

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861452

研究課題名(和文) GEP100-Arf6-AMAP1pathway制御による前立腺癌浸潤形質の制御

研究課題名(英文) The regulation of prostate cancer invasion by GEP100-Arf6-AMAP1 pathway

研究代表者

金子 剛 (Kaneko, gou)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：20445266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌の罹患率は急速に増加し、限局性前立腺癌に対する前立腺全摘術の施行数は今後ますます増加することが予測される。手術後、再発の確率が高い群と低い群と層別化し、再発の確率が高い群をより厳重に経過観察することが医療経済の面からも不可欠であると考えられる。本研究から前立腺癌においてGEP100-Arf6-AMAP1 pathwayを構成するsignalの高発現は前立腺全摘術後のPSA再発を予測する有用な因子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The morbidity of prostate cancer has been rapidly increasing, therefore, it is expected that radical prostatectomy for localized prostate cancer will increase in the future. Thus, the elucidation of the novel and strong predictor for recurrence after surgery is essential from the viewpoint of medical economy. It is suggested that the strong expression of signal of GEP100-Arf6-AMAP1 pathway is a useful predictor for PSA recurrence after radical prostatectomy from the present study.

研究分野：泌尿器科

キーワード：前立腺癌

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の罹患率は急速な増加傾向を認め、2020年には肺癌に次いで男性癌の2番目の年齢調整罹患率になると予測されている。限局性前立腺癌に対する根治療法として、本邦では手術療法(前立腺全摘術)が主に施行される。手術療法の制癌効果に関しては、1000症例を前向きに追跡した検討において、術後3年間の非PSA再発生存率は90.5%と報告されている(Guillonneau B et al. J Urol 2003)。当教室の500例を超える検討においても同様の結果を認めた。このように前立腺全摘術施行症例の約10%でPSA再発を認めるのが現状である。PSA再発の予測因子として、術前PSA値、臨床病期、悪性度(Gleason grade)、切除断端陽性などが報告されているが、いずれも強力な予測因子とは言えない。上述のように今後、前立腺癌患者数の急速な増加が予測されていることから、手術療法後の再発の確率が高い群と低い群を層別化し、再発の確率の高い群をより嚴重に経過観察する必要が医療経済の面からも不可欠である。よって、手術療法後の再発を予測する強力な因子の確立が急務であると考えられる。

癌の浸潤、転移の過程では、癌細胞が浸潤能を獲得する必要があるが、特徴的な変化の1つに、E-cadherinを介し細胞間で接着性が消失することがあげられる。近年、前立腺癌においてもcadherinを中心とした上皮間質形質転換(EMT)について広く研究され、他癌と同様にE-cadherinの発現低下は癌特異的生存率の低下を予測する独立因子であると報告されている(van Oort et al. Prostate. 2007)。また、E-cadherinの発現低下、N-cadherinの発現上昇がEMTを誘導し、前立腺癌の進展において非常に重要であると報告されている(Gravdal Ket al. Clin Cancer Res. 2007)。よって、前立腺癌におけるE-cadherinの発現を調整する特異的なsignal pathwayの制御機構を解明することは新規治療戦略として極めて有用であると考えられる。

乳癌は、性ホルモンと関連を有し前立腺癌と共通点の多い癌種であるが、EGFRを介しGEP100 - Arf6 - AMAP1 pathwayがE-cadherinの発現を制御すること、およびAMAP1の発現が予後予測因子として有用であると報告されている。(Onodera Y et al. EMBO J. 2005)。

またヒト乳癌組織におけるGEP100の発現も免疫組織学的染色で検討され、高浸潤性乳癌組織は低浸潤性乳癌と比してGEP100の発現が高いと報告されている(Morishige M et al. Nat Cell Biol. 2008)。またGEP100はEGFRと直接的に結合し、活性化EGFRからのsignalを下流のArf6、AMAPに伝達することが解明されている。またGEP100 - Arf6 - AMAP1 pathwayの機能解析も報告されている。

ヒト浸潤性乳がん細胞 MDA-MB-231 を用い、siRNA法によりGEP100の発現を抑制したところ、EGF刺激に依存した浸潤活性が著しく抑制された。また浸潤能をほとんど有さないヒト乳がん細胞 MCF7 を用い、Arf6 と GEP100 を同時に強発現させるとEGF刺激に依存した浸潤活性が誘導され、E-cadherinを介した細胞-細胞間接着の障害が誘導されたと報告されている。このように乳癌ではGEP100 - Arf6 - AMAP1 pathway が浸潤形質を制御することが着々と解明されており、同 pathway は新規治療標的として有用であると考えられている。

前立腺癌は、乳癌と同様に性ホルモンと密接な関連を有する共通点の多い癌種であることより、我々は前立腺癌においてもGEP100 - Arf6 - AMAP1 pathway が浸潤形質の制御と強く関連していると予測した。

2. 研究の目的

前立腺癌においてGEP100、AMAP1が発現しているか否かを確かめ、発現を有する場合は同signalが再発予測因子として有用であるか解明することを目的とした。またGEP100 - Arf6 - AMAP1 pathway が前立腺癌の浸潤形質を制御機構であるか解明し、同 pathway の制御が新規治療戦略として有用であるか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌における GEP100、AMAP1 発現の意義の検討

前立腺癌における GEP100 - Arf6 - AMAP1 pathway の存在を確認する

前立腺癌細胞より抽出したタンパクを用いてWestern blot法により、GEP100、AMAP1、E-cadherinの発現を検討し、前立腺癌においても同 pathway が存在することを確認する(in vitro)。またマウス皮下腫瘍モデルを作成し、in vivoにおいてもEGFR、GEP100、AMAP1、E-cadherinが発現していることをWestern blot法、免疫組織学的染色にて確認する。

GEP100、AMAP1 発現と予後の解析

当教室で前立腺全摘術を施行した200例の限局性前立腺癌の手術摘除検体のパラフィン包埋切片を用いて免疫組織学的染色を行い、腫瘍部位におけるGEP100およびAMAP1の発現を検討する。GEP100、AMAP1の発現と予後(PSA再発など)との関連を統計学的に検討する。

(3) EGFR 阻害薬などによる

GEP100-Arf6-AMAP1 pathway の制御

前立腺癌細胞に EGFR 阻害薬を投与することにより、GEP100、AMAP1 の発現が低下し、結果として E-cadherin の発現が抑制されるか Westernblot 法にて検証する (in vitro)。また前立腺癌のマウス皮下腫瘍モデルに EGFR 阻害薬を投与し、in vitro における GEP100、AMAP1、E-cadherin の発現の変化を Westernblot 法、免疫組織学的染色にて検証する。また EGFR の他の GEP100-Arf6-AMAP1 pathway を制御する因子を探索する。

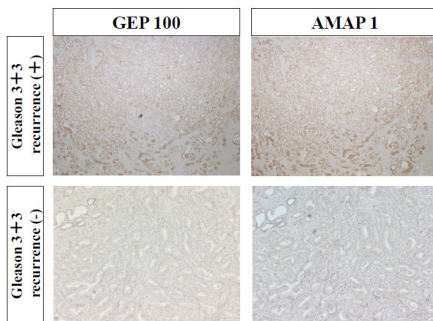
(4) GEP100-Arf6-AMAP1 pathway の制御による浸潤能の抑制

ヒト浸潤性前立腺癌細胞における GEP100 の発現を siRNA 法により抑制させ、E-cadherin の発現が低下し (Westernblot 法) EGF 刺激に依存した浸潤活性が抑制される (Matrigel invasion assay) ことを検証する。また浸潤能をほとんど有さないヒト前立腺癌細胞を用い、Arf6 と GEP100 を同時に強発現させると E-cadherin の発現が亢進し、EGF 刺激に依存した浸潤活性が高進するかを検証する。

4. 研究成果

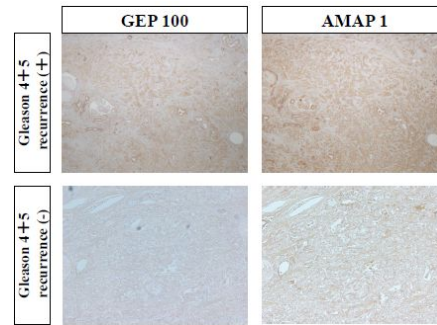
- (1) ヒト前立腺癌細胞およびマウス皮下腫瘍モデルから抽出したタンパクを用いて Westernblot 法にて EGFR、GEP100、AMAP1、E-cadherin が発現していることを確認した。
- (2) 限局性前立腺癌の手術摘除検体のパラフィン包埋切片を用いて、GEP100 および AMAP1 の免疫染色条件を確立した。

Fig. 1



低悪性度前立腺癌 (Gleason 6) における検討では、術後に PSA 再発をきたした症例 (上段) は、非再発症例 (下段) と比して、GEP100、AMAP1 とともに強く発現していた。

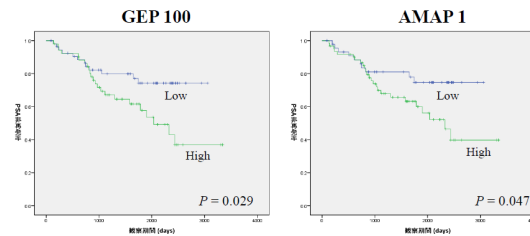
Fig. 2



高悪性度前立腺癌 (Gleason 9) における検討においても同様に、PSA 再発症例 (上段) は、非再発症例 (下段) と比して、GEP100、AMAP1 の強発現を認めた。

次に、200 例の限局性前立腺癌の組織検体を用いて、GEP100、AMAP1 発現と予後 (PSA 再発) の関連を検討した。

Fig. 3



GEP100 の高発現群の PSA 非再発率は、低発現群と比して有意に低かった ($P=0.029$)。同様に AMAP1 の高発現群の PSA 非再発率も、低発現群と比して有意に低かった ($P=0.047$)。

Fig. 4

	PSA非再発生存	
	Univariate P value	Multivariate HR (95%CI) P value
Age	0.343	
≥ 65 years		
< 65 years		
PSA	0.013	
≥ 10		
< 10		
Gleason	0.001	
≥ 8		
< 8		
ECE	< 0.001	0.004
(+)		3.202 (1.452 - 7.060)
(-)		
GEP100	0.029	0.043
high		2.076 (1.025 - 4.204)
low		
AMAP1	0.047	
high		
low		

既存の前立腺癌術後の再発予測因子に、GEP100、AMAP1 発現を因子として加えた多変量解析において、GEP100 の高発現は独立した再発予測因子であった。

以上より、前立腺癌において GEP100-Arf6-AMAP1 pathway を構成する signal の発現は再発予測因子として有用

である可能性が示唆された。前立腺癌患者数が急速に増加していることから、手術療法後の再発の確率が高い群と低い群と層別化し、再発の確率が高い群をより厳重に経過観察することが医療経済の面からも不可欠である。よって、手術療法後の再発を予測する新規因子を解明した本研究は有意義であると考えられる。

EGFR 阻害薬などによる同 pathway の制御が、前立腺癌の浸潤形質制御に関連するかは、引き続き in vitro、in vivo で検討中である。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6．研究組織

(1)研究代表者

金子 剛 (KANEKO Gou)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：20445266