

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293350

研究課題名(和文)AR Axis・微小環境を考慮した前立腺癌進行の機序解明と革新的治療戦略の構築

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms of the prostate cancer progress in consideration of AR Axis / microenvironment and the construction of the innovative treatment strategy

研究代表者

並木 幹夫(NAMIKI, Mikio)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70155985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌組織において発現が減少し、活性酸素の代謝に関わる遺伝子Superoxide dismutase 3 (SOD3)のを同定し、SOD3が腫瘍抑制因子として働いていることを突き止めた。前立腺癌細胞と前立腺癌由来間質細胞を共培養し、大量のテストステロンを添加すると、間質細胞において活性型エストロゲンの産生され、それが癌細胞の増殖を抑制することを明らかにした。さらに、アンドロゲン感受性前立腺癌細胞を非感受性前立腺癌細胞を培養すると、cross-talkにより、それぞれの増殖が促進されたり、浸潤能が変化することが明らかとなった。フラボノイド誘導体を合成し、前立腺癌細胞での抗腫瘍効果を確認した

研究成果の概要(英文)：We identified identified superoxide dismutase 3 (SOD3) which expression was decreased in prostate cancer tissue compared with normal tissue. SOD3 was related with metabolism of the active oxygen and worked as a tumor inhibiting factor. When prostate cancer cells were cocultured with derived derived from and prostate cancer and added a large quantity of testosterone into coculture, the proliferation of the prostate cancer cells was inhibited. This mechanism was involved in estrogen synthesis in stromal cells. Furthermore, when androgen-sensitive prostate cancer cells were cocultured with androgen-insensitive prostate cancer cells, the proliferation of androgen-sensitive prostate cancer cells in the presence of androgen was accelerated by androgen-insensitive cells. Moreover, invasion of androgen-insensitive cells was induced by androgen-sensitive cells. We synthesized flavonoid derivatives and confirmed anti-cancer effect.

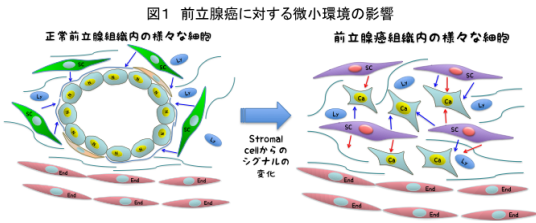
研究分野：泌尿器科

キーワード：SOD3 前立腺癌 共培養 間質細胞

1. 研究開始当初の背景

正常前立腺から前立腺癌が発癌する機序は不明な点が多い。また、転移性前立腺癌に対してはホルモン療法が主に行われるが、数年後には半数以上の症例で再燃をきたし、その後の治療に難渋する。**去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)への移行及び進行**は臨床的に克服すべき重要課題である。海外ではドセタキセル抵抗性の CRPC に対しても DHEA 合成阻害薬アピラテロンアセトートや第 2 世代 antiandrogen MDV3100 が有効で、既に臨床応用されていることから、CRPC の増殖においても AR axis が重要であることは明白である。しかし、これらの薬剤だけではまだ CRPC の進行を食い止めることができない。また、前立腺癌組織や骨の微小環境も前立腺癌の増殖、再燃に極めて重要と考えられている。従って、前立腺癌の発癌・増殖、再燃に対する予防や治療戦略を考える場合、AR を取り巻く環境、前立腺癌周囲の微小環境の関与を明らかにすることは極めて重要である。これまで我々は**アンドロゲン感受性亢進**の機序 (Harada, S. Prostate 46: 319-26 2001)、**副腎性アンドロゲンの再燃への関与の可能性** (Mizokami A. Cancer Res 64:765-71 2004) を突き止めた。また、前立腺癌患者の癌組織から**間質細胞の primary culture** を樹立し、前立腺癌組織内での副腎性アンドロゲンから DHT 生合成に前立腺癌間質細胞、骨由来間質細胞が**intracrine/paracrine 的 DHT 生合成**に重要な働きをしていることを明らかにするなど (Mizokami A. Endocr-Relat Cancer 16:1139-55 2009)、前立腺癌と AR の研究を精力的に進めてきた。最近では前立腺癌の発癌、前立腺癌の進行に関与する遺伝子を明らかにするために、正常前立腺組織と前立腺癌組織の 3 検体ずつの間で cDNA microarray を施行し、カルシウム代謝に関与する遺伝子 CAMKK2 の発現が、正常と癌の間で異なることを確認し、去勢による CAMKK2 の発現低下に伴う前立腺癌の増殖亢進、アンドロゲン感受性亢進との関連を明らかにした (Shima T. Prostate 72: 1789-801 2012)。その他にも活性酸素を除去する **Superoxide dismutase 3(SOD3)** 遺伝子の発現が前立腺癌組織で減弱していることを確認した。また間質細胞を用いた研究から、前立腺癌細胞周囲の微小環境としての間質細胞から分泌される細胞外マトリックスの一種 (**SPARC**) が前立腺癌細胞の増殖や遊走能に影響を及ぼすことも明らかにした (Shin M. Prostate 73:1159-70 2013)。以上の結果から、**前立腺癌の増殖、CRPC 移行への機序、アンドロゲン生合成、骨転移薬での増殖に AR axis および癌周囲の微小環境**が様々な影響を与えていることは間違いなく(図 1) それらの基礎研究を行うことは、前立腺癌に対する治療戦略

を考える上で最も重要な課題であり、本研究が計画された。



2. 研究の目的

A) 前立腺癌の発癌・増殖と活性酸素・SOD3 の関係 (図 2)

前立腺癌の増殖にも**活性酸素**が関与し、増殖、浸潤を誘導する可能性がある。cDNA microarray の結果から **Superoxide dismutase 3(SOD3)** 遺伝子の発現が前立腺癌組織で減弱していることを確認した。つまり、活性酸素を除去する能力のある SOD3 の発現が減弱しているということは前立腺癌がより進行しやすい状況にあると考えられ、SOD3 が癌抑制因子として働いている可能性がある。さらに SOD3 は細胞外に存在する SOD であるため、前立腺癌周囲の微小環境の SOD の働きも減弱している可能性がある。我々は SOD3 の癌抑制遺伝子としての機能を明らかにするとともに、微小環境としての間質細胞と活性酸素の関連を明らかにする。

B) CAMKK2 の制御とアンドロゲン感受性

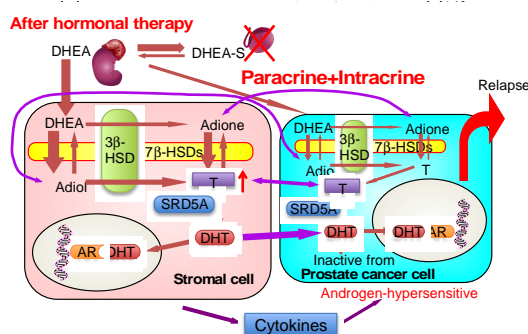
CAMKK2 の発現はアンドロゲン依存性で AR axis に関連している。去勢により減弱するが、その発現の減弱がアンドロゲン感受性を亢進させ、低濃度のアンドロゲンでも増殖が促進される可能性を我々は報告した CAMKK2 の活性が低下してもその下流に存在している遺伝子の働きが維持されれば、アンドロゲン感受性が変わらず、再燃しない状態を維持できる可能性がある。そこで CAMKK2 の下流遺伝子 (例えば、**AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK)**) に注目して、それらの機能とアンドロゲン感受性への影響を明らかにし、再燃予防に役立てる。

C) 前立腺癌間質細胞による前立腺癌細胞の副腎性アンドロゲン代謝の修飾、character の修飾 (図 2)

LNCaP 細胞が**前立腺癌由来間質細胞**と **intracrine/ paracrine 的**に DHEA を DHT に変換することを確認しているが、この現象が間質細胞内でのアンドロゲン生合成だけでなく、間質細胞から分泌される cytokine の影響も受けている可能性がある。これらの growth factor、cytokine を

同定し、DHEA から DHT に変換する代謝酵素の活性の変化を観察する。さらに多くの患者から前立腺癌由来間質細胞を樹立し、それらのアンドロゲン合成能力と予後との関係を明らかにする。また癌由来間質細胞や骨由来間質細胞から特異的に発現している因子を同定し、それらの因子がどのように前立腺癌細胞の増殖・浸潤や **Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)** に影響を及ぼしているかを明らかにする。

(図2 Intracrine/paracrine アンドロゲン合成)



3. 研究の方法

A) 前立腺癌の発癌・増殖と活性酸素・SOD3 の関係(研究分担者: 溝上 敦、泉 浩二と共に行う)

前立腺癌組織において正常前立腺組織より RNA の発現が 4 倍以上減弱していた遺伝子として同定されたため、タンパク質の発現も同様に癌組織で減弱しているかどうかを市販の Tissue microarray を使用することによって確認する。また、悪性度と発現程度との相関の有無も明らかにする。さらに当院にてこれまで保存されてきた患者前立腺癌組織の中で免疫組織染色にて調べることにより、悪性度、予後と SOD3 の発現との相関の有無も検討する。SOD3 の機能解析には以下の実験を行う。SOD3 は少なくとも有名な前立腺癌細胞 (LNCaP, PC-3, DU145) では発現が減弱していることを既に確認しているので、SOD3 を前立腺癌細胞に強制発現させ、安定発現株を樹立することにより SOD3 の機能解析を行う。SOD3 は癌抑制遺伝子の可能性があり、細胞に強制発現させると、細胞がほとんど増殖しなくなるかもしれないので、そのときは Tet-on System®(クロンテック)を用いてテトラサイクリンによる SOD3 遺伝子の誘導前立腺癌細胞を樹立し、機能解析を行う。機能解析としてまず活性酸素の除去が

できるかどうかを活性酸素検出キット(多くの市販のキットが販売されている)にて確認する。

SOD3 強制発現株において活性酸素の除去に関連する遺伝子群 (catalase, GSH peroxidase GSH reductase など) の発現変化があるかを RT-PCR や Western blotting にて観察する。これらの遺伝子の発現に変化がない場合は、cDNA microarray を行い、強制発現株と親株の間で発現の異なる遺伝子を同定、その役割を推測する。

さらに、SOD3 強制発現株での増殖能の変化を観察する。またアンドロゲン応答性に影響を与えるかどうか、PSA 発現に影響するかどうかを RT-PCR、Western blotting、ELISA で明らかにする。

B) 前立腺癌間質細胞による前立腺癌細胞の副腎性アンドロゲン代謝の修飾、character の修飾(研究分担者: 溝上 敦と共に行う)

前立腺癌由来間質細胞(PCaSC) を LNCaP 細胞と共培養することによりと **intracrine/ paracrine** 的に DHEA を DHT に効率よく変換することを既に確認しているが、この現象が間質細胞から分泌される cytokine や growth factor の影響も受けている可能性がある。これらの因子を同定するために、間質細胞を培養した培地から conditioned medium を作成して前立腺癌細胞での様々なアンドロゲン合成酵素 (Type 1-7 17-hydroxysteroid dehydrogenase、Type 1, 2 3-hydroxysteroid dehydrogenase、5-reductase) の発現変化を観察する。

pGL3PSAp-5.8 導入 LNCaP 細胞に PCaSC の conditioned medium をと DHEA を添加し、AR の活性がどのように変化するかをルシフェラーゼアッセイにて確認する。

conditioned medium 中のどのサイトカインが AR の活性に影響を与えるかを明らかにするために、conditioned medium を用いてサイトカインアレイを行う。

サイトカインアレイによって得られたデータをもとに PCaSC と pGL3PSAp-5.8 導入 LNCaP 細胞との共培養にそれらのサイトカインと DHEA を添加し、AR の活性がどのように変化するかをルシフェラーゼアッセイにて確認する。

C) 前立腺癌間質細胞による前立腺癌細胞の副腎性アンドロゲン代謝の修飾、および character の修飾

サイトカインによって DHEA から DHT への代謝がどのように変化したかを培養上清中の各種アンドロゲンの濃度を LC-MS/MS にて測定する。LNCaP 細胞と前立腺癌患者の針生検で得られた組織から樹立された数種の間質細胞 (PCaSC) との共培養では intracrine/paracrine 的に DHEA から DHT の合成促進することが確認しているが、さらに多くの前立腺癌患者からの間質細胞を培養し、他のアンドロゲン感受性前立腺癌細胞との共培養でも同様な現象が生じるか検討する。PCaSC が微小環境として重要な働きをしていると考えられるため、前立腺癌細胞を、前立腺肥大症患者から得られた間質細胞、あるいは PCaSC と共培養を行うことにより、増殖がどのように変化するかを観察する。さらにマトリゲルチャンバーを用いて癌細胞の浸潤能の違いも観察する。また前述の cytokine array の結果をもとに、発現の高い cytokine を投与することによる前立腺癌細胞の変化を観察する。PCaSC と正常前立腺由来間質細胞との間で発現の異なる遺伝子を cDNA microarray にて同定し、間質細胞で強制発現させたりノックダウンさせたりすることによってそれらの機能(増殖、形態など)を調査する。さらにそれらの遺伝子を変化させた間質細胞を前立腺癌細胞と共培養することによって、前立腺癌細胞の増殖・浸潤や、アンドロゲン感受性の変化を調査する。

4. 研究成果

正常前立腺組織と前立腺癌組織から得られた RNA から cDNA microarray を行うことにより、癌組織にて発現が減少し、活性酸素の代謝に関わる遺伝子 Superoxide Dismutase 3 (SOD3) を同定した。この SOD3 の発現を前立腺癌培養細胞で調べると、アンドロゲン依存性細胞 LNCaP、非依存性細胞 PC-3、DU145 の 3 種類で低下していた。また正常前立腺組織と比べ、前立腺癌組織で発現が減弱していた。SOD3 の前立腺癌組織での機能を明らかにするために、これらの細胞株に強制発現させたところ、SOD3 が腫瘍抑制因子として働いていることが明らかとなった。

前立腺癌細胞および前立腺癌由来間質細胞内での副腎性アンドロゲンの代謝を明らかにする研究において、テストステロンから

代謝されるエストロゲンに注目した。間質細胞でのエストロゲン産生能があることを、間質細胞株 MCF-7 との共培養でエストロゲン活性を示すことを明らかにした。この間質細胞をアンドロゲン非依存性 PC-3 と共培養し、テストステロンを添加すると、PC-3 の増殖が抑制された。この作用はテストステロンの作用ではなく、代謝されたエストロゲンによる作用の可能性が示唆された。残念ながらエストロゲンで抑制される間質細胞からのサイトカインが何であるかは明らかにすることができなかった (図 3, 4)。

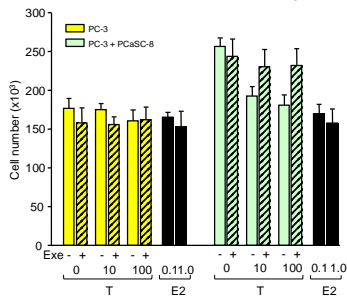


図 3

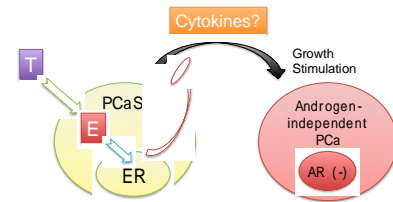


図 4

さらに前立腺癌由来間質細胞でのアンドロゲン生合成の流れを明らかにするために、LNCaP と間質細胞との共培養において、DHEA, androstenediol, androstenedione, testosterone を基質として加え、24 時間後の代謝産物を LC-MS/MS で測定したところ、3 β -HSD は DHEA を Adione にしか変換せず、17 β -HSD は Adione を T にも変換するが、T を Adione に代謝する作用の方が強いことが判明した。(図 5)

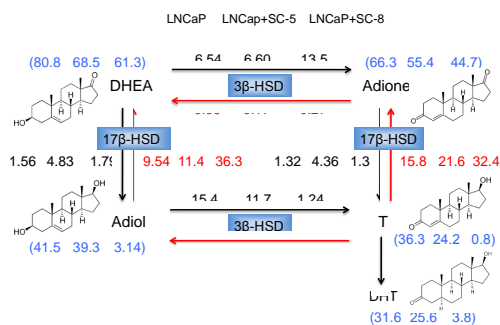


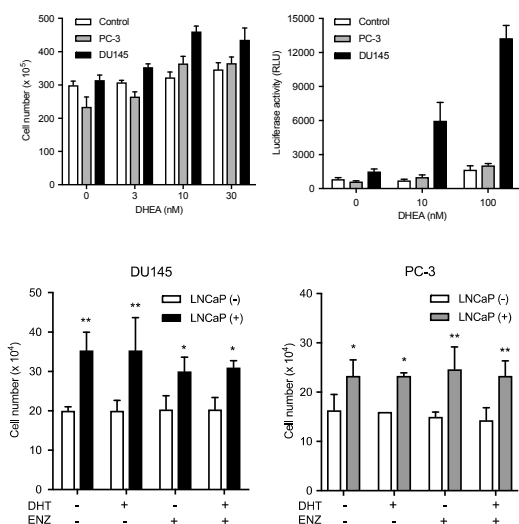
図 5

癌組織内での微小環境研究するとき、しばしば、癌細胞と間質細胞との相互作用を研究することが多い。今回、その相互作用だけでなく、癌細胞間の相互作用が前立腺癌の増殖や浸潤能に影響を与えているという仮説のもとに研究を行った。

【方法】アンドロゲン感受性前立腺癌細胞 LNCaP を PSA promoter で drive される luciferase reporter で transfect し、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞 DU145 または PC-3 と供培養を行い、培地に DHEA を添加し、PSA promoter 活性を測定した。また供培養に DHEA を添加して 24 時間後の各種アンドロゲンの濃度を LC-MS/MS で測定した。また供培養に DHT を添加して LNCaP の PSA promoter 活性も測定した。次に LNCaP と DU145 または PC-3 と供培養し、増殖、遊走能、浸潤能の変化を観察した。

【結果】DHEA は DU145 で testosterone や DHT に変換され、LNCaP での PSA promoter 活性を誘導したのに対して、PC-3 ではその効果は認められなかった。また DHT を供培養に添加すると DU145 はその活性を増強させたが、PC-3 ではむしろ減弱した。DU145 は DHEA や DHT による作用を増強させ、LNCaP の増殖を促進したが、PC-3 では増強作用は観察されなかった。逆に LNCaP は DU145 と PC-3 の増殖を促進した。遊走能に関しては、PC-3 は LNCaP を促進したが、DU145 では明確ではなかった。逆に LNCaP は PC-3 の遊走能を促進したが、DU145 ではむしろ抑制された。また、浸潤能に関しても同様で、LNCaP は PC-3 を促進したが、DU145 ではむしろ抑制された。

【結論】アンドロゲン感受性前立腺癌細胞と非依存性細胞は、互いにクロストークし合い、増殖や遊走能、浸潤能を調節することが示唆された。



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 2 件)

Machioka, K., Mizokami, A., Yamaguchi, Y., Izumi, K., Hayashi, S. and Namiki, M. Active Estrogen Synthesis and its Function in Prostate Cancer-derived Stromal Cells. Anticancer Res:35.221-7 (2015)

<http://ar.iiarjournals.org/content/35/1/221.long> 査読有

Kim, J, Mizokami A, Shin, M, Izumi, K, Konaka, H, Kadono, Y, Kitagawa, Y, Keller, E. T., Zhang, J. and Namiki, M. SOD3 acts as a tumor suppressor in PC-3 prostate cancer cells via hydrogen peroxide accumulation. Anticancer Res:34. 2821-31 (2014)

<http://ar.iiarjournals.org/content/34/6/2821.long> 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

アンドロゲン感受性前立腺癌細胞と非感受性前立腺癌細胞のクロストーク. 武澤 雄太、溝上 敦、泉 浩二、並木 幹夫 第 75 回日本癌学会(2016 年 10 月 6-8 日 横浜)

Crosstalk of androgen sensitive prostate cancer cells and insensitive prostate cancer cells. Takezawa Yuta, Mizokami Atsushi, Machioka Kazuaki, Izumi Kouji, Iwamoto Hiroaki, Aerken Maolake, Ariunbold Natsagdorj, and Namiki Mikio 2016 AACR Annual Meeting (2016 Apr 16-20 New Orleans, USA)

去勢抵抗性前立腺癌の女性ホルモン産生能とテストステロン補充療法の可能性. 溝上 敦、泉 浩二、山口ゆり、林慎一、並木幹夫 第 22 回ステロイドホルモン学会(2014 年 11 月 3 日 福岡)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: アンドロゲン依存性又は非依存性前立腺癌細胞の抑制用の組成物及びそれを含有する前立腺癌の医薬製剤

発明者: 溝上 敦、後藤 享子、武澤雄太、泉 浩二

権利者: 金沢大学

種類: 特許権

番号: 特願 2016-063542

出願年月日: 平成 28 年 3 月 28 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

並木 幹夫 (NAMIKI, Mikio)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 70155985

(2) 研究分担者

溝上 敦 (MIZOKAMI, Atsushi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50248580

泉 浩二 (IZUMI, Kouji)
金沢大学・医学系・特任助教
研究者番号：80646787