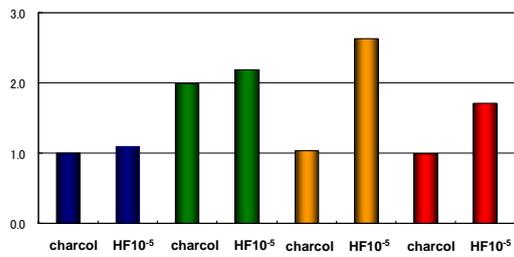
(図2) 新規xenograft におけるARのシーケンスの結果

野生型 AR **A T G C A**

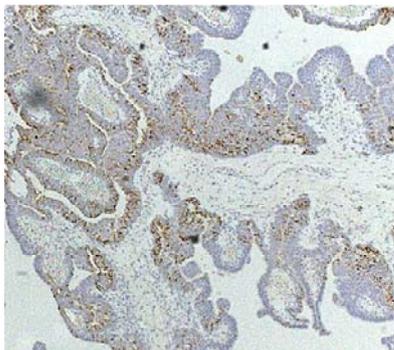
変異型 AR **A T A C A**



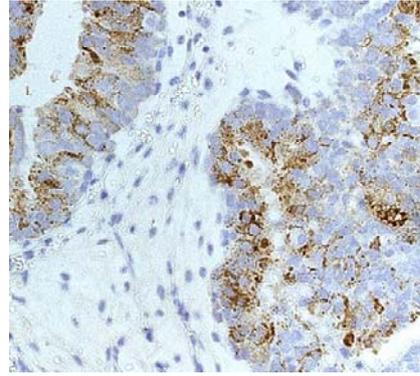
(図3) Flutamide に対する野生型および変異型 AR の転写活性
細胞株 HEK293



(図4) 新規 xenograft の病理像



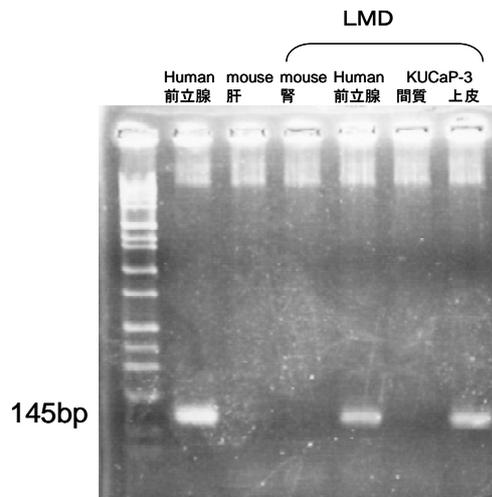
(×50)



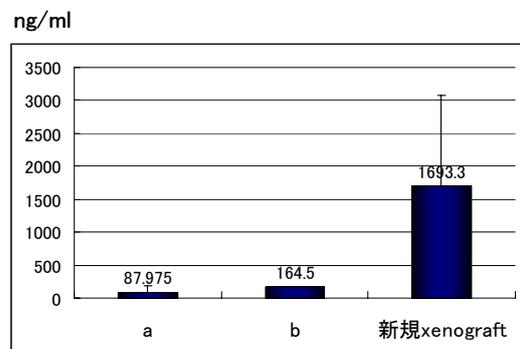
(×200)

(図5) PCR の結果

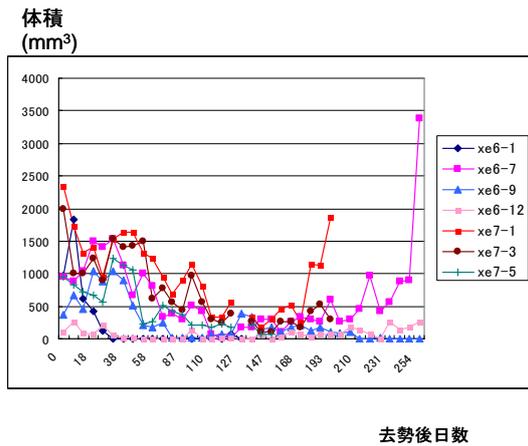
primer:
human-specific , myoglobin gene



(図6) xenograft における PSA の発現



(図7) 去勢後の体積変化



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2件)

① Shimizu Y, Hamazaki Y, Hattori M, Ogawa O, Minato N, Nakamura E. SPA-1 controls the invasion and metastasis of human prostate cancer. Cancer Sci. in press. peer review

② Kobayashi T, Inoue T, Shimizu Y, Ogawa O, Nakamura E. (2010) Activation of Rac1 Is Closely Related to Androgen-Independent Cell Proliferation of Prostate Cancer Cells Both in Vitro and in Vivo. Mol Endocrinol 24 722-34, 2010 peer review

[学会発表] (計3件)

① 第69回日本癌学会学術総会

2010年9月22日～24日 大阪

嚢胞状腫瘍形成する新規前立腺癌異種移植片モデル

小堀豪、井上貴博、岡田能幸、前野淳、寺田直樹、清水洋祐、神波大己、小川修

② 第48回日本癌治療学会

2010年10月28日～30日 京都

ヒト前立腺癌における Rap1 Gap SPA-1 を介した転移機序の解明

清水洋祐

③ 第69回日本癌学会学術総会

2010年9月22日～24日 大阪

去勢抵抗性前立腺癌の治療標的探索のための新規 xenograft における microRNA 発現解析

前野淳、岡田能幸、小堀豪、寺田直樹、清水洋祐、井上貴博、神波大己、小川修

[その他]

ホームページ等

<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 洋祐 (SHIMIZU YOSUKE)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：00542094