

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462488

研究課題名(和文) PGE2受容体阻害と緑茶ポリフェノールのHuR抑制を利用した前立腺癌の化学予防

研究課題名(英文) Chemoprevention of prostate cancer using inhibition of PGE2 receptors and HuR suppression by green tea polyphenol

研究代表者

酒井 英樹 (SAKAI, Hideki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：40235122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌におけるhuman antigen R (HuR)の病理学的意義に関する情報は、これまで限られていたため、HuRの発現と前立腺癌の生物学的悪性度および癌関連分子との関連を検討した。その結果、HuRは前立腺癌細胞の増殖および遊走能を亢進させ、VEGF-A、VEGF-CおよびCOX-2の発現を介して、前立腺癌の生物学的悪性度と関連していることが明らかとなった。よって、HuRを抑制することが前立腺癌の予防に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Limited information is available on the pathological significance of human antigen R (HuR) in prostate cancer. We studied the relationship between HuR expression and malignant aggressiveness, and expression of cancer-related molecules in prostate cancer. Our results demonstrated that HuR plays important roles in determining malignant aggressiveness and outcome in prostate cancer, via the regulation of cell proliferation, migration, and expression of VEGF-A, -C, and COX-2. The suppression of HuR might be useful for prevention of prostate cancer.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 E prostanoid receptor human antigen R cyclooxygenase-2 prostaglandin E2

1. 研究開始当初の背景

Cyclooxygenase (COX)-2 は、多くの癌腫において癌化や癌細胞の増殖、さらには血管新生を促進することで、病期や悪性度および予後と関連している。我々も腎癌患者において COX-2 の高発現がその進展や予後と関連することを報告した (Miyata Y, et al. Clin Cancer Res 2003)。

一方、non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)をはじめ COX-2 阻害薬による癌の予防や治療が注目されたが、胃粘膜障害、凝固系への悪影響、さらに心血管系の副作用が報告され、COX-2 阻害薬を用いた癌予防・治療戦略は見直しを迫られることになった。

そこで、我々は、COX-2 の持つ生理 (病理) 作用の中心を担う prostaglandin (PG) E2 の特異的受容体である 4 つの E prostanoid receptors (EPs) に注目し検討を進め、以下の結果を得た。EP4R が上部尿路癌の病期や予後と関連し (Miyata Y, et al. J Urol 2005)、その機序として増殖や matrix metalloproteinase (MMP)-2 が関与する (Miyata Y, et al. Virchows Arch 2006)。

腎癌では、EP2R と 4R が癌細胞で高発現し、さらに病期や転移と関連する (研究業績 25)。

前立腺癌細胞の EP1R、2R、4R の発現が癌化や進展と関係し (Miyata Y, et al. Urology 2006)、癌間質の浸潤細胞では EP2R や EP3R が血管新生とリンパ管新生に関連する (Miyata Y, et al. Urology 2013)。以上より、EPR の選択的阻害による前立腺癌の化学予防・治療の可能性に着目した。

一方、mRNA を安定化させる作用をもつ human antigen R (HuR) が、COX-2 の発現を制御することが知られているが、臨床的に有用な HuR 阻害薬がない。そこで、我々が以前、膀胱癌の進展予防作用や血管新生抑制作用を持つことを報告した (Sagara Y, et al. Cancer Epidemiol, 2010)、Green tea polyphenol (GTP) が HuR の機能を制御する (Annabi B, et al. Leuk Res 2007) ことに着目して本研究を計画・立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、green tea polyphenol (GTP) と E prostanoid receptor (EPR) 拮抗薬による前立腺癌の発生・進行予防効果を明らかにすることである。まず、前立腺癌における human antigen R (HuR) の役割を解析するとともに、ヒト前立腺癌ときわめて類似したマウス前立腺癌モデルを用いて GTP による HuR 抑制、cyclooxygenase (COX)-2 抑制、prostaglandin E2 (PGE2) 産生の抑制効果を解析する。本研究は、GTP による PGE2 産生の抑制と PGE2 の受容体である EPR の選択的阻害、これら 2 つの機序を利用した前立腺癌予防効果を検討するものである。

3. 研究の方法

(1) ヒト前立腺細胞における HuR の検討

Western blot および免疫染色法を用いてヒト前立腺癌細胞 (アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞 PC-3、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞 LNCaP) および正常前立腺上皮細胞における HuR の発現を検討した。ヒト前立腺癌細胞の HuR を siRNA によってノックダウンし、MTT アッセイおよびコロニー形成アッセイを用いて癌細胞の増殖の変化を検討した。また、gap closure アッセイを用いて遊走能の変化を評価した。ヒト前立腺癌細胞の HuR を siRNA によってノックダウンし、HuR 関連分子である vascular endothelial growth factor (VEGF)、COX-2、heme oxygenase (HO-1) の発現の変化を検討した。

(2) 臨床検体を用いた前立腺組織における HuR の検討

対象は前立腺癌患者 182 人であり、平均年齢は 66.3 歳、組織学的悪性度 (グリソンスコア、GS) は低悪性度 (GS6 以下) 35 人、中間悪性度 (G7) 66 人、高悪性度 (GS8-10) 81 人であった。その内、転移のない限局癌が 115 人、遠隔転移のある患者が 67 人であり、限局癌 115 人は前立腺全摘除術を施行されていた。

HuR の発現は免疫組織化学的に評価し、HuR 発現と臨床病理学的因子との関連を検討した。

ホルモン療法未施行の前立腺癌 (HSPC) 組織および去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) 組織における HuR 関連分子の発現を検討した。

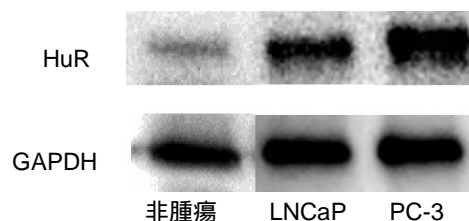
HSPC 組織および CRPC 組織における HuR 関連分子の発現と HuR 発現の関連を検討した。

HuR 発現と前立腺全摘除術後の生化学的再発までの期間との関連を検討した。なお、手術後の観察期間の中央値は 37.1 ヶ月であった。

4. 研究成果

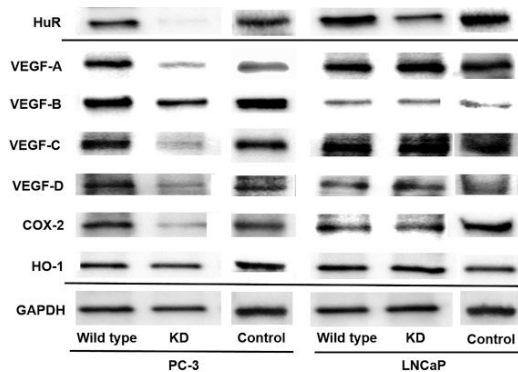
(1) ヒト前立腺癌細胞における HuR の検討

Western blot 法において、HuR の発現はヒト正常前立腺細胞に比べて前立腺癌細胞 (PC-3、LNCaP) で高かった。また、HuR は LNCaP よりも PC-3 で高く発現し、とくに細胞質における発現が PC-3 で高かった。



HuRをsiRNAによってノックダウンすると、PC-3およびLNCaPの増殖は抑制された。また、LNCaP細胞では72時間、PC-3細胞では48時間で、対照に比べ有意に遊走が抑制された。

アンドロゲン非依存性であるPC-3細胞ではHuRのノックダウンによりVEGF-A、B、C、DおよびCOX-2の発現が減弱したが、HO-1は変わらなかった。一方、アンドロゲン依存性であるLNCaP細胞ではHuRノックダウンによるVEGFs、COX-2およびHO-1の変化はみられなかった。



Wild type : 野生型、KD : ノックダウン、Control : 対照

以上より、ヒト前立腺癌細胞 (PC-3およびLNCaP) のHuRを抑制すると細胞の増殖・遊走能は抑制され、アンドロゲン非依存性であるPC-3ではVEGFおよびCOX-2の発現も抑制されることが明らかとなった。

(2) 臨床検体を用いた前立腺組織におけるHuRの検討

臨床検体を用いてヒト前立腺組織 (癌・非腫瘍) におけるHuRの発現を検討した結果、非腫瘍性腺管では主として核にHuRの発現が認められた。細胞質のHuR発現については、非腫瘍性組織に比べホルモン療法未施行の前立腺癌 (HSPC) 組織で有意に高く、さらに去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) 組織でのHuR発現はHSPC組織と比較しても有意に高かった。また、核のHuR発現については、非腫瘍性組織とHSPC組織で差はなかったが、CRPC組織では両者より有意に低かった。

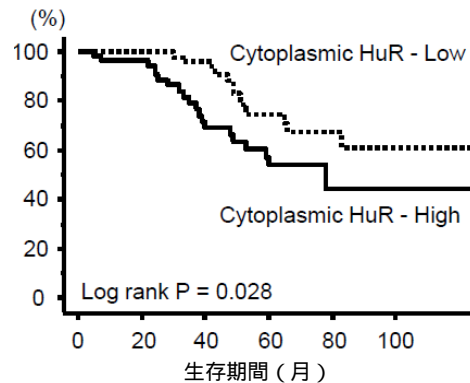
HuRの発現と臨床病理学的因子との関連を解析した結果、細胞質HuRの発現はグリソンスコア、T病期および転移と有意に関連があり、悪性度および進行度が高いほどHuRの発現が高かった。一方、核HuRの発現は悪性度および病期と関連がなかった。

前立腺癌組織におけるHuR関連分子の発現を検討した結果、HSPCと比べCRPCで有意にVEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、COX-2およびHO-1の発現が高かった。

HuR関連分子の発現と細胞質HuR発現との関連に関しては、HSPCにおいてHuRとCOX-2だけで関連があり、CRPCではHuRと

VEGF-A、VEGF-CおよびCOX-2で有意な関連がみられた。

手術を受けた115人において、細胞質HuRの発現の高い患者は発現の低い患者に比べ生化学的再発までの期間が有意に短かった。一方、核HuR発現と生化学的再発との関連はみられなかった。



Log rank P = 0.028
生化学的再発なし生存率
Cytoplasmic HuR : 細胞質HuR

ヒト前立腺癌細胞 (PC-3およびLNCaP) および臨床検体を用いたHuRおよびHuR関連分子の研究結果から、HuRは癌細胞の増殖と遊走およびVEGF-A、VEGF-C、COX-2発現の制御を介して、前立腺癌の生物学的悪性度と関連し、予後を規定する因子となる可能性が示唆された。

(3) マウス前立腺癌におけるHuR発現およびEPR拮抗薬の組織学的効果の検討

前立腺癌を発生する遺伝子改変マウスを用いて免疫組織学的に検討した結果、マウス前立腺組織におけるHuRの発現を確認した。

同マウスにEPR拮抗薬の投与を行う実験から、同薬の前立腺癌進行抑制効果を示す所見が得られた。

研究成果(1)(2)(3)から、HuRの発現は前立腺癌細胞の増殖および遊走能を亢進させ、VEGF-A、VEGF-CおよびCOX-2の発現を介して、前立腺癌の生物学的悪性度と関連していることが明らかとなった。よって、HuRを抑制することで、HuR - COX-2 - PGE2 - VEGF系が抑制され、前立腺癌の予防に有用である可能性が示唆された。今後GTP投与マウスにおけるHuR抑制効果を確認し、EPR拮抗薬とGTPの併用による前立腺癌予防効果を詳細に検討する予定である。

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 1 件)

Mitsunari K, Miyata Y, Asai A, Matsuo T, Shida Y, Hakariya T, Sakai H: Human antigen R is positively associated with malignant aggressiveness via

upregulation of cell proliferation, migration, and VEGFs and COX-2 in prostate cancer. Translational Research, 査読有, 2016, in press. doi: 10.1016/j.trsl.2016.04.002.

〔学会発表〕(計 4 件)

光成健輔, 浅井昭宏, 志田洋平, 松尾朋博, 大庭康司郎, 宮田康好, 酒井英樹: 前立腺癌における HuR の病理学的役割. 第 103 回日本泌尿器科学会, 2015 年 4 月 18 日, ホテル日航金沢 (石川県・金沢市)

Kensuke Mitsunari, Yasuyoshi Miyata, Akihiro Asai, Tomohiro Matsuo, Kojiro Ohba, Kousuke Takehara, Hideki Sakai: Pathological roles of Human antigen R (HuR) expression in prostate cancer. American Urological Association Annual Meeting 2015, May 17, 2015, New Orleans (USA)

宮田康好, 光成健輔, 浅井昭宏, 酒井英樹: 前立腺癌における human antigen-R の病理学的役割. 第 31 回前立腺シンポジウム, 2015 年 12 月 12 日, 東京コンファレンスセンター (東京都・港区)

Kensuke Mitsunari, Yasuyoshi Miyata, Akihiro Asai, Tomohiro Matsuo, Kojiro Ohba, Yohei Shida, Tomoaki Hakariya, Hideki Sakai: Human antigen R is positively associated with malignant aggressiveness via upregulation of cell proliferation, migration, and VEGFs and COX-2 in prostate cancer. 第 104 回日本泌尿器科学会, 2016 年 4 月 23 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 英樹 (SAKAI, Hideki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
教授
研究者番号: 4 0 2 3 5 1 2 2

(2) 研究分担者

宮田 康好 (MIYATA, Yasuyoshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
准教授
研究者番号: 6 0 3 8 0 8 8 8

大庭 康司郎 (OHBA, Kojiro)
長崎大学・病院 (医学系)・講師
研究者番号: 2 0 5 9 3 8 2 5