

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890230

研究課題名(和文) 治療抵抗性前立腺癌の進展と、がん微小環境応答に着目した新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Castration resistant prostate cancer with drug resistance and tumor microenvironment

研究代表者

小坂 威雄 (Takeo, Kosaka)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30445407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌(Prostate Cancer:PCa)がアンドロゲン依存性を逸脱し、難治性の去勢抵抗性前立腺癌(Castration Resistant Prostate Cancer:CRPC)へ進展する過程は様々な機序が関連し、包括的にその進展を理解し解明することは難しい。本研究では、新規血管新生関連マーカーVASH1とアンドロゲン産生系に着目し解析した。VASH1の発現は予後因子で、真の血管新生を反映していることが示唆され、またCRPCではDHTの産生が5-還元酵素活性の低下を伴って有意に抑制されていることを発見し、進行性前立腺がんにおける微小環境ネットワークの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To reveal tumor microenvironment in Prostate Cancer (PCa), we focused on angiogenesis and androgen production. We examine the expression of VASH1 in PCa specimens. We found VASH1 density represents a clinically relevant predictor of patient prognosis and can be a new biomarker that would provide additional prognostic information in PCa (Kosaka T. et al. Br J Cancer 2013). To ascertain the potential SRD5A activity, we cultured two human CRPC cell lines: C4-2 and C4-2AT6 cells with steroid precursors: 13C-Adione, and analyzed the sequential biosynthesis of 13C-T and 13C-DHT by LC/MS/MS. 13C-DHT concentration in C4-2AT6 cells was significantly lower than C4-2. An increased concentration of DHT did not have a positive effect on cell proliferation. SRD5A inhibitors did not have any inhibitory effect, suggesting CRPC cells may have an unknown regulation system to protect themselves from androgenic suppressive effect mediated by SRD5A activity (Kosaka T. et al. Scientific Rep 2013).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 血管新生 アンドロゲン 去勢抵抗性前立腺癌 微小環境 VASH1 C4-2AT6

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌(Prostate Cancer:PCa)がアンドロゲン依存性を逸脱し、難治性の去勢抵抗性前立腺癌(Castration Resistant Prostate Cancer:CRPC)へ進展する過程には、多様な機序が関連し、包括的にその進展を理解し解明することは難しい。

申請者は、PCa を癌細胞の単一の集団として、がん細胞自身の要因のみに基づく概念では、PCa 進展のプロセスを理解するには不十分であり、がんを形成する血管内皮などの細胞を含む集団と相互作用し、進展に伴って変化するアンドロゲンなどの内分泌を含む微小環境を含むがん組織集団として捉え直すことで、新たな治療戦略を練り直す必要性に迫られていると考えた。

2. 研究の目的

治療抵抗性前立腺癌の進展と、がん微小環境応答に着目した新規治療戦略の確立を目的として、LNCaP、C4-2、C4-2AT6 という悪性度や、アンドロゲンに対する依存度が段階的に異なる細胞株ならびに前立腺全摘除術のヒト臨床検体を用いて、

(1) 進展に伴うがん微小環境の大きな要因のひとつである血管新生関連因子の発現の解析

(2) CRPC の進展に伴って変化するアンドロゲン関連内分泌微小環境の機能解析を施行した。

3. 研究の方法

(1) 当院で限局性前立腺癌と診断され根治的前立腺全摘術が施行された 167 例を対象として、VASH1 および CD34 の免疫染色を行い、各種臨床的パラメータ(年齢、術前 PSA 値、Gleason score、pT stage)との関連を検討した。術後 PSA 再発率を Kaplan-Meier 法により算出し、Log-rank test で検討した。Cox の比例ハザードモデルを用いて多変量解析を施行した。

(2) 今までの研究において、アンドロゲン除去療法(ADT)の環境下で PCa は CRPC に進展していくという臨床的知見に基づき、ヒト CRPC 細胞株である C4-2 を ADT 下で 6 カ月間培養し、新規に CRPC 細胞株:C4-2AT6 を樹立し<sup>(3)</sup>(Fig. 1)、有用な実験系として報告してきた<sup>(4-6)</sup>。今回これら C4-2 と C4-2AT6 を解析の対象とし、アンドロゲン産生系である 5-還元酵素の酵素活性の同定とその解析のため、安定同位体 <sup>13</sup>C で修飾した前駆体 <sup>13</sup>C-[2,3,4]-androstenedione:<sup>13</sup>C-Adione を投与しその代謝産物、<sup>13</sup>C-[2,3,4]-testosterone (13C-T) <sup>13</sup>C-[2,3,4]-dihydrotestosterone (13C-DHT) を液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計(LC/MS/MS)で測定し解析した

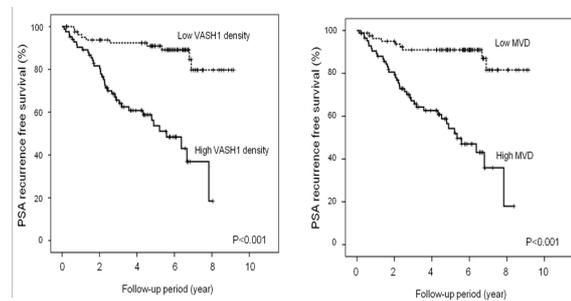
4. 研究成果

(1) VASH1 の発現は、high stage、Gleason

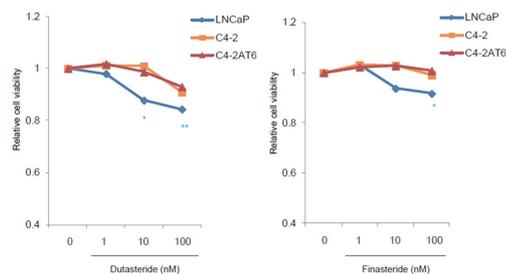
Score7 以上の症例において有意に高い傾向を認めた。単変量解析では術前 PSA 値、pT stage、微小血管密度(MVD)と共に、VASH1 の高発現が有意に(P<0.001)術後 PSA 再発に関連した。多変量解析の結果、pT stage (P<0.001)と共に VASH1 の高発現(P=0.007)は、それぞれ術後 PSA 再発に関連する独立した予測因子であった。生存解析では、high stage かつ VASH1 の発現が高い症例は、最も予後が不良であった。

前立腺癌において VASH1 の高発現は、術後 PSA 再発の独立した危険因子であり、PCa の進展への関与が示唆された。血管新生には異質性があり、VASH1 の発現は真の血管新生の活性度を示す血管新生関連マーカーであるとも推察され、VASH1 スコアの高い血管新生を内包するがん微小環境は、前立腺癌の進展に寄与していると考察された。

(2) C4-2 と C4-2AT6 の培養上清中から



<sup>13</sup>C-Testosterone と <sup>13</sup>C-DHT が LC/MS/MS 解析にて同定された。培養上清中の <sup>13</sup>C-Testosterone と <sup>13</sup>C-DHT の濃度の比率は 5 還元酵素活性を反映すると考えられるが、C4-2AT6 においては C4-2 に比して濃度比が低下しており、アンドロゲンの長期間除去環境下で、DHT の産生能が 5 還元酵素活性は低下していると考えられた。DHT の投与は LNCaP、C4-2、C4-2AT6、それぞれの細胞株に対し濃度依存性に PSA 産生を誘導していた。DHT の投与は LNCaP において、0.1 nM まで濃度依存性に細胞増殖活性を誘導したが、C4-2、C4-2AT6 ではむしろ低下しており、C4-2AT6 では増殖抑制が C4-2 に比較してより顕著であった。ヒト臨床試験における Dutasteride、Finasteride 投与下の有効血清薬物濃度の範囲内では、LNCaP において細胞増殖活性の低下が認められたが、C4-2 や C4-2AT6 では有意



な増殖抑制効果は認められなかった。

以上から C4-2AT6 における DHT に対する依存度の低下が示唆された。CRPC において DHT への細胞増殖における依存度低下と 5-還元酵素活性が低下していることがあり、その場合 AR axis を標的とするということに関して、5-還元酵素阻害剤は有用ではない、と推察された。

#### 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8件)

1: Hattori S, Kosaka T, Mizuno R, Kanao K, Miyajima A, Yasumizu Y, Yazawa S, Nagata H, Kikuchi E, Mikami S, Jinzaki M, Nakagawa K, Tanimoto A, Oya M. Prognostic value of preoperative multiparametric magnetic resonance imaging (MRI) for predicting biochemical recurrence after radical prostatectomy. *BJU Int.* 2014 May;113(5):741-7. doi: 10.1111/bju.12329. 査読あり

2: Yasumizu Y, Miyajima A, Kosaka T, Miyazaki Y, Kikuchi E, Oya M. Dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 sensitizes docetaxel in castration resistant prostate cancer. *J Urol.* 2014 Jan;191(1):227-34. doi: 10.1016/j.juro.2013.07.101. 査読あり

3: Mikami S, Oya M, Mizuno R, Kosaka T, Katsube KI, Okada Y. Invasion and metastasis of renal cell carcinoma. *Med Mol Morphol.* 2013 Nov 9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24213520. 査読あり

4: Kosaka T, Nagamatsu G, Saito S, Oya M, Suda T, Horimoto K. Identification of drug candidate against prostate cancer from the aspect of somatic cell reprogramming. *Cancer Sci.* 2013 Aug;104(8):1017-26. doi: 10.1111/cas.12183. 査読あり

5: Yoshimine S, Kikuchi E, Kosaka T, Mikami S, Miyajima A, Okada Y, Oya M. Prognostic significance of Bcl-xL expression and efficacy of Bcl-xL targeting therapy in urothelial carcinoma. *Br J Cancer.* 2013 Jun 11;108(11):2312-20. doi: 10.1038/bjc.2013.216. 査読あり

6: Kosaka T, Miyazaki Y, Miyajima A, Mikami S, Hayashi Y, Tanaka N, Nagata H, Kikuchi E, Nakagawa K, Okada Y, Sato Y, Oya M. The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with prostate cancer. *Br J Cancer.* 2013 May 28;108(10):2123-9. doi: 10.1038/bjc.2013.169. 査読あり

7: Kosaka T, Miyajima A, Nagata H, Maeda T, Kikuchi E, Oya M. Human castration resistant prostate cancer rather prefer to decreased 5- $\alpha$ -reductase activity. *Sci Rep.* 2013;3:1268. doi: 10.1038/srep01268. 査読あり

8: Suzuki K, Mizuno R, Suenaga K, Teruya T, Tanaka N, Kosaka T, Oya M. Bisebromoamide, an extract from *Lyngbya* species, induces apoptosis through ERK and mTOR inhibitions in renal cancer cells. *Cancer Med.* 2013 Feb;2(1):32-9. doi: 10.1002/cam4.53. 査読あり

[学会発表](計10件)

1. 小坂 威雄, 宮崎 保匡, 宮嶋 哲、三上 修治, 安水 洋太, 菊地 栄次, 田中川 健, 岡田 保典, 佐藤 靖史, 大家 基嗣: 前立腺癌における新規血管新生マーカーの発現の検討、第29回前立腺シンポジウム 東京 品

川コンベンションセンター 2013年12月14日

2. 安水 洋太, 宮嶋 哲, 小坂 威雄, 宮崎 保匡, 菊地 栄次, 大家 基嗣: PI3K-mTOR シグナル阻害剤は去勢抵抗性前立腺癌においてドセタキセルへの感受性を増大させる 第72回 日本癌学会総会 2013年10月5日 横浜 パシフィコ横浜

3. 宮崎 保匡, 小坂 威雄, 三上 修治, 菊地 栄次, 田中 伸之, 前田 高宏, 石田 勝, 宮嶋 哲, 中川 健, 岡田 保典, 佐藤 靖史, 大家 基嗣: 上部尿路上皮癌における新規血管新生制御因子 Vasohibin-1 発現の臨床的意義 日本癌治療学会 2013年9月14日 横浜 パシフィコ横浜

4. 小坂 威雄, 宮嶋 哲, 安水 洋太, 菊地 栄次, 大家 基嗣: 去勢抵抗性前立腺癌におけるアンドロゲン産生系の生化学的解析 第32回アンドロロジー学会 2013年7月26日 大阪 グランキューブ大阪

5: Yasumizu Y, Miyajima A, Kosaka T, Kikuchi E, Oya M. A new strategy for castration resistant prostate cancer with targeting to feedback mechanisms of PI3K/AKT/mTOR pathway. American Urological Association Annual Meeting 2013年5月6日 San Diego USA

6: Kosaka T, Miyajima A, Nagata H, Maeda T, Kikuchi E, Oya M. Intracrine dynamics of CYP17A1 activities in human castration resistant prostate cancer. American Urological Association Annual Meeting 2013年5月5日 San Diego USA

7. 小坂 威雄, 宮嶋 哲, 長田 浩彦, 前田 高宏, 安水 洋太, 菊地 栄次, 大家 基嗣: アンドロゲン産生系に着目した去勢抵抗性前立腺癌の生化学的解析 第101回 日本泌尿器科学会総会 2013年4月25日 札幌 ロイトン札幌

8. 安水 洋太, 宮嶋 哲, 小坂 威雄, 城武 卓, 菊地 栄次, 大家 基嗣: 去勢抵抗性前立腺癌に対する PI3K・mTORC1/2 阻害剤とドセタキセル併用効果についての検討 (Combination Therapy with PI3K-mTOR Pathway Inhibitor and Docetaxel in Castration Resistant Prostate Cancer)(英語) 第71回 日本癌学会総会 2012年9月20日 札幌 ロイトン札幌

9. 宮崎 保匡, 小坂 威雄, 三上 修治, 菊地 栄次, 田中 伸之, 前田 高宏, 石田 勝, 宮嶋 哲, 中川 健, 岡田 保典, 佐藤 靖史, 大家 基嗣: 上部尿路上皮癌における Vasohibin-1 の発現に関する予後因子として検討 (The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma) 第71回 日本癌学会総会 2012年9月20日 札幌 ロイトン札幌

10. 小坂 威雄, 宮嶋 哲, 菊地 栄次, 大家 基嗣: 去勢抵抗性前立腺癌における CYP17A1 活性 (Direct evidence of dual CYP17A1 activities in human castration resistant prostate cancer) 第71回 日本癌学会総会 2012年9月20日 札幌 ロイトン札幌

{ 図書 } (計 0 件)

{ 産業財産権 }  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.keio-urology.jp/>

5 . 研究組織  
( 1 ) 研究代表者  
小坂 威雄 ( KOSAKA , Takeo )  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号 : 34005407