第 13 回
関東ホルモンと癌研究会
組織内内分泌とホルモン依存性癌の最前線

抄 録 集

— 日 時 —

平成 25 年 2 月 2 日(土)14:00～17:45

— 会 場 —

高崎ビューホテル 3階 あかぎ

共 催

関東ホルモンと癌研究会
武田薬品工業株式会社

組織内内分泌とホルモン依存性癌の最前線

抄 録 集

**第 13 回
関東ホルモンと癌研究会**

プログラム

開会の辞	14:00-14:05
当番幹事 鈴木 和浩 群馬大学大学院医学系研究科泌尿器科学	
基調講演	14:05-15:05
『乳癌と前立腺癌の腫瘍内ホルモン合成代謝動態 ” Intracrinology” の類似点と相違点』	
座長：鈴木 和浩 群馬大学大学院医学系研究科泌尿器科学	
演者：笹野 公伸 東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理病態学講座	
ポスター発表	15:05-15:50
閲覧	15:05-15:30
自由討論	15:30-15:50

1. 乳癌細胞におけるホルモン治療薬耐性獲得に關与する新規遺伝子群の機能的スクリーニング

氏平崇文^{1, 2}、池田和博¹、堀江公仁子¹、竹田 省² 井上 聡^{1, 3}

¹埼玉医科大学ゲノム医学研究センター遺伝子情報制御部門

²順天堂大学医学部産婦人科学教室

³東京大学大学院医学系研究科抗加齢医学講座

2. メトホルミンによるIGF-1/IGF-1Rシグナルを介した前立腺癌増殖抑制効果

加藤春雄、関根芳岳、宮澤慶行、古谷洋介、小池秀和、鈴木和浩

群馬大学大学院医学系研究科泌尿器科学

3. ABCA1 を介した HDL による前立腺癌増殖機構の解明

関根芳岳^{1, 2}、古谷洋介¹、小池秀和¹、松井 博¹、鈴木和浩¹、

Alan T. Remaley²

¹群馬大学大学院医学系研究科泌尿器科学、²Lipoprotein Metabolism Section, Pulmonary and Vascular Medicine Branch, NHLBI, National Institutes of Health

4. 前立腺周囲脂肪組織におけるアンドロゲン合成の可能性

新井誠二¹、柴田康博¹、本間誠次郎²、鈴木和浩¹

¹群馬大学大学院医学系研究科泌尿器科学、²あすか製薬メディカル

5. LH-RHアゴニストによる前立腺癌患者の血清副腎性アンドロゲン濃度の低下

西井昌弘¹、野村昌史¹、関根芳岳¹、小池秀和¹、松井 博¹、

柴田康博¹、羽鳥基明¹、伊藤一人¹、小山徹也²、鈴木和浩¹

¹群馬大学大学院医学系研究科泌尿器科学

²群馬大学大学院医学系研究科病理診断学

6. LDL 受容体を介したスタチンの前立腺癌細胞増殖抑制機構

古谷洋介、関根芳岳、小池秀和、松井博、鈴木和浩

群馬大学大学院医学系研究科泌尿器科学

7. 前立腺癌の内分泌療法において、下垂体-副腎内分泌軸はアンドロゲン応答性カリクレインの調節と関連がある

星井達彦

新潟大学大学院医歯学総合研究科腎泌尿器病態学分野

8. アンドロゲン抑制療法は前立腺癌組織内でのアンドロゲン代謝産物からのデヒドロテストステロン合成を促進する

石崎文雄^{1, 2}、武田啓介¹、瀧澤逸大¹、山名一寿¹、星井達彦¹、原昇¹、

川崎隆³、宮代好通⁴、内藤真⁵、西山勉¹、高橋公太¹

¹新潟大学大学院腎泌尿器病態学分野、²長岡赤十字病院泌尿器科

³新潟県立がんセンター新潟病院病理部、⁴あすか製薬

⁵新潟大学大学院分子細胞病理学分野

9. 宿主側の EBAG9 欠損は腫瘍免疫の増強を介して in vivo での泌尿器がん腫瘍増殖を抑制する

宮崎利明¹、池田和博¹、堀江公仁子¹、井上聡^{1, 2}

¹埼玉医大ゲノム医学研究センター遺伝子情報制御部門

²東京大学大学院医学系研究科抗加齢医学講座

10. 去勢抵抗性前立腺癌において PI3K-Akt-mTOR シグナル経路の制御はドセタキセル抵抗性を改善させる

安水洋太、宮嶋哲、小坂威雄、宮崎保匡、菊地栄次、大家基嗣

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室

コーヒーブレイク

15:50-16:05

シンポジウム：各科領域における組織内内分泌とホルモン依存性癌 16:05-17:35

座長：大家 基嗣 慶應義塾大学医学部 泌尿器科学教室

演題 1 前立腺癌と組織内アンドロゲン

柴田 康博 群馬大学大学院医学系研究科泌尿器科学

演題 2 子宮内膜癌の発癌・増殖機構におけるエストロゲンの作用の検討

宮本 強 信州大学医学部産科婦人科学教室

演題 3 乳癌内分泌療法における組織内内分泌と治療効果

武井 寛幸 埼玉県立がんセンター乳腺外科

研究奨励賞授与、閉会の辞

17:35-17:45

情報交換会（2階 みょうぎ）

17:50-

基 調 講 演

乳癌と前立腺癌の腫瘍内ホルモン合成代謝動態

” Intracrinology ” の類似点と相違点

【演者名・所属】

笹野公伸

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理病態学講座

前立腺癌の大部分の症例は組織学的分化度に関わらずアンドロゲン受容体陽性であり、乳癌でも 70%以上の症例でエストロゲン受容体が癌細胞で発現している。このようにこの両者は性ステロイド依存性腫瘍の代表として位置づけられている。両者共に血中の生物学的活性の低い前駆体性ステロイドホルモンを前立腺癌では 5 α -reductase により、乳癌ではアロマターゼにより活性の高いステロイドに転換して作用するいわゆる” Intracrin ” 機構がその発生、進展の過程で極めて重要な役割を果たしている。このようにこれら二つの腫瘍は男性ホルモン、女性ホルモンの違いはあるものの性ステロイド依存性腫瘍として多くの性質を共有している。しかし同時に少なからぬ差異がホルモン作用機序で認められる事も又事実である。閉経期以降の女性では血中のエストロゲン濃度がほとんどなくなり、乳癌細胞のエストロゲン依存性増殖に必要なホルモンは殆どが血液中の副腎皮質に由来する男性ホルモンを乳癌組織の間質、癌細胞双方に認められるアロマターゼによりエストロゲンに転換させる事で供給されている。この為閉経期以降の乳癌の内分泌療法は腫瘍局所でのエストロゲン合成を如何にして制御させるのかが重要となり、アロマターゼ阻害剤はこの点で臨床的に有効な治療成績をあげている。一方前立腺癌では癌組織内で 17 β hydroxysteroid dehydrogenase V によるテストステロン、5 α reductase による DHT の産生等の intracrine 機構は重要な役割を果たしているが、血液中のテストステロン他の男性ホルモン値は女性程年齢により劇的に低下する訳ではない。この為前立腺癌細胞のアンドロゲン受容体に結合して作用する男性ホルモンは局所で合成されるものよりも血中に由来するホルモンの比率が相対的に高くなる。このようなことから前立腺癌の内分泌療法としては、如何にして血中の男性ホルモン濃度を低下させるのかに主体がおかれる。本講演ではこのような前立腺癌と乳癌の腫瘍局所内の性ステロイドホルモン合成、代謝の差異に関して触れる事とする。

メモ

シンポジウム

前立腺癌と組織内アンドロゲン

【演者名・所属】

柴田康博

群馬大学大学院医学系研究科泌尿器科学

前立腺組織内のステロイドホルモン定量は、その存在が微量であることや組織夾雑物の影響、また従来用いられていた RIA 法で問題となる抗体の交差反応性などにより、微量組織での正確な定量が困難であったが、近年液体クロマトグラフィー-タンデムマススペクトルメトリー (LC-MS/MS) の分析手法を用いることにより、正確で高感度な定量が可能となってきた。この手法を用いることにより、同一組織内の複数ホルモンを同時に定量でき、組織内ホルモンのプロファイルを知ることが可能である。現在ではかなりの高感度で組織内ホルモンの検出が可能で、前立腺組織内アンドロゲンについては針生検組織程度の微量組織での解析が可能であり、今後前立腺組織内アンドロゲンと前立腺疾患の関係が明らかになっていくことが期待される。

精巣（および副腎）で産生された主たる血中アンドロゲンであるテストステロン (T) は前立腺に取り込まれ、組織内の 5α 還元酵素の働きにより活性の強いジヒドロテストステロン (DHT) に変換されて、前立腺の増殖、機能維持に関与している。このため、前立腺組織内のアンドロゲン構成は DHT が T の 5-10 倍程度の濃度で存在し、血中とは大きく異なっている。組織内の酵素活性は、組織構成、加齢、炎症、嗜好などの諸因子により個体差があることが容易に推察され、組織内アンドロゲンの評価が前立腺癌の診断・治療に有用な情報となる可能性がある。我々はこの点について、前立腺組織内ホルモン濃度と前立腺疾患の関係について検討を行ってきた。良性疾患の前立腺肥大症については、加齢による組織内エストロゲン/アンドロゲン濃度比の上昇が前立腺肥大症と関連していることを明らかにした¹。前立腺癌では、ホルモン無治療前立腺全摘分割標本で、同一個体では癌を含む組織と癌のない組織でアンドロゲン濃度に有意差がないことを確認した上で、臓器内ホルモン均一仮説下に前立腺生検組織 1 本でのアンドロゲン定量の有用性について検討した。その結果、前立腺組織内 T/DHT 濃度比が癌症例で高く、非癌症例で低いことが明らかとなった。診断的価値は PSA などのマーカーを上回るものではなかったが、生物学的には非常に興味深い結果であった。また T/DHT は治療前 PSA 値や Gleason score などと相関しており、癌の悪性度と関係していることが推察さ

れた。さらにアンドロゲン除去療法（ADT）を受けた症例について一定期間フォローアップし、去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）を来した症例とホルモン感受性癌（HDPC）にとどまった症例について、治療前組織内アンドロゲン濃度との関係を検討した。その結果、CRPC 患者では HDPC 患者に比較して組織内の T 濃度が高く、DHT 濃度が低く、T/DHT が有意に高かった。このように組織内アンドロゲンの評価は前立腺癌の治療への反応性や、CRPC の予測に有用である可能性が考えられる。

近年では CRPC 組織ではアンドロゲン合成に関わる酵素の発現が増加しており、去勢下においても微量のアンドロゲンが増殖に関与することが明らかとなってきた²。活性アンドロゲン産生を抑える目的で、CYP17 阻害薬である Abiraterone acetate が臨床応用され有効性が報告されている。また同酵素の Lyase 阻害剤である TAK700 が良好な臨床試験成績を示しているようである。このことから、今後組織内の微量アンドロゲンは前立腺癌の診療戦略にますます重要な意味を持つと思われる。

文献

1. Shibata Y, Ito K, Suzuki K, et al. Prostate. 2000;42:45-55.
2. Locke JA, Guns ES, Lubik AA, et al. Cancer Res. 2008 ;68:6407-6415

メモ

子宮内膜癌の発癌・増殖機構における エストロゲンの作用の検討

【演者名・所属】

宮本 強

信州大学医学部産科婦人科学教室

子宮内膜癌（EC）はエストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）の発現率が高く、乳癌と並んで代表的なエストロゲン（E）依存性腫瘍とされる。我々はまず、ECのE依存性増殖機構について解析したところ、ER陽性の子宮内膜癌細胞株 Ishikawa において、Eは insulin like growth factor-1 (IGF-1)の産生・分泌を促進し、この IGF-1 が autocrine 的に作用し、MAPK 経路の活性化から cyclinD1 発現上昇を誘導し、増殖を促進することを見出した。一方、ECは血清E値の低下する閉経後の症例が多く、実際に当科の閉経後のEC症例の血清エストラジオール（E2）値 17.4 ± 12.4 pg/ml は、子宮頸癌症例の 11.9 ± 4.0 pg/ml に比較すると若干高値であるものの、E自体の値としては依然として低値である。低E状態でも増殖する因子として組織内E合成に関与するとされる aromatase の EC における発現を免疫染色で検討したところ、約70%のEC症例で陽性となることから、Eが腫瘍内で産生され、autocrine-paracrine 機構で EC 細胞に作用し、その増殖を促進している可能性が考えられる。

一方、発癌過程におけるEの関与に関して、正常内膜組織での aromatase 発現は陰性であり、一般的に高E環境が発癌を促進すると考えられている状況には矛盾する。そこで、ECの発癌過程に重要な役割を持つと考えられているミスマッチ修復（MMR）機構に対するEの関与に注目した。まず、血清E2値の明らかな非EC患者の増殖期内膜26症例の免疫染色では、腺上皮の MMR タンパク hMLH1, hMSH2 発現は E2 との強い相関を示し（hMLH1; $P=0.0058$ 、hMSH2; $P=0.0050$ ）、Ishikawa および培養子宮内膜腺上皮細胞（NEG）の Western blot でも hMLH1, hMSH2 タンパク発現は、E2 添加により用量依存的に増強し、ER 阻害剤 ICI182.780（ICI）添加により抑制されたことから、E2 は MMR タンパク発現を誘導すると考えられた。さらに M13mp2 phage の β -galactosidase 遺伝子にミスマッチ部を持った heteroduplex を用

い、細胞からの抽出タンパクによる MMR 活性を測定する in vitro MMR assay を行ったところ、Ishikawa、NEG とともに E2 用量依存的に MMR 活性が上昇し、 10^{-8}M の E2 添加時は非添加時に比べ Ishikawa で 1.5 倍、NEG で 2.8 倍に MMR 活性が上昇したが、この上昇は ICI182.780 添加によって抑制された。このことは、高 E 状態が MMR タンパク発現および活性を上昇させ子宮内膜の癌化抑制的に作用する可能性を示している。

次に我々は、血清 E2 値が比較的低値の症例で、Ki-67 陽性の増殖細胞にも関わらず、hMLH1 および hMSH2 発現が減弱し MMR 活性が低下していると考えられる腺上皮細胞が散見されることに注目した。NEG を E2 添加下に培養し、増殖マーカー、リン酸化 histone H3 (pH3) と hMLH1 か hMSH2 の 2 重蛍光免疫染色を行ったところ、pH3 陽性の増殖細胞のうち hMLH1、hMSH2 発現の減弱した細胞の割合は E2 濃度依存性に低下し (hMLH1; 10^{-12}M 44%, 10^{-8}M 13%、hMSH2; 10^{-12}M 12%, 10^{-8}M 2%)、さらに ICI182.780 の添加により増加した。このことは E2 が比較的低値の場合には増殖しなおかつ MMR 活性の低下したハイリスク細胞が増加し、癌化促進的に作用することが考えられた。

以上より、EC の E 依存性増殖には腫瘍局所で産生される E や IGF-1 等の因子の autocrine-paracrine が重要な役割を持つと考えられた。一方、高 E 状態は MMR 活性を上昇させ、むしろ子宮内膜の癌化抑制的に作用する可能性が考えられた。

メモ

乳癌内分泌療法における組織内内分泌と治療効果

【演者名・所属】

武井寛幸¹、山口ゆり²

¹埼玉県立がんセンター乳腺外科、²同臨床腫瘍研究所

乳癌の約70%を占める Estrogen receptor (ER)陽性乳癌では、古典的経路として estradiol (E2)-ER 複合体が DNA に結合し細胞増殖が促進される。内分泌療法はこの経路を遮断することで効果を発揮する。human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)などの増殖因子の経路を除外すると、内分泌療法の効果に影響を及ぼす因子は大別すると乳癌細胞の ER 発現強度、乳癌組織内の E2 濃度である。後者は閉経後乳癌または男子乳癌で腫瘍間質細胞の aromatase 活性の影響を強く受ける。共同演者の山口らの基礎的研究によると、乳癌間質線維芽細胞の ER-activating ability は症例ごとにばらつきがあり、ただし、閉経後で有意に高く、また低分化乳癌 (histological grade 3) で有意に低かった。

ER 陽性男子乳癌の再発症例で転移病巣の増悪に伴い血中 E2 濃度が 18 pg/ml から 892 pg/ml へ上昇したという報告があり、この血中の E2 は転移腫瘍組織で aromatase により産生され、血中へ移行したものである。このように血中 E2 濃度は whole body の aromatase 活性に強く影響を受け、単位組織量の aromatase 活性が一定と仮定した場合、body mass index (BMI) と相関する。自験例でも閉経後乳癌症例において血中 E2 濃度は BMI と正の関連性を有していた。

E2 の ER へ結合の競合的阻害剤である tamoxifen (TAM) は、ランダム化比較試験の meta-analysis により術後5年の内服により術後5年の乳癌再発率を閉経前で38%、閉経後で46%減少させる効果を有している。閉経後症例でより再発抑制効果が高いのは組織内 E2 濃度が閉経前に比べ閉経後で低いからとも考えられる。また、進行再発症例において、luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRH) を併用したほうが TAM 単独よりも高い有効性を示していることもこの理論を裏付ける結果と考えられる。

Aromatase inhibitor (AI) は組織内 E2 濃度を低下させる薬剤であり、閉経後症例において TAM より再発抑制効果が高い。nonsteroidal AI を用いた臨床試験から、BMI 高値例では AI の再発抑制効果が減弱するという結果が得られている。この理由として、BMI 高値例では whole body の aromatase 活性が高く

血中 E2 濃度については乳癌組織内 E2 濃度が AI により抑制されにくいのではないかと推論も可能である。

ただし、steroidal AI である exemestane (EXE) を用いた臨床試験では BMI と再発抑制効果との関連性は得られていない。興味あることに、EXE を用いた術前ホルモン療法臨床試験では腫瘍縮小効果が BMI 高値例で低値例に比べ高かった。また、TAM の効果においては BMI との関連性は得られていない。

組織内 E2 濃度や aromatase 活性の測定が日常診療では難しく、さらにそれぞれの内分泌療法の効果に及ぼす影響がまだ確立されていないことから、容易に計測が可能である BMI やそれに影響される血中 E2 濃度の内分泌療法の効果へ及ぼす影響を検討することは重要と思われる。その際、BMI や血中 E2 濃度と以下の項目との関連性、1) steroidal AI と nonsteroidal AI の効果の相違、2) SERM と AI の効果の相違などが検討されるべき重要な点である。これらが解決されることで、乳癌内分泌療法のさらなるテーラーメイド化が可能になるとと思われる。

メモ

ポ ス タ ー

乳癌細胞におけるホルモン治療薬耐性獲得に関与する 新規遺伝子群の機能的スクリーニング

【演者名・所属】

氏平崇文^{1, 2}、池田和博¹、堀江公仁子¹、竹田 省²、井上 聡^{1, 3}

¹ 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター遺伝子情報制御部門

² 順天堂大学医学部産婦人科学教室

³ 東京大学大学院医学系研究科抗加齢医学講座

乳癌の 70~80%はエストロゲン受容体陽性であり、これらの内分泌感受性癌に対してタモキシフェンなどの抗エストロゲン剤やアロマターゼ阻害剤を用いたホルモン療法が行われている。一方で、ホルモン療法耐性を獲得する乳癌への対応が問題となっている。例えば、タモキシフェン治療後の約 30%程度の患者が耐性を獲得して再発を引き起こすことが報告されている。乳癌におけるホルモン療法耐性獲得機序については未解明な部分が多く、臨床において克服し得る治療法や新たな分子標的の探索が重要であると考えられる。本研究では、ホルモン療法に対する耐性獲得の機序を明らかにする目的で、乳癌細胞におけるタモキシフェンに対する反応性に関わる遺伝子を、RNA 干渉の一つである short hairpin RNA (shRNA) を用いた機能的スクリーニングにより探索した。乳癌 MCF-7 細胞に、約 1 万種の遺伝子に対する shRNA からなるレンチウイルスライブラリーを感染させ、1 μ M の 4-hydroxytamoxifen (4OHT) 又は溶媒のみを添加し 4 週間培養した後、それぞれの細胞からゲノム DNA を調整し、導入された shRNA の量をマイクロアレイ法を用いて定量した。溶媒で処理したコントロール群と比較して、4OHT 処理群で 3 倍以上 ($p < 0.01$) 増加した shRNA 及び 1/5 以下 ($p < 0.01$) に減少した shRNA を volcano plotting によって選択した。増加した shRNA はタモキシフェンに対して感受性を担う遺伝子を標的とし、逆に減少した shRNA は耐性を担う遺伝子を標的としていることが予想された。これらの候補遺伝子のうち約 50 種について siRNA を合成し、細胞増殖に対する影響を解析したところ、それぞれタモキシフェン耐性と感受性に関わる候補遺伝子を複数種ずつ見出した。以上の結果より、これらの候補遺伝子は乳癌のタモキシフェン耐性獲得に重要な役割を担っていることが示唆され、臨床検体における発現や遺伝子の機能を明らかにすることによって、乳癌におけるホルモン療法耐性獲得機序の解明に有用であると考えられた。

メモ

メトホルミンによるIGF-1/IGF-1Rシグナルを介した 前立腺癌増殖抑制効果

【演者名・所属】

加藤春雄、関根芳岳、宮澤慶行、古谷洋介、小池秀和、鈴木和浩
群馬大学大学院医学系研究科 泌尿器科学

【目的】

メトホルミンは2型糖尿病の治療に広く使用されているビグアナイド系薬剤で、AMP kinase pathwayの活性化を介して肝臓における糖新生を阻害することで血糖降下作用を有する。最近、前立腺癌細胞を含む種々の癌細胞においてメトホルミンの抗腫瘍効果が報告されている。その機序としては1) LKB1を介したAMPK pathwayの活性化によるmTOR pathwayの抑制、2) インスリン、IGF-Iレベルの低下、3) cyclin D1レベルの低下などが考えられているが、いまだ不明瞭な点も多い。今回、我々は新たな機序としてIGF-1Rを介したシグナル伝達に注目し検討を行った。

【方法】

ホルモン抵抗性前立腺癌細胞株であるPC-3細胞を用いた。メトホルミンによる細胞増殖能・遊走能・浸潤能の変化はそれぞれMTS assay、Wound healing assay、Invasion assayにより検討した。IGF-1RのmRNA発現量についてはreal-time定量的PCRで解析を行った。また、IGF-1Rの発現、ERK1/2及びAkt活性化の変化についてはWestern blottingにて解析を行った。

【結果】

メトホルミン投与によりPC-3細胞の増殖・遊走・浸潤は有意に抑制された。IGF-1RのmRNA発現量はメトホルミン48時間投与により有意に低下した。同様にIGF-1Rの蛋白発現も抑制された。また、IGF-1付加により促進されるMAPK(ERK1/2)及びAktのリン酸化がメトホルミン投与を投与することで抑制された。

【考察・結論】前立腺癌細胞株PC-3において、メトホルミン投与により細胞増殖抑制が認められ、IGF-1Rの発現低下を介したIGF-1/IGF-1Rシグナル伝達の抑制がその機序の一つとして考えられた。メトホルミンは有用な前立腺癌治療薬として期待される。

メモ

ABCA1を介したHDLによる前立腺癌増殖機構の解明

【演者名・所属】

関根芳岳^{1, 2}, 古谷洋介¹, 小池秀和¹, 松井 博¹, 鈴木和浩¹,
Alan T. Remaley²

¹群馬大学大学院医学系研究科泌尿器科学

²Lipoprotein Metabolism Section, Pulmonary and Vascular Medicine Branch,
NHLBI, National Institutes of Health

【目的】

前立腺癌へホルモン療法を行うと脂質代謝異常が副作用として認められるがHDLの有意な上昇も引き起こされることが報告されている。HDLの上昇は、特に心血管系の疾患に対しては、有益なことであると考えられているが、HDLの癌に対する影響はほとんど研究されていない。HDLには、コレステロールの転送以外にも、ABCA1、ABCG1、SRB1といったHDLの受容体を介したMAPKやAktなどのシグナル伝達の活性化などさまざまな作用が報告されている。今回、我々はHDLの前立腺癌細胞に与える影響について、検討した。

【方法】

HDLは健康なボランティアの血清より分離した。コレステロールのinflux及びeffluxアッセイには、トリチウムを使用した。前立腺癌細胞や前立腺生検サンプルのmRNAは定量的PCRにて評価した。細胞増殖、浸潤の評価にはそれぞれMTS assay, wound healing assayを使用した。シグナル伝達の活性化はウェスタンブロットによって検出した。siRNAや発現ベクターのトランスフェクションにより、ABCA1の機能解析を行った。

【結果】

HDLはアンドロゲン非依存性であるPC-3やDU145の細胞増殖・浸潤を濃度依存性に引き起こしたが、アンドロゲン依存性であるLNCaPに対しては効果を示さなかった。いずれの細胞においても、HDLの投与により、コレステロールの流出及び流入を認めたが、投与24時間後の細胞内のコレステロール濃度は変化を認めなかったことより、上記のHDLによる作用はコレステロール非依存性であることが示唆された。またHDLはMAPKやAktの活性化をPC-3及びDU145において引き起こし、MAPKやAktの阻害剤にてHDLによ

る細胞増殖、浸潤が阻害された。次に HDL の受容体の発現を比較したところ、LNCaP において ABCA1 の発現が、他の 2 細胞より 10 倍程度低く、androgen free condition で培養することで、LNCaP における ABCA1 の発現が 10 倍ほど増加した。前立腺生検サンプルにおいても、ホルモン両方群では ABCA1 の発現が有意に上昇していた。HDL は LNCaP において、MAPK や Akt を活性化しなかったが、ABCA1 の発現を、androgen free condition での培養や発現ベクターのトランスフェクションなどで増加させることで、HDL は MAPK の活性化が可能になり、また PC-3 に対して、ABCA1 の発現を siRNA で抑えることにより、HDL による細胞増殖・浸潤・シグナル伝達の活性化は阻害された。ABCA1 の発現に影響を与える薬物の 1 つにスタチンが報告されているが、シンバスタチンを PC-3 や DU145 に投与することで、ABCA1 の発現は阻害され、シンバスタチンにより、HDL による細胞増殖・浸潤・シグナル伝達の活性化は阻害された

【結論】

ホルモン療法によって、ホルモン不応性前立腺癌になった場合には、アンドロゲンによって発現を抑えられていた ABCA1 の発現が上昇し、HDL が前立腺癌の進行を促進する可能性がある一方で、スタチンが ABCA1 の発現を下げることで、その作用を阻害できる可能性が示唆された。

メモ

前立腺周囲脂肪組織におけるアンドロゲン合成の可能性

【演者名・所属】

新井誠二¹、柴田康博¹、本間誠次郎²、鈴木和浩¹

¹群馬大学大学院医学系研究科 泌尿器科学

²あすか製薬メディカル

【目的】

前立腺癌はアンドロゲン依存性を有するため、転移性前立腺癌の治療として、アンドロゲン除去療法は有効な治療選択肢となる。しかし、前立腺癌はその後アンドロゲン除去療法に抵抗性となり、去勢抵抗性前立腺癌（castration-resistant prostate cancer; CRPC）と呼ばれる状態となる。近年、CRPC 組織内部ではアンドロゲン合成酵素の発現が増加しており、去勢下においても微量のアンドロゲンが CRPC の増殖に関与することがわかってきた。今回、我々は脂肪組織のアンドロゲン産生組織としての可能性について着目し、検討を行った。

【対象・方法】

根治的前立腺全摘術を施行された 20 名の前立腺癌患者から、皮下脂肪組織、前立腺周囲脂肪組織をそれぞれ摘出し、それぞれの脂肪組織における、アンドロゲン合成酵素；5-alpha reductase（SRD5A）、aldo-keto reductase（AKR1C）、3β-hydroxysteroid dehydrogenase（HSD3B）、cytochrome P17（CYP17）、steroid sulfatase（STS）の遺伝子発現について real-time 定量的 PCR で解析を行った。また、液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いて、CYP17 酵素活性、SRD5A 酵素活性の測定を行った。

【結果】

ほとんどの患者で SRD5A1、AKR1C3、HSD3B、STS の遺伝子発現が確認されたが、SRD5A2 の発現は確認できなかった。また、前立腺周囲脂肪組織における CYP17 酵素活性、SRD5A 酵素活性が確認された。

【考察・結論】

前立腺周囲脂肪組織内において、アンドロゲン合成酵素の発現および酵素活性が確認された。これらの結果は、前立腺周囲脂肪組織におけるアンドロゲン合成を示すものと考えられた。

メモ

LH-RH アゴニストによる前立腺癌患者の 血清副腎性アンドロゲン濃度の低下

【演者名・所属】

西井昌弘¹、野村昌史¹、関根芳岳¹、小池秀和¹、松井 博¹、
柴田康博¹、羽鳥基明¹、伊藤一人¹、小山徹也²、鈴木和浩¹

¹群馬大学大学院医学系研究科 泌尿器科学

²群馬大学大学院医学系研究科 病理診断学

【目的】

LH-RH アゴニスト（LHRH-A）が副腎性アンドロゲン濃度の変化に及ぼす作用を検討した。また副腎における LH 受容体の局在を評価した。

【方法】

対象は群馬大学病院で前立腺癌と診断した 47 例。年齢は 61-75 歳、病期は T1c が 13 例、T2 が 15 例、T3 が 19 例であった。16 例が中リスク群、31 例が高リスク群であった。治療は全例に neoadjuvant ADT（androgen deprivation therapy）を施行した後で放射線治療を行い、adjuvant ADT を追加した。ADT 施行前、6 および 12 か月後の血液を採取し、Testosterone (T)、dihydrotestosterone (DHT)、estradiol (E2)、dehydroepiandrosterone (DHEA)、androstenedione (A-dione)、Dehydroepiandrosterone-sulfate (DEHA-S) および ACTH を測定した。また副腎の LH 受容体を免疫組織化学法で評価した。

【結果】

ADT 開始 6 か月後に、T、DHT および E2 は 90%以上、DHEA、A-dione および DHEA-S は 30~40%とすべて有意に低下し、12 か月後も低下を維持した。ACTH は 6 か月後で上昇傾向を示し、12 か月後で有意に上昇した。ADT 前に認められた ACTH と DHEA-S との相関は 6 か月後で消失し、12 ヶ月後に逆相関となった。また全例で副腎皮質網状層において LH 受容体の染色反応が陽性であった。

【考察】

副腎性アンドロゲンは精巣由来が約 10%といわれている。LHRH-A 投与により副腎性アンドロゲンが 30~40%減少した結果より、LH の減少が副腎の網状層中の LH 陽性細胞を介して副腎性アンドロゲン産生を低下させたと推測された。

メモ

LDL 受容体を介したスタチンの 前立腺癌細胞増殖抑制機構

【演者名・所属】

古谷洋介、関根芳岳、小池秀和、松井 博、鈴木和浩
群馬大学大学院医学系研究科 泌尿器科学

【目的】

スタチンの前立腺癌を始めとする癌に対する抗腫瘍効果は以前より数々の報告がある。スタチンは正常細胞において HMG-CoA 還元酵素を阻害し、細胞内コレステロール合成を低下させる。細胞内コレステロール濃度の低下により細胞の LDL 受容体 (LDLR) 発現を増加させ、結果として血中から細胞内へのコレステロール取り込みを増やし、血中コレステロールを低下させる。しかしアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞においてはこの LDL 受容体発現の制御が欠失していることが報告されている。今回、我々はスタチンの前立腺癌細胞増殖に対する作用と LDL 受容体発現の関連について検討した。

【方法】

まずシンバスタチンによる前立腺癌細胞株 LNCaP および PC-3 の細胞増殖に与える影響を MTS アッセイにて調べた。続いてシンバスタチン投与後の各細胞における LDL 受容体発現についてリアルタイム PCR およびウェスタンブロットティングで調べた。また、シンバスタチン投与による各細胞内コレステロール濃度の変化について測定した。さらに、siRNA を用いて LDLR 発現をノックダウンした上でシンバスタチンの細胞増殖に与える影響および細胞内コレステロールへの作用を検討した。

【結果】

シンバスタチン投与により LNCaP、PC-3 とともに細胞増殖が抑制されたが、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株である PC-3 の方が低濃度 (1 μ M) のシンバスタチンで細胞増殖抑制作用が認められた。LNCaP では 100 μ M の高濃度でのみ細胞増殖が抑制された。シンバスタチンの投与により LNCaP では LDLR の発現が mRNA および蛋白レベルで上昇したが、PC-3 では LDLR の発現変化は mRNA で LNCaP よりも鈍く、蛋白レベルでは LDLR の発現は変化しなかった。細胞内コレステロール濃度はシンバスタチン投与により、PC-3 では優位に低下したが、LNCaP では優位な変化を認めなかった。siRNA にて LDLR をノックダウンした LNCaP に対してシンバスタチンを投与したところ、細胞内コレステロール濃度は低下し、細胞増殖抑制作用が 10 μ M のシンバスタチンで認められた。

【考察・結論】

スタチンは悪性度の高いアンドロゲン非依存性細胞株 PC-3 に対してより強い細胞増殖抑制作用を示した。LNCaP ではスタチンによる細胞内コレステロール低下に対して LDLR の発現を上昇させて、細胞内コレステロール濃度を維持するが、PC-3 では LDLR 発現の制御が失われていることが示唆された。また、LNCaP の LDLR 発現を siRNA でノックダウンしたところ、シンバスタチンの細胞増殖抑制作用および細胞内コレステロール低下を認めた。以上の事から、スタチンの抗腫瘍効果には LDL 受容体が大きく関わっており、悪性度の高い前立腺癌に対してより強い効果を示す事が示唆された。

メモ

前立腺癌の内分泌療法において、下垂体—副腎内分泌軸はアンドロゲン応答性カリクレインの調節と関連がある

【演者名・所属】

星井達彦

新潟大学大学院医歯学総合研究科 腎泌尿器病態学分野

【目的】

去勢抵抗性前立腺癌の進展と下垂体—副腎内分泌軸は関連があると言われていたが、まだその役割は明らかではない。本研究は、前立腺癌に対するアンドロゲン除去療法中の、副腎アンドロゲン生成の調節メカニズムと、副腎アンドロゲン及びカリクレイン 3 (KLK3 : PSA に相当) を含んだアンドロゲン応答性カリクレインと下垂体—副腎軸の影響につき評価するために行った。

【対象と方法】

72 名の限局性前立腺癌に対してゴナドトロピン放出ホルモンアゴニストを半年施行した前後の血清テストステロン、ジヒドロテストステロン (DHT)、副腎アンドロゲン、及び ACTH を測定した。また、ヒト前立腺癌培養細胞である LNCaP, 22Rv1, VCaP, PC3, そして DU145 を用いて、アンドロゲン応答性 KLK である KLK2, 3, 4, 15 mRNA の発現を様々な濃度の下、リアルタイム PCR にて調べた。

【結果】

治療前は下垂体ホルモンとアンドロゲン、PSA の間に相関は認めなかった。しかし、治療半年後、血清 ACTH は血清テストステロン、副腎アンドロゲンであるデヒドロエピアンドロステロン (DHEA-S)、アンドロステンジオン、そして PSA と密接に相関を認めた。また、血清 DHEA-S とアンドロステンジオンはテストステロンと PSA とも相関を認めた。治療半年後、血清黄体ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、テストステロン、DHEA-S、アンドロステンジオン、そして PSA は治療前と比べて下降していた。血清 ACTH においては治療前後で変化は認めなかった。培養細胞での実験では、アンドロゲン応答性細胞である LNCaP, 22Rv1, そして VCaP にて KLK2, KLK3/PSA, KLK4, そして KLK15 の mRNA 発現を認めた一方、アンドロゲン非応答性細胞である PC3 及び DU145 では以上の KLK の発現を認めなかった。LNCaP, 22Rv1, そして VCaP においては、DHEA 存在下で濃度依存的に、この 4 つの KLK mRNA の発現の上昇が認められた。

【結論】

前立腺癌に対するホルモン除去療法を施行した患者では、ACTH を介した下垂体—副腎内分泌軸が、アンドロゲン生成の調節に中心的役割を持っていることが分かった。血清 ACTH と副腎アンドロゲンがいずれも治療後の PSA と相関を認めた。アンドロゲン応答性ヒト前立腺癌培養細胞において、副腎アンドロゲン存在下で濃度依存的に、アンドロゲン応答性 KLK の mRNA レベルが上昇した。本研究は、下垂体—副腎内分泌軸を介したアンドロゲン生成が、前立腺癌に対するホルモン除去療法の更なる標的として重要であることが確かめられた。

メモ

アンドロゲン抑制療法は前立腺癌組織内でのアンドロゲン代謝産物からのデヒドロテストステロン合成を促進する

【演者名・所属】

石崎文雄^{1, 2}、武田啓介¹、瀧澤逸大¹、山名一寿¹、
星井達彦¹、原 昇¹、川崎 隆³、宮代好通⁴、内藤 眞⁵、
西山 勉¹、高橋公太¹

¹新潟大学大学院 腎泌尿器病態学分野

²長岡赤十字病院 泌尿器科

³新潟県立がんセンター新潟病院 病理部

⁴あすか製薬

⁵新潟大学大学院 分子細胞病理学分野

【背景】

Abiraterone acetate や MDV3100 などの新規薬剤の登場により、前立腺癌における組織内アンドロゲン環境やアンドロゲン受容体 (AR) シグナル経路の重要性が注目されている。また去勢抵抗性前立腺癌において、腫瘍内のデヒドロテストステロン (DHT) 濃度は AR を活性化するには十分である事が報告されている。DHT は AKR1C2 によりアンドロゲン非活性である 5α -androstane- $3\alpha, 17\beta$ -diol (3α -diol) に代謝される。去勢抵抗性の獲得のメカニズムにおいて、DHT の合成と分解のバランスを司る AR の pre-receptor regulation 機構についてはいまだ不明な点が多い。

【方法】

3α -diol を前立腺癌細胞株 (LNCaP と VCaP) に添加し培養液中の PSA (prostate-specific antigen) 濃度を測定した。また LC/MS (Liquid chromatography–Mass spectrometry) 法を用いて前立腺癌細胞内アンドロゲン濃度の測定及び、前立腺癌去勢細胞株モデル (LNCaP-ADT) を用いて pre-receptor regulation に関与する酵素の経時的変化について Real-time PCR 法を用いて検討した。142 例の前立腺全摘標本を用いて免疫染色における検討も行った。 3α -diol の体内動態の検証のため、局所前立腺癌で根治照射施行前に 6 ヶ月間のアンドロゲン抑制療法 (ADT) を施行する 72 例を対象に前向き検討を行った。機能解析のため siRNA によるノックダウンを行った。

【結果】

DHT の代謝産物である 3α -diol の添加により培養液中に濃度依存的に PSA の産生を認めた。 3α -diol の添加により前立腺癌細胞株内で DHT の生成を LC/MS 法を用いて確認した。去勢細胞株モデルの結果から、去勢初期には DHT の代謝が抑制され、去勢期間が長くなるにつれ 3α -diol からの DHT の再合成に関与するとされる HSD17B6 の発現が上昇していた。HSD17B6 の発現は、前立腺全摘施行前に ADT を施行した症例群で施行していない症例群と比較して有意に発現が増加 ($p < 0.001$) していた。術前に ADT を施行した群での PSA 再発例では PSA 非再発例と比較して有意に HSD17B6 の発現が高かった ($p = 0.038$)。LNCaP-ADT における PSA 産生能は HSD17B6 をノックダウンすることにより有意な低下を示した ($p = 0.014$)。血液中の 3α -diol glucuronide (3α -diol G) は ADT 施行前より有意に副腎アンドロゲンである DHEA-S と相関しており、この相関は ADT 施行後により強くなった ($p = 0.001 \rightarrow p < 0.001$)。ADT 施行後の 3α -diol G と PSA 値は有意な相関を示した ($p = 0.006$)。

【結論】

アンドロゲン非活性である 3α -diol から前立腺癌細胞内において DHT が生成されることが確認された。 3α -diol から DHT の合成経路は新たな治療ターゲットとなりうることが示唆された。

メモ

宿主側の EBAG9 欠損は腫瘍免疫の増強を介して in vivo での泌尿器がん腫瘍増殖を抑制する

【演者名・所属】

宮崎利明¹、池田和博¹、堀江公仁子¹、井上 聡^{1, 2}

¹埼玉医大 ゲノム医学研究センター 遺伝子情報制御部門

²東京大学大学院医学系研究科抗加齢医学講座

我々は性ホルモン応答遺伝子の1つとしてEBAG9 (estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9)を同定した(Mol Cell Biol, 1998)。EBAG9のタンパク質レベルでの発現は、前立腺がん(Int J Cancer, 2003)、腎がん(Cancer Res, 2005)、膀胱がん(Int J Cancer, 2009)をはじめとする泌尿器がんにおいて進行度と相関し、これらががん患者の予後不良の予測因子となることを明らかにしてきた。そのメカニズムとして、EBAG9 はがん細胞の免疫系からの回避に関与することを明らかにした(Br J Cancer, 2001; Cancer Res, 2005)。一方、CD8+ T細胞に発現するEBAG9が細胞傷害活性を負に調節することが報告され、EBAG9は、腫瘍増殖に重要な働きを有すると考えられているが、そのがん宿主側における役割については不明な点が多い。本研究では、Ebag9ノックアウト(Ebag9 KO)マウスにがん細胞を移植して腫瘍を作製し、EBAG9のin vivoにおける役割を解明することを目的とした。マウス膀胱がんMB-49細胞を、Ebag9 KOマウスまたは野生型マウスの皮下に移植し腫瘍増殖を比較したところ、興味深いことにEbag9 KOマウスにおいて腫瘍増殖が抑制された。同様の所見は前立腺がんTRAMP-C1細胞移植モデルでも示すことができた。MB-49細胞についてさらに詳細な解析を行った。がん細胞の転移は、肺への転移数が野生型マウスと比べてEbag9 KOマウスにおいて著明に減少していた。形成された腫瘍内におけるCD8陽性細胞、CD3陽性細胞、CD4陽性細胞を免疫組織化学法にて定量したところ、Ebag9 KOマウスに作製された腫瘍内において、これらT細胞の浸潤が増加していた。また、Ebag9 KOマウスに移植された腫瘍において、IL-1やIL-10等の免疫関連因子の発現上昇を認められた。さらに、Ebag9 KOマウスと野生型マウスの脾臓からCD8+ T細胞を分離し、免疫関連因子の発現を解析したところ、IL-10受容体、IFN- γ 、グランザイムの遺伝子発現がEbag9 KOマウス由来のCD8+ T細胞において野生型由来の細胞に比して上昇していた。本研究により、EBAG9が宿主側の免疫反応を制御することにより、がん細胞の増殖と転移に関与するメカニズムを明らかにした。

メモ

去勢抵抗性前立腺癌において PI3K-Akt-mTOR シグナル経路の制御はドセタキセル抵抗性を改善させる

【演者名・所属】

安水洋太、宮嶋哲、小坂威雄、宮崎保匡、菊地栄次、大家基嗣
慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室

【目的】

去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer; CRPC) においてドセタキセル抵抗性獲得に伴い Akt のリン酸化 (pAkt) は有意に亢進し、CRPC における Akt シグナル伝達を標的とする新規治療戦略の有用性を提唱してきた。本研究は、PI3K/Akt シグナル伝達阻害剤を用いたドセタキセル抵抗性 CRPC に対する新規治療戦略の確立を目的とする。

【対象と方法】

ヒト CRPC 株である C4-2AT6 に対して PI3K/Akt シグナル伝達阻害剤である BEZ235 とドセタキセルの併用の効果を *In vivo* 及び *In vitro* において検討した。C4-2AT6 はヒト CRPC 株 C4-2 を 6 か月間アンドロゲン除去下に培養することで樹立した。

【結果】

C4-2AT6 に対する 10nM の BEZ235 単独療法と BEZ235 と 2nM のドセタキセルとの併用療法の抗腫瘍効果を WST assay を用いて評価した。BEZ235 単独では cell viability は $44.8\% \pm 4.2\%$ であったのに併用療法では $20.9\% \pm 3.9\%$ であった。Combination index は 0.31 であり、BEZ235 のドセタキセルとの併用効果は相乗的であると考えられた。C4-2AT6 の皮下腫瘍モデルマウスを 4 群に分け、①コントロール群、②BEZ235 単独投与群 (40 mg/kg/day)、③ドセタキセル単独投与群 (4 mg/kg)、④BEZ235 及びドセタキセル併用療法群とし比較検討した。コントロール群では day0 と比較して day15 では腫瘍径が 298%まで増大していた。BEZ235 とドセタキセル単独療法群ではそれぞれ 103%、140%の増大であった。一方で、BEZ235 とドセタキセルの併用療法群では day0 と比較した day15 の腫瘍径が 43.0%であり、有意な縮小を認めた。BEZ235 とドセタキセル併用群は単独群と比較し有意に腫瘍は縮小した ($P < 0.01$)。

【結論】

BEZ235 とドセタキセルの併用療法は C4-2AT6 に対して著明な抗腫瘍効果を示した。PI3K/Akt シグナル伝達阻害剤がドセタキセル抵抗性 CRPC に対して有望な治療法となりうる可能性を示唆した。

メモ

関東ホルモンと癌研究会 第13回当番幹事
群馬大学大学院医学系研究科泌尿器科学 鈴木和浩
事務局 大山（群馬大学大学院医学系研究科泌尿器科学）
連絡先
住所：〒3871-8511 群馬県前橋市昭和町 3-39-22
TEL：027-220-8303
FAX：027-220-8318
E-mail: kazu@gunma-u.ac.jp

【関東ホルモンと癌研究会ホームページ】

<http://www.jfcr.or.jp/KANTO-HORMONE/>