

平成 2 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390379

研究課題名（和文）前立腺癌の増殖・再燃に関わる分子機序の解明と再燃に対する総合的治療戦略の構築

研究課題名（英文）Solution of the molecular mechanism about proliferation / recurrence of the prostate cancer and the architecture of the comprehensive treatment strategy for the prostate cancer

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） 12,400,000 円、（間接経費） 3,720,000 円

研究成果の概要（和文）：前立腺組織と前立腺癌組織でのcDNA microarrayを行い、癌組織で発現の減弱している遺伝子としてSOD3を同定した。SOD3の発現減弱が癌の増殖や浸潤に関わっていることを明らかにした。また、細胞外マトリックスSPARCに注目した。SPARCは正常間質細胞より癌細胞由来間質細胞で発現が減弱し、AKTリン酸化を阻害することにより癌細胞の増殖や遊走能を抑制した。さらにインテグリン $\beta 1$ を受容体として癌細胞に作用していた。また、植物フラボノイドの2'-hydroxyflavanoneが前立腺癌に対して抗腫瘍効果を示し、アンドロゲン受容体の活性を阻害することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We performed cDNA microarray analysis with normal prostate tissue and the prostate cancer tissue, and identified SOD3 as the gene which the expression attenuated with prostate cancer tissue.

We revealed that expression diminishment of SOD3 was associated with proliferation of prostate cancer, migration, and invasion. Also, we paid attention to extracellular matrix SPARC. Expression of SPARC attenuated with prostate cancer-derived stromal cells than normal stromal cells, and inhibited a proliferation and the migration of the cancer cells by inhibiting AKT phosphorylation. SPARC acted on cancer cells via integrin $\beta 1$ as a receptor. Also, 2'-hydroxyflavanone which is the plant flavonoid showed antitumor effect for prostate cancer via apoptosis, and revealed that 2'-hydroxyflavanone inhibited androgen receptor activity, but did not inhibit androgen synthesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 SOD3 SPARC フラボノイド

1. 研究開始当初の背景

我が国では前立腺癌の罹患率、死亡率とも増加を示している。このため、発癌予防と癌死を招く進行性前立腺癌の治療の進歩が期待されている。罹患率上昇の一因として食文化の欧米化、特に動物性脂肪摂取の増加が挙げられている。脂肪はエネルギー代謝時に過酸化脂質や過酸化脂質ラジカルに変換され、これらの活性酸素が DNA を傷害し、発癌を誘導すると推測されているが、詳細な発癌機序は不明な点が多く、活性酸素に関与する様々な遺伝子の解明が期待されている。一方、進行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ため、この前立腺癌の去勢抵抗性は克服すべき重要課題である。したがって、前立腺癌の増殖・再燃に対する治療戦略を考える場合、基礎研究においてこれらの発癌、増殖、再燃の分子機序を明らかにすることが極めて重要である。

前立腺癌の去勢抵抗性への変化の機序は、大別して、(1)再燃しても AR がまだ十分な機能を果たしてアンドロゲン高感受性の癌細胞となり、低濃度のアンドロゲン環境に適応する adaptation と、(2) AR とは無関係な細胞が増殖をしてしまう clonal selection がある。しかし、adaptation の機序の多くは不明である。我々は DHT がホルモン療法後でも 20% は前立腺癌局所に残存していることを示した (業績 Cancer Res, 64:765-71, 2004)

(Intracrine のアンドロゲン合成)。さらに癌由来間質細胞も癌細胞と共に副腎性アンドロゲン DHEA を活性型 DHT に変換することを示し、癌細胞の微小環境もアンドロゲン合成に重要な役割を果たすことを報告した。

去勢抵抗性前立腺癌に有効な DHEA 合成酵素阻害剤 abiraterone, TAK-700 等の新薬開発の背景には、このような基礎研究の成果がある。一方、再燃時に癌細胞が clonal selection のようになる場合には、様々な発癌遺伝子、増殖因子などが関与していると考えられる。最近特に注目されているのが EMT である。癌由来間質細胞からも様々な因子が放出され、癌細胞を間質様細胞に変化させる (EMT) ことで、癌細胞が浸潤能の獲得や悪性化への変化をもたらす可能性がある。

また、再燃時、骨転移部位の悪化の原因として骨に存在する細胞から分泌される様々な増殖因子、サイトカインの関与がある。骨で EMT が生じ、前立腺癌細胞にとって増殖しやすい環境が出現している可能性がある。前立腺癌の発癌、去勢抵抗性の機序、間質細胞の影響、副腎性アンドロゲンの再燃への関与、EMT の機序、骨転移巣での増殖、抗癌剤耐性の機序に関する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・増殖に関与する因子の同定

前立腺癌の発癌にも**活性酸素**が関与し、発癌を誘導する可能性がある。我々は現在、正常前立腺組織と前立腺癌組織にて cDNA microarray を行うことにより、発現レベルの異なる遺伝子を同定しつつある。その中で活性酸素に関与する様々な遺伝子のうち、ある遺伝子の発現が正常と癌で大きく発現が異なることを確認している。この遺伝子の発現状態を前立腺癌組織で確認、発癌への関与、癌の増殖への影響も調べる。

B) 前立腺癌間質細胞での副腎性アンドロゲンの代謝

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、この現象が他の前立腺癌細胞や、多くの前立腺癌患者からの検体から樹立した間質細胞との共培養においても成立するかどうかを確認する。さらに DHEA から DHT に変換する能力と予後との関係を明らかにする。

C) 前立腺癌組織、骨転移巣での微小環境の前立腺癌の増殖、浸潤、EMT への影響

前立腺癌組織、あるいは骨転移巣での**微小環境**がどのように前立腺癌の増殖、浸潤、EMT に影響を及ぼしているかを調べるため、正常前立腺間質細胞と前立腺癌由来間質細胞、さらに骨由来間質細胞を様々な角度から比較する。

3. 研究の方法

前立腺癌の発癌に関しては、活性酸素の制御に関与する遺伝子の発現状況、増殖に及ぼす影響を検討するほか、正常前立腺組織と前立腺癌組織で発現の異なる遺伝子の同定、機能解析を行う。再燃の機序には様々な因子が関与しているが、正常前立腺間質細胞、癌由来間質細胞、骨由来間質細胞の培養を行い、これらの細胞での遺伝子発現の違い、前立腺癌細胞の増殖、EMT、AR の活性に与える影響を調査する。また、これらの間質細胞を用いて、副腎性アンドロゲンの代謝がそれらの細胞でどのように行われているかも研究する。さらにホルモン非依存性となりかつ抗癌剤耐性となる機序の解明、抗癌剤耐性化後の治療法の開発も行う。これらの研究で得られた成果をもとに、発癌予防法の確立や、癌細胞だけでなく、癌細胞の周囲の微小環境を含めた前立腺癌再燃に対する治療戦略を構築する。

4. 研究成果

A) 前立腺癌の発癌・増殖に関与する因子の同定

正常前立腺組織と前立腺癌組織から得られた RNA を用いて cDNA microarray analysis を行うことにより、発現レベルの異なる遺伝子を同定した。その中で活性酸素に関与する様々な遺伝子のうち、Superoxide Dismutase 3 (SOD3) の発現が正常と比べ、前立腺癌で発現が減弱していることを確認した。Tissue microarray を用いた前立腺組織での SOD3 の免疫染色では、前立腺癌の悪性度と SOD3 の発現には関連性は認められなかったものの、正常前立腺組織に比べ、優位に前立腺癌組織

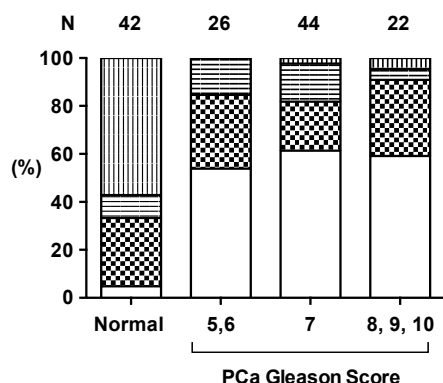


Fig. 1 Tissue microarrayを用いた正常前立腺と前立腺癌組織でのSOD3 発現レベル

での発現が減弱していることが観察された。SOD1 と SOD2 はアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞 PC-3 において発現が認められたが、SOD3 は PC-3 ではほとんど発現がなかったため、PC-3 細胞に SOD3 強制発現させ (PC-3/SOD3)、PC-3 細胞の character の変化を観察した。PC-3/SOD3 は O_2 から H_2O_2 への変換を亢進させた。この PC-3/SOD3 は PC-3 と比較し、増殖、遊走能、浸潤能が抑制され、癌抑制遺伝子として作用していることが示唆

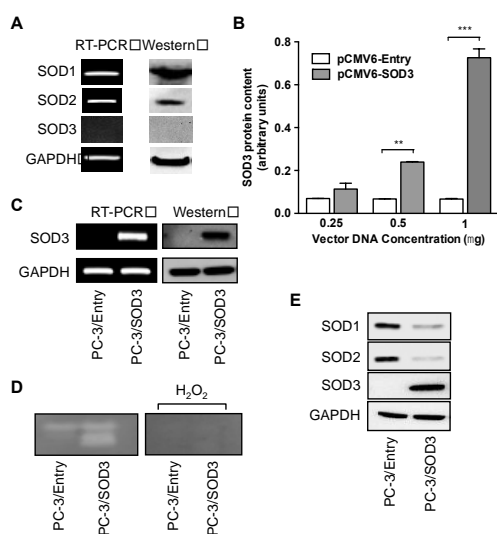


Fig. 2. Superoxide dismutases (SODs) and stable transfection of SOD3 in PC-3 cells. A: mRNA and protein expression of endogenous SODs in PC-3 cells.

された。

浸潤能に関しては、SOD3 が MMP2, MMP9

の発現を抑制し、それらの活性を制御してい

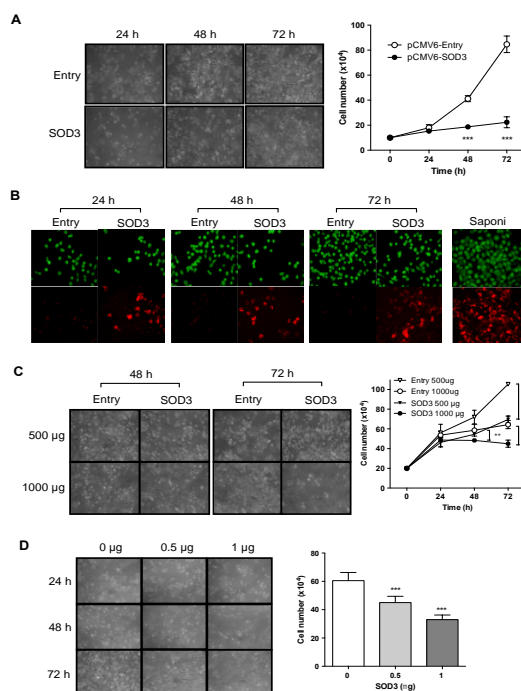


Fig. 3. Effect of superoxide dismutase 3 on cell proliferation of PC-3 cells. □

ることが確認された。

さらに、PC-3/SOD3 から得られた conditioned media を PC-3 に添加すると、PC-3 の増殖、遊走能、浸潤能が抑制され、SOD3 組み換えタンパク質を PC-3 に加えることによっても増殖、遊走能が抑制されることを明

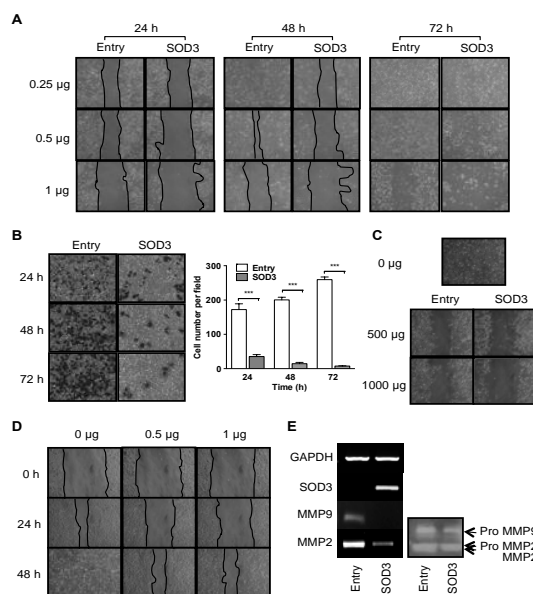


Fig. 4 Effect of superoxide dismutase 3 on cell migration and invasion in PC-3 cells.

らかにした。

これらの SOD3 の作用は、単に SOD3 過剰発現による O_2 から H_2O_2 への変換の亢進によるだけでなく、SOD3 過剰発現が catalase 発現を減弱させ、GSH/GSSG ratio を減弱させることにより、 H_2O_2 がさらに細胞に蓄積するように働き、細胞内の DNA ダメージを誘導することで生じていることを明らかにした。以上

のことで、SOD3 が tumor suppressor gene として前立腺癌の増殖、遊走能、浸潤に抑制的に作用し、治療に応用できる可能性が示唆された。

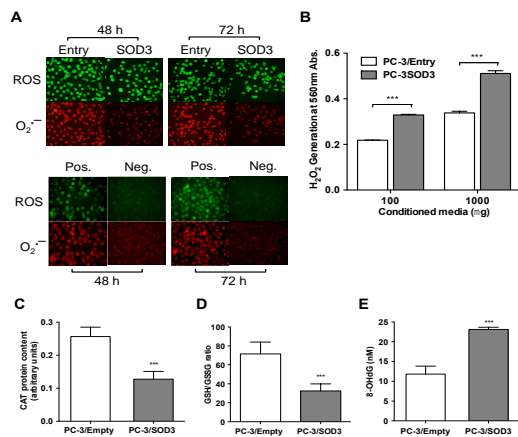


Fig. 5. Effect of superoxide dismutase 3 on reactive oxygen species and H_2O_2 production by PC-3 cells.

B) 前立腺癌組織での微小環境の前立腺癌の増殖、浸潤への影響

SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteine/Osteonectin/BM-40)は、細胞増殖、遊走能、細胞分化、免疫応答などと関連して可逆的な相互作用を調整している細胞外マトリックス糖蛋白である。癌においては、SPARC は他の細胞外マトリックスと相互作用し、腫瘍細胞の成長、分化、転移と浸潤と関係していると言われている。しかし、前立腺癌における SPARC の役割はまだ十分には明らかになっていない。今回、我々は前立腺癌における SPARC の発現レベルと SPARC が前立腺癌の進行にどのように影響を及ぼすかについて調査した。

SPARC は正常前立腺より前立腺癌で発現が減弱していた。

Clinicopathological features	SPARC expression			Total number	
	(-)	(+)	(++)		
Normal	1	2	19	22	P<0.001
PIN	2	3	5	10	
Gleason score					
5, 6	7	2	1	10	P<0.001
7	28	2	0	30	P<0.001
8, 9, 10	23	1	0	24	P<0.001
Total number	61	10	25	96	

Table 1 Immunohistochemistry of SPARC on prostate tissue microarray

正常前立腺間質細胞 (PrSC)、前立腺癌由来間質細胞 (PCaSC) と前立腺癌細胞での発現を ELISA や Western blotting で調べると、前立腺癌細胞では発現が低だけでなく、PrSC より PCaSC で発現が減弱していた。

PCaSC からの発現の減弱した SPARC が前立腺癌細胞で果たす役割を明らかにするために、癌細胞内の AKT シグナルに着目した。SPARC を前立腺癌細胞に添加し、Western blotting にて AKT の発現、リン酸化 (活性化) を調査すると、SPARC は AKT の発現には影響を与えなかったが、AKT のリン酸化を阻害した。また間質細胞

と前立腺癌細胞を共培養すると、癌細胞内での AKT のリン酸化が阻害されたが、この阻害効果は PrSC で最も強く、PCaSC では阻害効果は減弱した。PrSC での SPARC の発現を SPARC siRNA を用いてノックダウンして前立腺癌細胞と共培養すると、前立腺癌細胞内での AKT のリン酸化阻害が減弱した。つまり、間質細胞が前立腺癌細胞の AKT リン酸化を抑制する機序に SPARC が関与していることが示唆さ

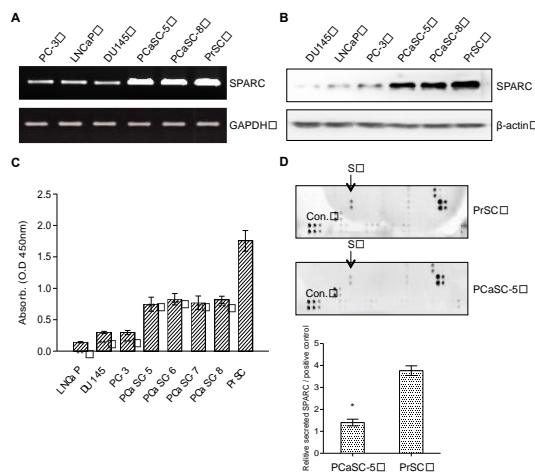


Fig. 2 Increased SPARC expression in PrSC (Prostate-derived stromal cells).

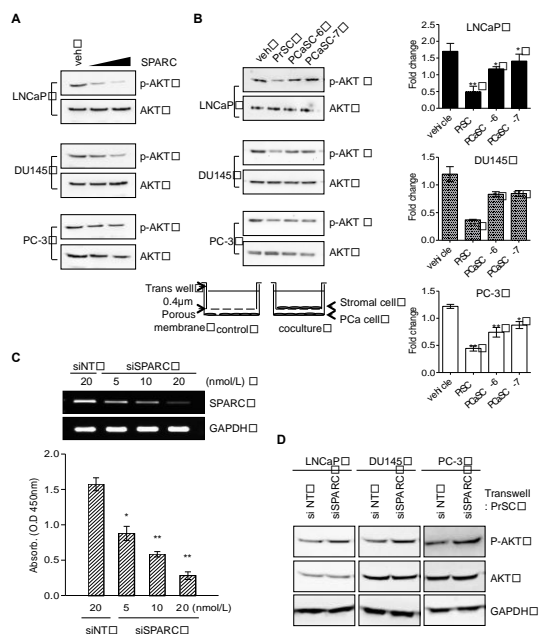


Fig. 3 Inactivation of AKT by exogenous SPARC.

れた。

Integrin は細胞表面タンパク質で、細胞外マトリックスからの情報伝達に参与する細胞接着分子で、鎖と β 鎖の 2 つのサブユニットからなるヘテロダイマーである。細胞外マトリックスの一つである SPARC が integrin とどのような相互作用をしているのかを調査した。まず、SPARC を前立腺癌細胞への添加により integrin $\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2$ の発現を調べると、integrin $\beta 1$ の発現のみが亢進した。次に、免疫沈降法を用いて SPARC と integrin $\beta 1$ との相互作用

用を調べると、SPARC と integrin $\beta 1$ は直接結合していることが確認された。さらに、前立腺癌細胞に integrin $\beta 1$ 中和抗体を加えると、その結合は阻害され、AKT のリン酸化が亢進した。以上より、SPARC の前立腺癌細胞に対する作用は integrin $\beta 1$ に直接作用することによって AKT のリン酸化を抑制することが明らかとなった。

最後に、我々は SPARC が前立腺癌細胞の増殖や遊走能に及ぼす影響について調査した。SPARC を前立腺癌細胞に添加すると細胞増殖は阻害された。このとき integrin $\beta 1$ 中和抗体を同時に加えると、阻害作用は減弱した。また前立腺癌細胞の遊走能を wound healing assay で調べたところ、SPARC は増殖と同様に遊走能を抑制し、これは integrin $\beta 1$ 中和抗体により減弱した。

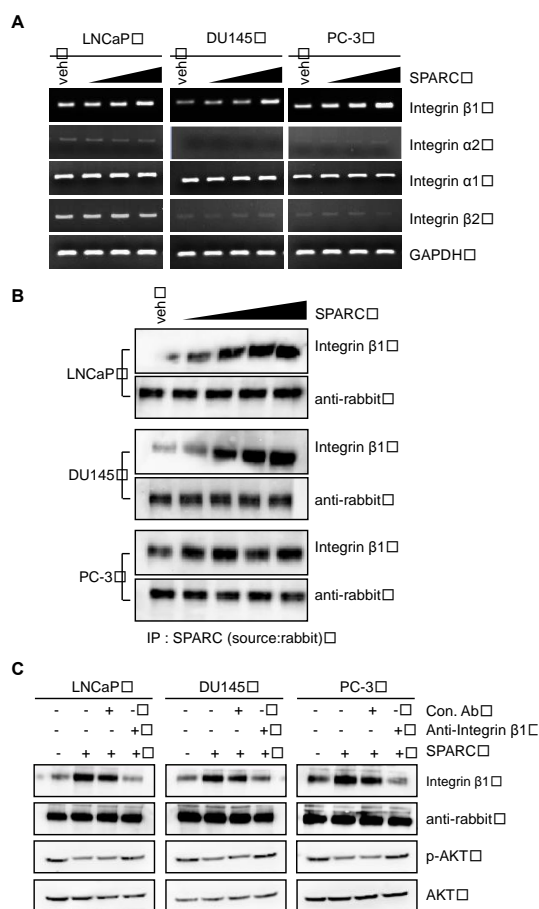


Fig. 4 Interaction of SPARC with integrin $\beta 1$

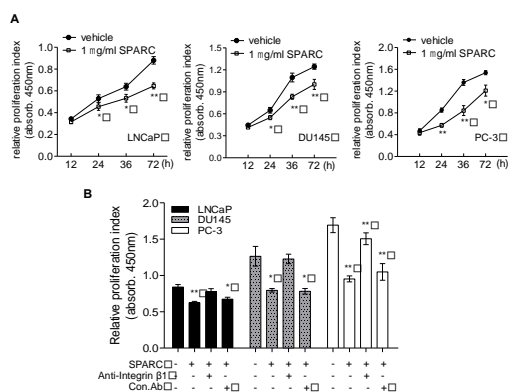


Fig. 5 Effect of exogenous SPARC on proliferation of Prostate cancer cells

C) 前立腺癌再燃に及ぼす副腎性アンドロゲンの影響

進行前立腺癌に対する治療はアンドロゲン除去療法が第一選択であるが、前立腺癌の多くは最終的にホルモン療法抵抗性前立腺癌(CRPC)となる。しかし CRPC においてもアンドロゲンは増殖に関与しており、なかでも副腎性アンドロゲンと HSD17B を介したテストステロン合成経路が注目されている。

植物中に含まれるフラボノイドは様々な生物学的活性を示す。2'-ヒドロキシフラバノン(2' HF)はフラバノンの一種で in vitro で HSD17B 作用を強く抑制すると報告されていることから、テストステロン合成を抑制して前立腺癌の増殖を抑制する効果が期待される。これまで前立腺癌に対する 2' HF の抗腫瘍効果の報告はないことから、今回我々は前立腺癌に対する抗腫瘍効果とアンドロゲン受容体(AR)に及ぼす影響について研究した。

【結果】2' HF は濃度依存性に DU145 と PC3 の増殖を抑制しアポトーシスの誘導がみられた。一方 LNCaP では弱い濃度依存性増殖抑制効果がみられるも、テストステロンと DHT による増殖促進効果を抑制する作用が強いことが確認された。またアポトーシスの誘導を確認できなかった。2' HF は adione や DHT 存在下でも LNCaP 中の PSA mRNA 発現を濃度依存性に抑制することを RT-PCR にて確認した。これらより 2' HF の増殖抑制効果はテストステロン合成阻害以外の作用機序の存在が示唆された。

2' HF による前立腺癌細胞 AR 活性変化

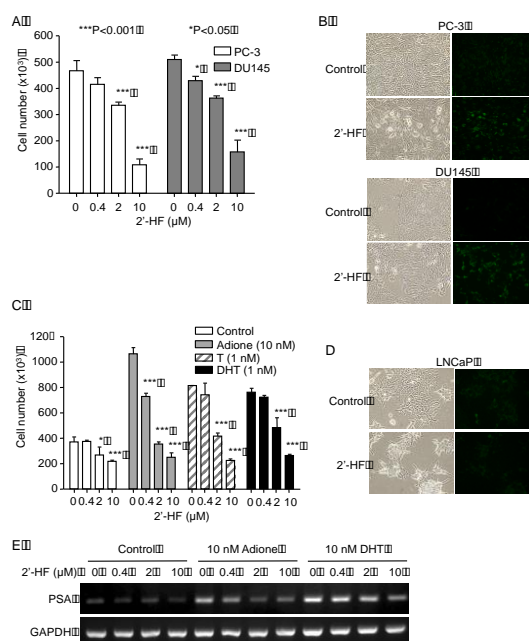


Figure 1 Effect of 2'-HF on the proliferation of PC-3, DU145, and LNCaP cells.

の有無をルシフェラーゼを使用したアンドロゲンにより誘導される PSA プロモーター活性変化をみることで検討した。adione、

テストステロン、DHT に誘導された PSA プロモーター活性は 2' HF により濃度依存性に抑制されることを確認した。

また PC3 培養液中に 2' HF を加えても adione、テストステロン、DHT 濃度変化がみられないことが LC-MS/MS にて確認されたことから、2' HF は in vitro において HSD17B および 5 α リダクターゼ活性変化をきたさないと考えられた。

2' HF による AR 活性抑制作用機序を解明するため、RT-PCR にて AR mRNA 発現を、ウェスタンブロットにて AR タンパク発現変化の有無を確認した。この結果 2' HF は AR mRNA に変化を与えないにもかかわらず AR タンパクの発現を濃度依存性に抑制していることがわかった。

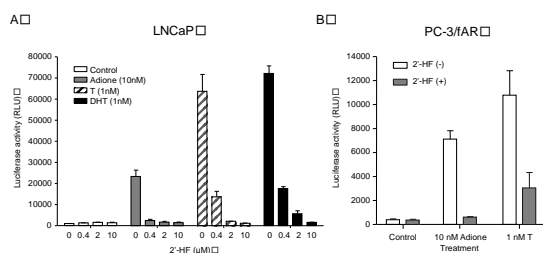


Figure 2 Effect of 2'-HF on AR activity in PCa cells. □

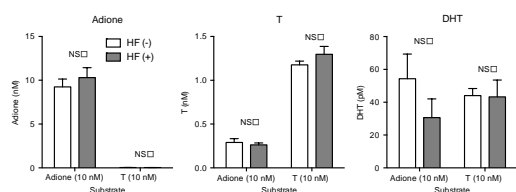


Figure 3 Androgen biosynthesis from Adione or T in PC-3 cells. □

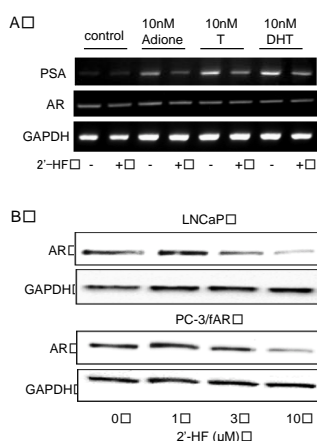


Figure 4 Effect of 2'-HF on PSA and AR mRNA and protein expression. □

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)

- ① Shin M, Mizokami A, Kim J, Ofude M, Konaka H, Kadono Y, Kitagawa Y, Miwa S, Kumaki M, Keller ET, Namiki M.

Exogenous SPARC suppresses proliferation and migration of prostate cancer by interacting with integrin beta1. Prostate 2013;73(11): 1159-1170 (doi: 10.1002/pros.22664) 査読有

- ② Ofude M, Mizokami A, Kumaki M, Izumi K, Konaka H, Kadono Y, Kitagawa Y, Shin M, Zhang J, Keller ET, Namiki M. Repression of cell proliferation and androgen receptor activity in prostate cancer cells by 2'-hydroxyflavanone. Anticancer Res 2013;33(10):4453-4461. 査読有
(URL: <http://ar.iiarjournals.org/content/33/10/4453.full.pdf+html>)

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① SOD3 Overexpression Inhibits Growth and Migration in PC-3 Human Prostate Cancer Cells. Jungim Kim et al. 泌尿器分子細胞学会、2014. 3. 14-3. 15、ホテルメトロポリタン山形 (山形市)
- ② SPARC Suppresses Proliferation and Migration of LNCaP Human prostate cancer cell. Shin M et al. 日本泌尿器科学会総会、2012. 4. 21-24、パシフィコ横浜 (横浜市)

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・准教授
研究者番号: 50248580

角野 佳史 (KADONO Yoshifumi)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号: 10397218

三輪 聡太郎 (MIWA Sotarou)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号: 80507070

東 達也 (HIGASHI Tatsuya)
東京理科大学・薬学部薬学科・教授
研究者番号: 90272963