

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23249073

研究課題名(和文)次世代質量分析による癌個別的ゼノグラフトの双方向的解析からの革新的診断治療シーズ

研究課題名(英文) Innovative diagnosis and treatment seeds from the two-way analysis of xenograft model by the next generation mass spectrometry

研究代表者

小川 修(Ogawa, Osamu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90260611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 27,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は個性ある病態モデルとして患者癌組織由来の泌尿器科癌xenograftを樹立してきた。これらのモデルを用いて、次世代分析装置により、癌の臨床的悪性度や治療抵抗性となりうる分子群を同定してきた。今後、臨床検体用いて検証し、これらの分子のバイオマーカーおよび新規治療標的としての応用の可能性を検討する。

研究成果の概要(英文)：We have established patient-derived tumor tissue(PD TT) xenograft models of urological cancer. Using PD TT xenograft model, we have identified new molecules related with cancer progression and drug resistance by the next generation mass spectrometry. We are planning to evaluate whether these molecules could be biomarker or therapeutic target in clinical setting.

研究分野：泌尿器科癌

キーワード：前立腺癌 腎癌 Xenograft 質量分析 バイオマーカー 新規治療標的

1. 研究開始当初の背景

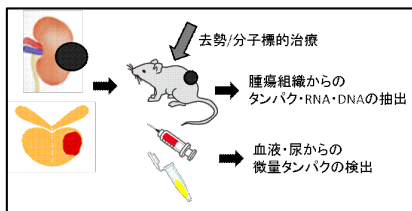
泌尿器科癌は超高齢化社会を迎えた日本において重要な癌腫であるが、個々の患者に対応した治療戦略を立てることが必須である。例えば、進行前立腺癌の多くが去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)となるが、その治療抵抗性の分子機序は個々の患者で異なると考えられる。また腎細胞癌は HIF/VEGF 経路を標的とした分子標的治療が進行腎癌の標準治療であるが、大半の症例で早期に耐性を獲得する。従って、臨床的悪性度や治療感受性、あるいは治療抵抗性を規定するメカニズムを解明し、そこから得られた情報から革新的な治療シーズを開発しない限り、治療成績を向上させることはできない。また、そのような分子は癌の治療反応性や予後を予測する重要な診断シーズとなると思われる。

トランスレーショナル研究は、「ベンチサイドからベッドサイドへ」という言葉に象徴されるように、培養細胞系から出発してメカニズムを解析し、その臨床応用を目指すものが多い。一方もう一つの流れとして、「ベッドサイド」から出発し臨床検体から疾患の原因候補分子を検索する方法がある。我々は個性を維持した患者癌組織に由来する xenograft 双方向性の研究の両立が可能である。これらが革新的な診断・治療シーズの同定を可能にすると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では個性ある病態モデルとして患者癌組織由来 xenograft を樹立し、次世代高感度質量分析装置により xenograft 内及び体液中の各種オーム解析を行い、癌の臨床的悪性度や治療抵抗性のキーとなる分子群を同定する。これと並行してヒト癌組織・血液/尿を用いて臨床的検証を補完し、これらの分子の新規治療標的およびバイオマーカーとしての応用可能性を検討する。(図1)

図1.Xenograft モデルの樹立

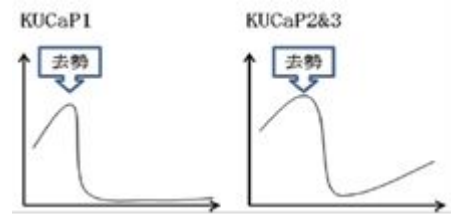


3. 研究の方法

(1)ヒト前立腺癌の臨床経過と類似した前立腺癌去勢抵抗性変異モデル、KUCaP-2,3 の系を用い、治療抵抗性変異獲得時に変化を示す腫瘍組織内分子、移植マウス血液・尿中分子

を質量分析にて網羅的に解析する。(図2) 腎細胞癌においても分子標的薬 (tyrosine kinase inhibitors) 治療抵抗性 xenograft モデルを作成し、同様な手法で治療抵抗性獲得に伴い変化する因子を解析した。

図2.KUCaP1.2.3 の去勢前後腫瘍体積変化

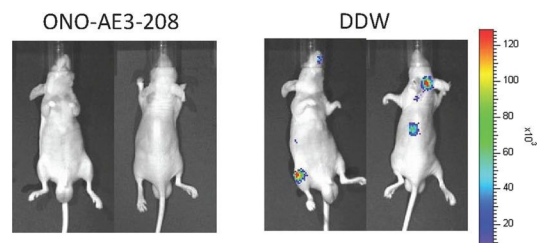


(2)上記変動分子が治療抵抗性の指標(バイオマーカー)あるいは治療標的分子となりうるかを様々な臨床病期の患者由来血液・尿を用いて解析すると同時に、培養細胞系を用いた候補分子の機能解析および PDDT xenograft モデルを用いた治療ターゲットに対する薬物投与実験を行った。

4. 研究成果

(1)KUCaP-2 は野生型アンドロゲン受容体 (AR) を発現し、去勢後縮小するが約2ヶ月後に再増殖する。この臨床前立腺癌に類似した経過を示す xenograft モデルを用いた去勢抵抗性獲得前後の mRNA 網羅的遺伝子発現解析により、去勢抵抗性獲得と EP4 発現亢進の関与を証明し、その拮抗剤投与により去勢抵抗性が克服されうることを報告した。さらに前立腺癌細胞株(LNCaP、PC3)に EP4 を強制発現させると浸潤能、遊走能を促進することを示した。免疫不全マウスを用いた骨転移モデルにおいて、PC3 に ONO-AE3-208(EP4 antagonist)を投与すると骨転移が減少した。(図3)EP4 はCRPC や転移性前立腺癌に対する治療標的になりえることが示唆された。

図3.骨転移モデル(左心移植後20日目) (論文3より引用)



(2)前述の KUCaP2 の mRNA 網羅的遺伝子発現解析によって、miR-582-5p が去勢抵抗性獲得により発現上昇することがわかった。さらに、miR-582-5p はアンドロゲン枯渇環境下の LNCaP を増殖させることを示した。(図4) また miR-582-5p は EFNB2 の発現を減少させることがわかっており、他の機序と合わせて

LNCaP の細胞増殖に関する可能性が考えられた。

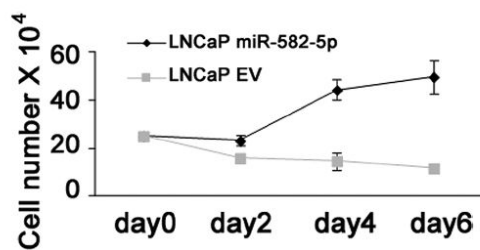


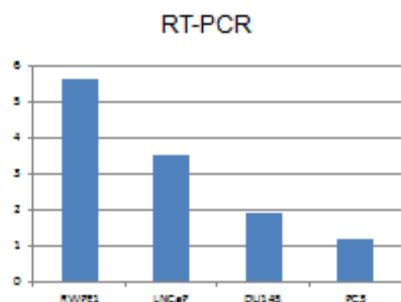
図 4. miR-582-5p による細胞増殖の影響 (論文 1 より引用)

(3) KUCaP3 は前立腺癌 PDDT xenograft であり AR および PSA を発現しているが、さらに下記の特徴を有する。アンドロゲン依存性増殖を示す、アンドロゲン受容体に H874Y の変異を認める、腫瘍は嚢胞を形成し、のう胞内に多量の PSA を分泌するのみならず、移植マウスの血液中に PSA を検出する。今回、嚢胞液および血清を抽出し、質量分析を行ったところ、ヒト由来の蛋白として NPC2 が高濃度に含まれていることがわかった。代表的な前立腺癌細胞株での NPC2 の発現を見ると、RT-PCR と Western blotting において比較的悪性度の低いと考えられている細胞株では発現が高く、悪性度の高い前立腺癌細胞株では発現が低くなっていた。

(図 5) また正常前立腺細胞株とされる RWPE1 は 3D 培養することにより腺管を形成することが知られている。我々は NPC2 を stable knockdown した RWPE1 細胞株を作成した。これを用いて 3D 培養を行うと、NPC2 を knockdown した群において、有意に腺管形成が阻害された。

NPC2 は前立腺の腺管形成に関わる新規分子と考えられるが、今後はバイオマーカーとしての評価を行う予定である。

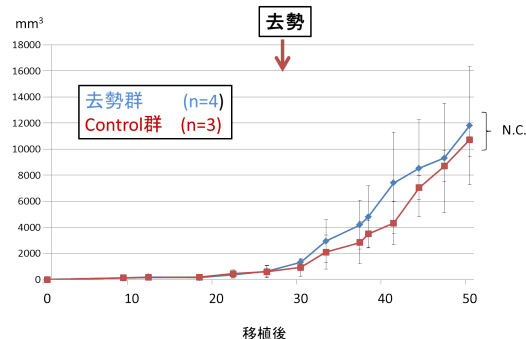
図 5 前立腺癌細胞株での NPC2 の発現



(4) 前立腺小細胞癌の臨床検体から KUCaP4 を新規に樹立した。特徴として、AR 及び PSA を発現しない、去勢しても腫瘍は縮小しない。

(図 6) 神経内分泌マーカーを発現しているなどの特徴がある。今後 primary culture などを行い、新規治療標的の探索などを検討している。

図 6. KUCaP4 の去勢前後腫瘍体積変化



(5) 腎癌臨床検体由来の xenograft モデルとして、KURC-1~4 までがすでに樹立されている。このうち、KURC1 は新生療法であるスニチニブに対し 4 週で耐性となり、KURC2 に関しては約 6 か月間奏功し続けることが確認された。また、KURC1 に関しては、耐性となった xenograft 腫瘍片を再度別のマウスに移植することを繰り返すと、当初は一時奏功後に耐性となっていたものが、5 継代目には完全に耐性となることも確認された。このような、スニチニブに対する感受性が様々に異なる PDDT xenograft が解析可能である。

これらの xenograft を用いて、スニチニブに対する耐性を獲得する KURC-1 の耐性獲得前後および、スニチニブに対する感受性を維持し続ける KURC-2 の網羅的マイクロアレイ解析を行い、スニチニブ耐性に関係する可能性のある分子として IL13RA2 などの候補分子を見出した。ヒト腎癌転移症例において原発巣で免疫組織化学的染色をした結果、原発巣で IL13RA2 の発現が高い症例は転移巣に対してスニチニブを投与しても多くの症例で反応が悪いことが分かった。腎癌細胞株を用いて IL13RA2 を強制発現あるいは発現抑制した上でマウス xenograft を作成し評価したところ、淡明腎細胞癌において IL13RA2 の発現が高いとスニチニブ抵抗性と腫瘍増殖を引き起こすことが分かった。上記 xenograft モデルおよび PDDT xenograft モデルにおいて血管新生やアポトーシスについて免疫組織化学的染色をした結果、IL13RA2 によって引き起こされるスニチニブ抵抗性は血管新生を伴わずにアポトーシスを阻害することで起こることが分かった。以上により、IL13RA2 がスニチニブ抵抗性獲得に関与している可能性があると示唆された。

結語

患者癌組織由来の xenograft モデルを用いて、癌の悪性度及び治療抵抗性のキーとなる分

子群を同定した。今後、臨床検体を用いて新規治療標的あるいはバイオマーカーとしての応用の可能性を検討する。

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 19 件)

1. Up-regulation of miR-582-5p regulates cellular proliferation of prostate cancer cells under androgen-deprived conditions. Maeno, A., Ogawa, O., Inoue, T. Prostate 74,1604-12. 2014

doi: 10.1002/pros.22877.

2. The expression profile of phosphatidylinositol in high spatial resolution imaging mass spectrometry as a potential biomarker for prostate cancer. Goto T, Ogawa O. PLoS One. 2014 Feb 28;9(2):e90242.

doi:10.1371/journal.pone.0090242.

3. An EP4 Antagonist ONO-AE3-208 Suppresses Cell Invasion, Migration, and Metastasis of Prostate Cancer. Xu S, Ogawa O, Cell Biochem Biophys. 70,521-7 2014

doi: 10.1007/s12013-014-9951-2.

4. STAT3 polymorphism can predict the response to interferon-alpha therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. Eto, M., Kamba, T., Ogawa, O Eur Urol 63, 745-752, 2013

doi: 10.1016/j.eururo.2012.09.052.

5. Plasma Low-Molecular-Weight Proteome Profiling Identified Neuropeptide-Y as a Prostate Cancer Biomarker Polypeptide. Ueda, K., Ogawa, O J Proteome Res 12, 4497-4506, 2013

doi: 10.1021/pr400547s.

6. The transcription factor Sp3 regulates the expression of a metastasis-related marker of sarcoma, actin filament-associated protein1-like 1 (AFAP1L1). Kajita, Y., Ogawa, O. PLoS One 8, e49709.

doi: 10.1371/journal.pone.0049709.

7. Experimental evidence of persistent androgen-receptor-dependency in castration-resistant prostate cancer. Kobayashi, T., Inoue, T., Kamba, T., Ogawa, O . Int J Mol Sci 14, 15615-15635, 2013.

doi: 10.3390/ijms140815615.

8. Downregulation of Ral GTPase-activating protein promotes tumor

invasion and metastasis of bladder cancer. Saito, R., Matsui, Y., Ogawa, O . Oncogene 32, 894-902, 2013.

doi: 10.1038/ncr.2012.101.

9. Role of Rev-erbalpha domains for transactivation of the connexin43 promoter with Sp1. Negoro, H., Ogawa, O. FEBS Lett 587, 98-103, 2013.

doi: 10.1016/j.febslet.2012.11.021.

10. Insulin-like growth factor-1 genotypes and haplotypes influence the survival of prostate cancer patients with bone metastasis at initial diagnosis. Tsuchiya, N., Ogawa, O. BMC Cancer 13, 150, 2013.

doi: 10.1186/1471-2407-13-150.

11. Role of mammalian target of rapamycin inhibitor in the treatment of metastatic epithelioid angiomyolipoma: A case report. Kohno, J., Matsui, Y., Kamba, T., Ogawa, O. Int J Urol 20, 938-941, 2013.

doi: 10.1111/iju.12095.

12. Common variants at 11q12, 10q26 and 3p11.2 are associated with prostate cancer susceptibility in Japanese. Akamatsu, S., Inoue, T., Ogawa, O Nat Genet 44, 426-429, S421, 2012

doi: 10.1038/ng.1104

13. Reproducibility, performance, and clinical utility of a genetic risk prediction model for prostate cancer in Japanese. Akamatsu, S., Inoue, T., Ogawa, O PLoS One 7, e46454, 2012

doi: 10.1371/journal.pone.0046454.

14. JunB promotes cell invasion and angiogenesis in VHL-defective renal cell carcinoma. Kanno, T., Kamba, T., Inoue, T., Ogawa, O Oncogene 31,3098-3110, 2012

doi: 10.1038/ncr.2011.475.

15. Tumor microvasculature with endothelial fenestrations in VHL null clear cell renal cell carcinomas as a potent target of anti-angiogenic therapy. Yamasaki, T., Kamba, T., Inoue, T., Ogawa, O. Cancer Sci 103, 2027-2037, 2012

doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02412.

16. IRX4 at 5p15 suppresses prostate cancer growth through the interaction

with vitamin D receptor, conferring prostate cancer susceptibility.
Nguyen, H.H., Ogawa, O Hum Mol Genet 21, 2076-2085, 2012
doi: 10.1093/hmg/dds025.

17. Thioredoxin-interacting protein suppresses bladder carcinogenesis.
Nishizawa, K., Matsui, Y., Ogawa, O Carcinogenesis 32, 1459-1466, 2011
doi: 10.1093/carcin/bgr137.

18. SPA-1 controls the invasion and metastasis of human prostate cancer.
Shimizu, Y., Inoue, T., Kamba, T., Ogawa, O Cancer Sci 102, 828-836, 2011
doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01876.

19. Role of signaling transduction pathways in development of castration-resistant prostate cancer.
Inoue, T., and Ogawa, O. Prostate Cancer 2011, 647987.
doi: 10.1155/2011/647987.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 植垣正幸、小川修ほか「ヒト前立腺小細胞癌由来のゼノグラフトモデルの樹立」
第 73 回日本癌学会学術総会
2014 年 9 月 25 日(神奈川県横浜市)

2. 後藤崇之、小川修ほか「高解像度質量顕微鏡を用いた前立腺癌組織の insitu 脂質プロファイリング」
第 23 回泌尿器科分子細胞研究会
2014 年 3 月(山形県山形市)

3. 後藤崇之、小川修ほか「In situ lipid profiling of prostate cancer tissues using high resolution imaging mass spectrometry」
The 4th Congress of Asian Pacific Prostate Society
2014 年 3 月(沖縄県沖縄市)

4. 後藤崇之、小川修ほか「In situ lipid profiling of prostate cancer tissues using high resolution imaging mass spectrometry」
第 72 回日本癌学会学術総会
2013 年 10 月(神奈川県横浜市)

5. 新垣隆一郎、小川修ほか「腎細胞癌に対する新規治療ターゲットとしての CCL2 の検討」
第 101 回日本泌尿器科学会総会
2013 年 4 月 27 日(北海道札幌市)

6. 柴崎昇、小川修ほか「Primary xenograft を

用いた腎細胞癌スニチニブ耐性獲得機序の解明」

第 101 回日本泌尿器科学会総会
2013 年 4 月 25 日 (北海道札幌市)

7. 吉川武志、小川修ほか「臨床検体由来のマウス異種移植片を用いた、蛋白質質量分析による前立腺癌新規バイオマーカーの同定」
第 101 回日本泌尿器科学会総会、
2013 年 4 月 26 日 (北海道札幌市)

8. 柴崎昇、小川修ほか「Primary xenograft を用いた腎細胞癌スニチニブ抵抗性獲得機序の解明」

第 22 回泌尿器科分子・細胞研究会
2013 年 3 月 9 日(高知県高知市)

9. 新垣隆一郎、小川修ほか「腎細胞癌に対する新規治療ターゲットとしての CCL2 の検討」

第 22 回泌尿器科分子・細胞研究会
2013 年 3 月 9 日 (高知県高知市)

10. 柴崎昇、小川修ほか「An analysis of renal cell carcinoma(RCC) primary xenograft models developing resistance to sunitinib」
IFOM-Kyoto University joint Symposium
2012 年 10 月 26 日(Italy Milan)

11. 柴崎昇、小川修ほか「スニチニブ耐性腎細胞癌 Xenograft モデルの解析」
第 71 回日本癌学会学術総会
2012 年 9 月 21 日 (北海道札幌市)

12. 吉川武志、小川修ほか「臨床検体由来のマウス異種移植片を用いた、蛋白質質量分析による前立腺癌新規バイオマーカーの同定」
第 71 回日本癌学会学術総会
2012 年 9 月 21 日(北海道札幌市)

13. 柴崎昇、小川修ほか「An analysis of renal cell carcinoma(RCC) xenograft models developing resistance to sunitinib」
11th Asian Congress of Urology
2012 年 8 月 22 日 (Thailand Pataya)

14. 柴崎昇、小川修ほか「腎細胞癌のマウス primary xenograft を用いた Sunitinib 抵抗性モデルの樹立」
第 100 回日本泌尿器科学会総会
2012 年 4 月 23 日 (神奈川県横浜市)

15. 柴崎昇、小川修ほか「腎癌における抗血管新生療法抵抗性マウスモデルの樹立」
第 70 回日本癌学会学術総会学術総会
2011 年 10 月 3 日 (愛知県名古屋市)

〔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

小川 修 (OGAWA , Osamu)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号： 9 0 2 6 0 6 1 1

(2)研究分担者

神波 大己 (KANBA , Tomomi)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号： 2 0 4 0 2 8 3 6

井上 貴博 (INOUE , Takahiro)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号： 8 0 5 1 1 8 8 1