

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29日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791500

研究課題名（和文）新規日本人由来前立腺癌細胞株を用いたホルモン抵抗性獲得機序の解明

研究課題名（英文）Mechanism of acquisition of hormone independency of prostate cancer xenograft model established from Japanese patient.

研究代表者

木村 高弘 (KIMURA TAKAHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00307430

研究成果の概要（和文）：

本研究は新規樹立した日本人前立腺癌細胞株 JDCaP を用い、その分子細胞学的性格の解析とホルモン抵抗性獲得の機序の解明を目的とした。JDCaP の由来となった患者組織と JDCaP での分子学的性格を比較し、その類似性が示された。また、ホルモン抵抗性株の樹立に成功し、その分子学的解析を行った。ホルモン抵抗性株では、AR, PSA, PTEN, ERG の発現はすべて陰性であり、分子学的性格の変化が示された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of the study is to elucidate the molecular characteristics of the novel prostate cancer xenograft model from Japanese patient, JDCaP and to establish and analyze the hormone independent subline. Molecular character between JDCaP and cancerous tissue of the patient was revealed similar. The change of molecular character of hormone independent subline was indicated by the analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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，動物モデル，ホルモン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

アジア人における前立腺癌の罹患率，死亡率は近年上昇している．また，前立腺癌の遺伝学的背景や分子生物学的特徴は人種間で異なっていることが報告されている．しかし，これまで多くの前立腺癌に対する基礎研究は欧米諸国，特に白人，黒人を対象としており，アジア人に発生する前立腺癌の分子生物学的特徴は十分に解明されていない．これまでの研究で，日本人ホルモン抵抗性前立腺癌患者の皮膚転移より新規前立腺癌細胞株 (JDCaP) を樹立し，その生物学的特徴を報告した (Kimura T, et al. *Prostate*. 2009;69:1660)．JDCaP はホルモン抵抗性前立腺癌患者から樹立されたにもかかわらず野生型アンドロゲン受容体 (AR) を発現し，ホルモン依存性の増殖を示した．また，JDCaP は前立腺癌の特異的な遺伝子学的特徴である PCA3 mRNA の高発現と TMPRSS2-ERG 相互転座が確認された．以上より JDCaP はアジア人由来の前立腺癌モデルであるとともに，前立腺癌に特徴的な分子生物学的性格を保持する貴重なモデルであると考えられた．また，TMPRSS2-ERG 遺伝子癒合は前立腺癌において，最も頻度の高い遺伝子変異であるとともに，ホルモン抵抗性獲得機序との関連性も示唆されている．よって，JDCaP は TMPRSS2-ERG 癒合遺伝子に関連するホルモン抵抗性獲得機序の解明に有用なモデルであると考えられた．

2. 研究の目的

本研究は新規樹立した日本人由来前立腺癌細胞株 JDCaP を用い，ホルモン抵抗性獲得の機序を解明することを目的とする．

本モデルはホルモン抵抗性前立腺癌患者から樹立されたにもかかわらず野生型 AR を発現し，ホルモン依存性を示すことが極めて特徴的である．その機序に関する仮説として，前立腺癌の多様性から患者より摘出した組織をアンドロゲンが豊富な環境下で長期培養することによりホルモン感受性株が選択された可能性が考えられる．この仮説を証明するため，患者診断時の前立腺生検組織，抵抗性獲得後の皮膚転移摘除組織の遺伝子およびタンパク発現解析を行う．さらに，本モデルのホルモン抵抗性獲得に重要な因子を検討するために，JDCaP および同腫瘍移植マウスの去勢術後の長期観察を行い JDCaP ホルモン抵抗性株のタンパク発現を樹立し，同株の分子細胞学的変化の解析を行う．

3. 研究の方法

① 患者検体と JDCaP の遺伝子，タンパク発現の比較

JDCaP の由来となった患者の診断時の前立腺生検組織およびホルモン抵抗性獲得後の皮膚転移摘除組織の遺伝子解析，タンパク発現解析を行い，その結果を JDCaP と比較することで，ホルモン抵抗性癌患者からホルモン依存性細胞株が樹立された原因を検討した．

1) AR および TMPRSS2-ERG fusion 遺伝子解析

前立腺針生検および皮膚腫瘍のパラフィン切片よりマイクロダイセクト法を用いて癌部を切除し，DNA を抽出した．抽出した genomic DNA の AR の遺伝子配列解析を行い，遺伝子変異の有無を検討した．また，reverse-transcription PCR 法を用いて，TMPRSS2-ERG, TMPRSS2-ETV1, TMPRSS2-ETV4, TMPRSS2-ETV5 の癒合遺伝子の有無を検討した．TMPRSS2-ERG fusion の解析は，FISH 解析にて行った．

2) PCA3 発現解析

1)と同様の方法で癌部から total RNA を抽出し，リアルタイム PCR 法で PCA3 発現強度を解析した．

3) タンパク発現解析

前立腺針生検および皮膚腫瘍のパラフィン切片を用い，免疫組織染色法で PSA, AR, ERG, PTEN, リン酸化 AKT (pAKT) の発現を解析した．

② ホルモン抵抗性株の分子細胞学的変化の解析

1) ホルモン抵抗性株の樹立

JDCaP ホルモン抵抗性株を樹立するために，マウス皮下に JDCaP を移植し，生着後，外科的去勢術を行った．腫瘍は縮小後に痕跡状の皮下腫瘍となったが，半年後再増殖を認めた．計 20 匹の JDCaP 皮下移植マウスを去勢し，2 系統のホルモン抵抗性株を認めた．これらの腫瘍それぞれを雌マウス，雄マウス皮下へ移植し，雄マウスは皮下腫瘍を触知後，外科的去勢術を行い，腫瘍の再増殖を観察した．雌マウスは無処置のまま腫瘍の増殖を観察した．それぞれの腫瘍は一定期間の後に増殖を認めたため，同様の方法で継代を繰り返し，最終的に 2 系統の安定系を樹立した．これらの樹立したホルモン抵抗性株を JDCaP-hr1, JDCaP-hr2 とし，以後の解析を行った．

2) ホルモン抵抗性株の解析

本解析には樹立したホルモン抵抗性株のなかで，生着率の高い JDCaP-hr1 を用いた．親株である JDCaP の分子学的プロファイルが温存されているかを解明するために，AR, PSA, PTEN, ERG, pAKT, c-Myc, p53 の

発現を免疫組織染色で解析した。また、RNA抽出を行い、リアルタイム PCR 法にて PCA3 の発現解析を行った。さらに TMPRSS2-ERG fusion の解析は、FISH 解析にて行った。

4. 研究成果

① 患者検体と JDCaP の遺伝子、タンパク発現の比較

1) AR および TMPRSS2-ERG fusion 遺伝子解析

患者検体では未治療時前立腺針生検、ホルモン抵抗性皮膚腫瘍ともに AR 遺伝子変異を認めなかった。この結果はホルモン抵抗性前立腺癌患者の転移巣から樹立した JDCaP がホルモン依存性を示す理由として、患者におけるホルモン抵抗性獲得機序が AR 遺伝子変異によるものではないことが示唆された。また、患者検体の FISH 解析では、前立腺生検検体では TMPRSS2-ERG fusion (deletion type) を認めた (図 1) のに対し、皮膚腫瘍では TMPRSS2-ERG fusion 陽性細胞と陰性細胞の混在を認めた。reverse-transcription PCR 法では TMPRSS2-ETV1, TMPRSS2-ETV4, TMPRSS2-ETV5 の癒合遺伝子を認めなかった。

2) PCA3 発現解析

リアルタイム PCR 法による解析で患者検体 (前立腺生検, 皮膚腫瘍) においても PCA3

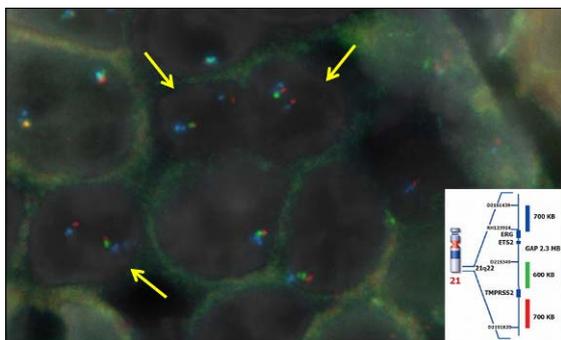


図1 前立腺生検検体のFISH解析
TMPRSS2-ERG fusion (deletion)を認めた。

が強く発現していることを確認した。この結果も、JDCaP 細胞における結果と一致した。

3) タンパク発現解析

前立腺針生検および皮膚腫瘍のパラフィン切片を用い、免疫組織染色法で PSA, AR, ERG, PTEN の発現を解析した。前立腺生検検体では、PSA 陽性, AR 陽性, ERG 陽性, PTEN 陰性, pAKT 陽性であり、この発現プロファイルは JDCaP の発現プロファイルと同様であった。一方で、ホルモン抵抗性皮膚腫瘍に関しては、PSA, AR, ERG, pAKT

は陽性細胞と陰性細胞が混在しているのに対し、PTEN は陰性～弱陽性であった (図 2)。

② ホルモン抵抗性株の分子細胞学的変化の解析

1) ホルモン抵抗性株の樹立

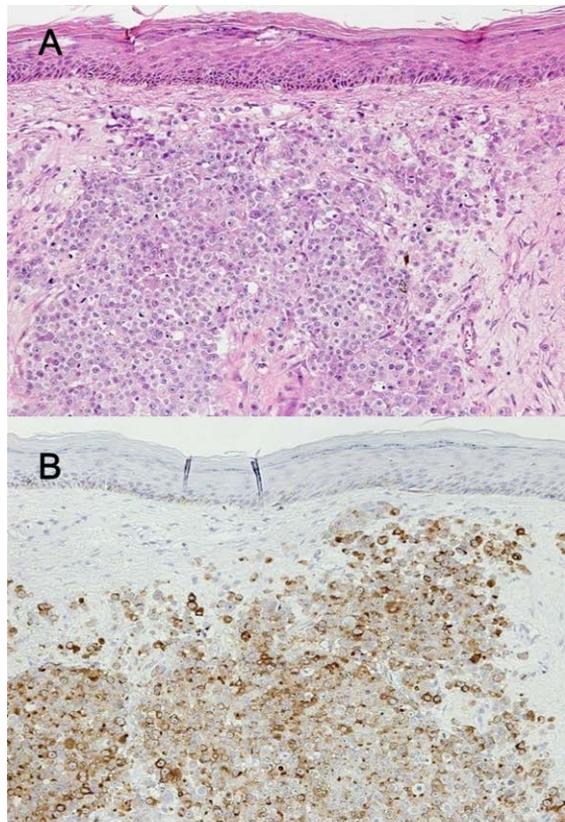


図2 ホルモン抵抗性皮膚腫瘍 (患者検体)
A H&E染色
B PSA免疫染色. 陽性細胞と陰性細胞が混在している。

方法②-1)に示した方法で安定系のホルモン抵抗性 JDCaP subline (JDCaP-hr1, JDCaP-hr2)を樹立した。これらの細胞は3代以上継代することで、70%以上の生着率を示すようになった。また、最終的には雌マウスでの移植系の法が安定していたため、現在は雌マウスで実験系を行っている。これらの subline を、雌マウス皮下に移植し、腫瘍正着後に抗男性ホルモン剤 (ビカルタミド) 50mg/kg を4週間連日内服投与によっても、腫瘍の増殖は抑制されないことから、ホルモン抵抗性が確認された。腫瘍の増殖速度は JDCaP-hr1 が JDCaP-hr2 に比べ早く、ホルモン抵抗性獲得機序の違いも示唆されたが、今回は生着率、増殖速度の早い JDCaP-hr1 を対象として、タンパク発現実験を行っている。

2) ホルモン抵抗性株の解析

雌マウス皮下移植後、腫瘍を形成した JDCaP-hr1 を摘出し、PSA, AR, ERG, pAKT,

PTEN, c-Myc, p53 の発現解析を免疫染色法にて行った。コントロールとして雄マウスに移植した JDCaP も同様の解析を行った。JDCaP は PSA 陽性, AR 陽性, ERG 陽性, pAKT 陽性, PTEN 陰性, c-Myc 陽性, p53 陰性であった (図 3)。一方で, JDCaP-hr1 は, PSA 陰性, AR 陰性, ERG 陰性~弱陽性, pAKT 陰性, PTEN 陰性, c-Myc 陰性, p53 陰性であった。

また, リアルタイム PCR 法による PCA3 の発現解析では, JDCaP に比べて PCA3 の発現低下を認めた。

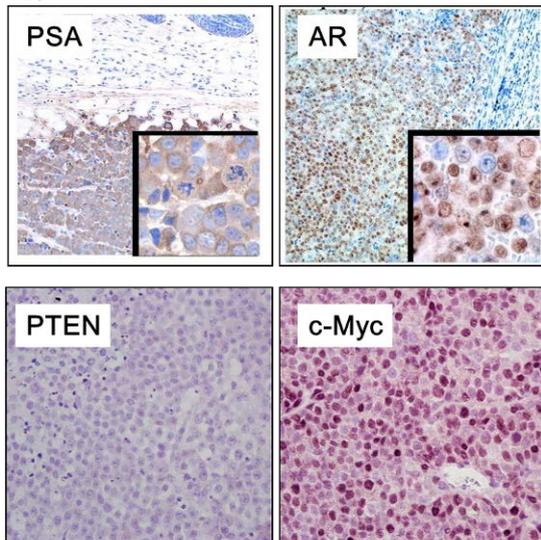


図3 JDCaP 免疫染色
PSA陽性, AR陽性, PTEN陰性, c-Myc陽性

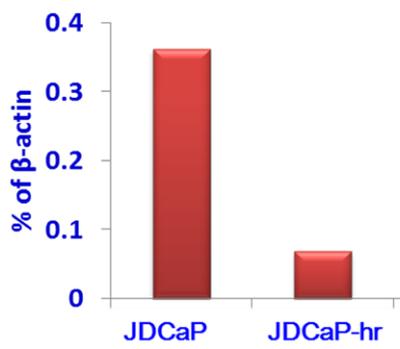


図4 PCA3の発現
リアルタイムPCRにてPCA3の発現を
検討した。JDCaPに比べJDCaP-hrはPCA3の発現が低下していた。

FIS
H 法
による

TMPRSS2-ERG fusion の解析では, JDCaP-hr1 において, TMPRSS2-ERG fusion は認められなかった。

以上の結果より, ホルモン抵抗性前立腺癌である JDCaP-hr1 はホルモン感受性株 JDCaP とタンパク発現プロファイルが大きく異なっていたことが示された。特に, TMPRSS2-ERG fusion の陰性化に関しては, 遺伝子癒合が修復される可能性が低いことより, JDCaP-hr1 のホルモン抵抗性獲得の機序は, アンドロゲン除去環境の中で JDCaP では優性であった TMPRSS2-ERG fusion 陽性の細胞群から fusion 陰性の細胞群に置換された事が示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① 木村 高弘 “Expression of ERG oncoprotein is less frequently and associated with a less aggressive tumor phenotype in Japanese prostate cancer patients” AUA Annual Meeting. 19-23 May 2012 年 5 月 20 日. Atlanta, USA.

② 木村高弘 “日本人前立腺癌における ERG 発現の検討” 第 76 回日本泌尿器科学会東部総会 2011 年 10 月 20 日. 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 高弘 (KIMURA TAKAHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00307430