

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861410

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌でのスタチンによる腫瘍内アンドロゲンde novo合成への影響

研究課題名(英文) Effect of statins on de novo steroid synthesis pathways in androgen independent prostate cancer cells.

研究代表者

関根 芳岳 (Yoshitaka, Sekine)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00516370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌におけるスタチンの治療薬としての可能性及びスタチンへの併用薬の有無をアンドロゲン合成酵素との関係を中心に探索した。実験にはPC-3細胞を用い、結果として、スタチン投与によりアンドロゲン産生経路の酵素ではAKR1C3の顕著な発現上昇し、AKR1C3をsiRNAでノックダウンし、スタチンを投与したところ、さらなる細胞増殖効果及び遊走能抑制効果を認めた。同様に、AKR1C3の阻害作用を持つmeclofenamic acidをスタチンに併用したところ、同様の効果を認めた。以上より、スタチンとNSAIDsの併用で、去勢抵抗性前立腺癌に対してより抗腫瘍効果の得られる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Statins have biological activities which inhibit prostate cancer (PC) growth. However, the exact mechanisms are still unclear. In this study, we investigated the effects of statins on expressions of enzymes for steroid synthesis in androgen independent PC cells. After treatment of Simvastatin (Sim), there are significant alterations in expressions of enzymes for de novo steroid synthesis pathways. Especially, the expression of AKR1C3 increased more than 50 times in PC-3. Knockdown of AKR1C3 by siRNA increased Sim-Induce inhibitions of cell proliferation and migration in PC-3. Similarly, the combination Sim with meclufenamic acid (MA), which inhibits AKR1C3, increased simvastatin-Induce inhibitions of cell proliferation and migration in PC-3. Sim altered some gene expressions of enzymes for de novo steroid synthesis pathway in PC cells. Moreover, MA was found to have a possible role in modulating cancer progression via inhibit AKR1C3 by the combination use of Sim.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 スタチン AKR1C3 NSAIDs

### 1. 研究開始当初の背景

我が国において近年前立腺癌は著しく増加しており、前立腺癌による患者死亡数も増加している。そういった現状に対し、腫瘍の進行メカニズムの解明をすることで、新しい治療法を導き出すことが急務である。前立腺癌は、治療当初はホルモン療法に反応するものが多いものの、次第に去勢抵抗性前立腺癌 (Castration-Resistant Prostate Cancer; CRPC) へ移行し、治療を行うことが困難となる。近年、CRPCにおいてアンドロゲンの腫瘍内 de novo 合成が注目されている。CRPCではコレステロールよりアンドロゲンを合成する酵素の発現が上昇しており、腫瘍内で産生されたアンドロゲンがCRPCにおけるARの再活性化を引き起こしていることが報告されている(Cai C, et al. Cancer Res. 2011)。実際、アンドロゲン合成経路をターゲットとしたAbirateroneやTAK-700といった薬剤の臨床研究が現在進んでおり、副腎だけでなく前立腺腫瘍内におけるアンドロゲン産生阻害の効果も期待されている。

HMG-CoA還元酵素阻害薬であるスタチンは高コレステロール血症の治療薬として広く使用されているが、そのpleiotropicな作用として、スタチン内服群では前立腺癌の罹患率が低い(Breau RH, et al. J Urol. 2010)、根治的前立腺全摘術や放射線療法後の前立腺癌の再発率が低い(Hamilton RJ, et al. Cancer. 2010)(Gutt R, et al. J Clin Oncol. 2010)などが報告されている。スタチンがこういった抗腫瘍効果を引き起こすメカニズムとしては、細胞内シグナル伝達に関連した細胞膜ドメインのコレステロールを低下させることや細胞周期に関連した酵素を阻害することなどが挙げられている。しかし、スタチンによる前立腺癌増殖抑制機構については、いまだ不明瞭な点も多く、解明することで新たな治療法へつながる可能性が示唆される。

### 2. 研究の目的

今回、我々はde novo アンドロゲン産生経路の出発点であるコレステロールに注目し、スタチン投与による細胞内のコレステロール濃度への影響、また同時に、スタチン投与によるアンドロゲン産生経路の各酵素の発現への影響を調べ、もしスタチンにより発現が上昇している酵素がある場合には、その酵素を阻害することで、スタチンによる抗腫瘍効果への相乗・相加作用の有無を検討し、CRPCにおけるスタチンの治療薬としての可能性及びスタチンへの併用薬の有無を探索した。

### 3. 研究の方法

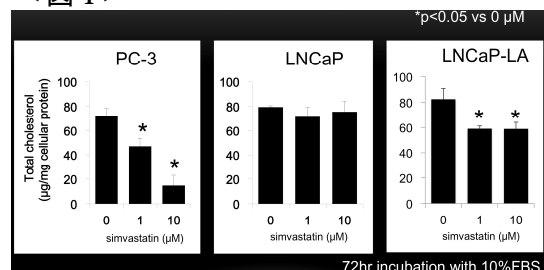
前立腺癌細胞株 PC-3、charcoal stripped FBS を使用した培地にて長期培養して樹立したホルモン非依存性 LNCaP

(LNCaP-LA) を使用し、シンバスタチン投与後の、細胞内コレステロール濃度測定、定量的 PCR によるアンドロゲン産生経路の各酵素の発現変化の評価を行った。また細胞増殖は MTS アッセイ、遊走能は wound healing アッセイにより評価した。スタチン投与後の培養液中のアンドロゲン濃度の測定は LC-MS/MS にて行った。Akt のリン酸化は、ウェスタンブロット法にて評価した。

### 4. 研究成果

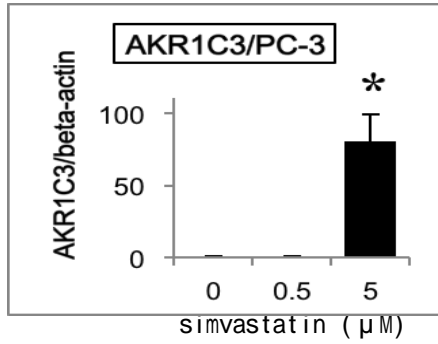
シンバスタチン投与により、ホルモン非依存性前立腺癌細胞内のコレステロール濃度の低下を認めた(図1)。また、アンドロゲン産生経路の酵素では、PC-3では、CYP11A1、AKR1C3、SRD5A2の発現上昇、HSD3B1の発現低下を、ホルモン非依存性LNCaPでは、AKR1C3の発現上昇、HSD3B1の発現低下を認めた。特にPC-3でのAKR1C3の発現上昇は50倍以上と顕著であった(図2)。そこで、AKR1C3に注目し、実験を進めた。アンドロステジオン投与後のPC-3培養液中におけるテストステロン及びDHT濃度測定を行い、AKR1C3の機能解析したところ、どちらの濃度もスタチン投与群で高値であった(図3)。AKR1C3の発現上昇は、PC-3において腫瘍進展効果の有る事が報告されており、まずAKR1C3をsiRNAでノックダウンし、シンバスタチンを投与したところ、コントロールsiRNAをトランスフェクションした群に比べ、さらなる細胞増殖効果及び遊走能抑制効果を認めた(図4)。同様に、AKR1C3の阻害作用を持つ、NSAIDsの一種であるmeclofenamic acidをシンバスタチンに併用したところ、AKR1C3のsiRNAと同様の効果を認めた(図5)。AKR1C3はAktのリン酸化にも関わっている事が報告されており、meclofenamic acidによるAktのリン酸化への影響をチェックしたところ、スタチン及びmeclofenamic acid併用により、更なるAktのリン酸化の阻害を認めた(図6)。以上より、細胞内コレステロール濃度を低下させるスタチンの投与により、de novo アンドロゲン産生経路の酵素の発現が変化し、さらにその変化をターゲットとするNSAIDsの併用により、ホルモン不応性前立腺癌に対してより抗腫瘍効果が得られる可能性が示唆された。

< 図 1 >



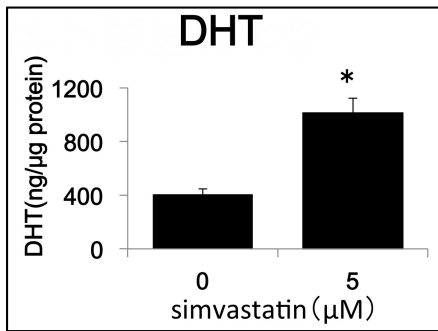
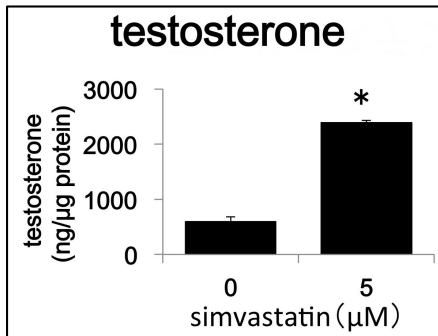
< 2 >

\* p<0.05 vs 0  $\mu$ M



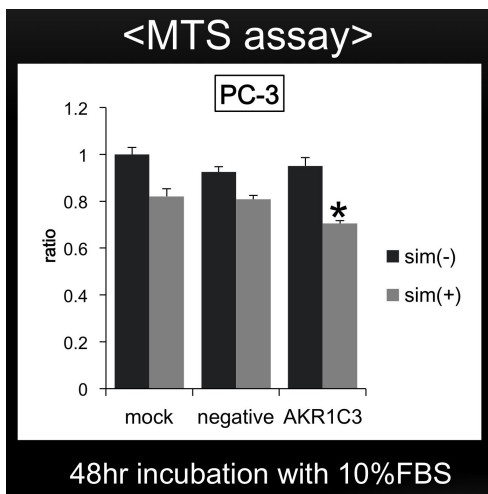
< 3 >

\* p<0.05 vs 0  $\mu$ M

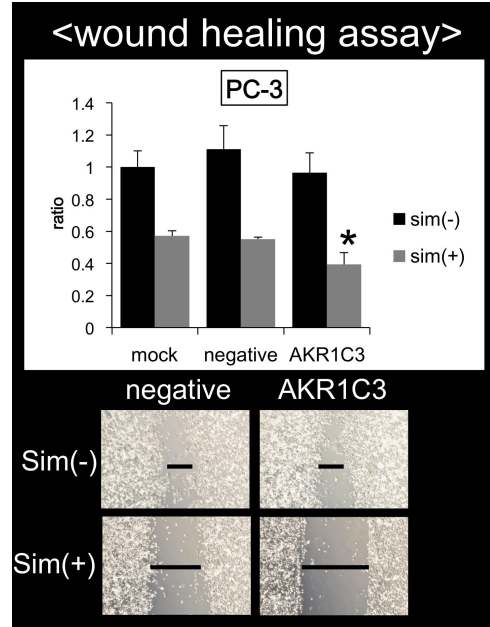


< 4 >

\* p<0.05 vs negative

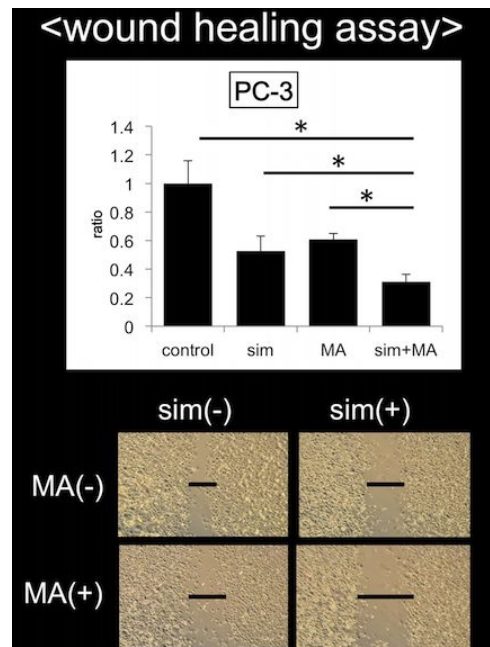
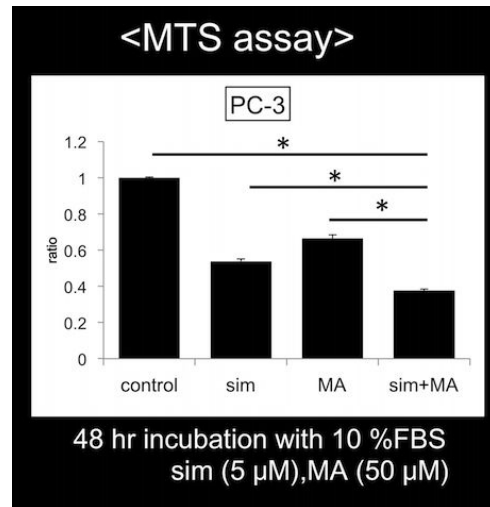


\* p<0.05 vs negative

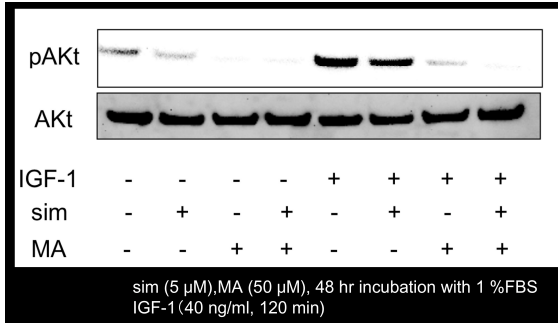


< 5 >

\* p<0.05



< 図 6 >



## 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 1 件)

関根芳岳、古谷洋介、加藤春雄、宮澤慶行、新井誠二、新田貴土、小池秀和、松井博、柴田康博、伊藤一人、鈴木和浩、AKR1C3 を介したスタチンと NSAIDs の併用効果による前立腺癌細胞進展抑制効果の解明、第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015.04.18、金沢

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
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

関根 芳岳 (SEKINE YOSHITAKA)  
群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：00516370

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：