

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23791751
 研究課題名（和文） 前立腺肥大症治療薬のオフターゲット効果による再燃前立腺癌の
 新規治療戦略
 研究課題名（英文） A new therapeutic strategy for castration-resistant prostate
 cancer by off-target effects of naftopidil
 研究代表者
 石井 健一郎（ISHII KENICHIRO）
 三重大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号： 90397513

研究成果の概要(和文)：腫瘍微小環境において、癌間質を構成する主要な成分：癌関連線維芽細胞（CAFs）は腫瘍形成に重要な役割を担う。前立腺肥大症治療薬ナフトピジルが細胞周期阻害作用を発揮するための細胞内標的を同定する目的で、我々は文科省科研費・新学術領域・がん支援・化学療法基盤支援活動班から無償で分与された標準阻害剤キットを活用した。その結果、ヒト前立腺腫瘍から初代培養して得られた CAFs の 1 つ、PCaSC-8 において GSK-3 と CDK に対する阻害剤がナフトピジルに近似した作用を示すことを見出した。さらに、ナフトピジル処理による GSK-3 のリン酸化阻害および CDK2 タンパク質量の低下を確認した。以上から、ナフトピジルのオフターゲット効果である細胞増殖抑制作用（G1 cell cycle arrest の誘導）に関わる細胞内シグナル伝達経路を GSK-3 および CDK2 シグナルと絞り込むことに成功した。

研究成果の概要(英文)：In the tumor microenvironment, carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) are considered to play a critical role in the promotion of tumorigenesis. Recently, we have reported that the antiproliferative effect of naftopidil is not related to androgen sensitivity of the cells or the α_1 -adrenoceptor subtype expression in prostate cancer cells, suggesting that naftopidil has an off-target effect for various types of cells. To identify the cellular signal targets of naftopidil in CAFs, we used the SCADS inhibitor kits including more than 320 chemicals. Our results demonstrated that inhibitors against GSK-3 and CDK showed the similar effects with naftopidil in PCaSC-8. In addition, western blot analysis showed that the decreases of GSK-3 phosphorylation and CDK2 abundance were observed in naftopidil-treated cells. Finally, we suggest that GSK-3 and CDK2 might be important targets for induction of G1 cell cycle arrest by naftopidil treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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、癌関連線維芽細胞、ナフトピジル、オフターゲット効果

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の治療において、内分泌治療に抵抗性を有する再燃前立腺癌の出現が大きな問題である。現在、様々な化学療法が試されるものの確立された治療法はなく、できる限り癌の進行を押さえ込む努力をするに過ぎない。

我々は、内分泌治療に抵抗性を示す再燃前立腺癌を克服するためにはホルモン依存性の喪失メカニズムを解明するだけでなく、ホルモン依存性が喪失した癌細胞が置かれている環境、すなわち癌の微小環境を考慮することが重要と考えている。事実、我々は内分泌療法に抵抗するホルモン不応性の前立腺癌への進展には、癌間質を構成する carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) が産生する増殖因子やサイトカインがアンドロゲン非依存的な増殖を促進させるなど、癌細胞を取り巻く微小環境が重要な役割を担うことを報告している (Ishii *et al.*, *Endocrine-Related Cancer*, 16: 415-428, 2009)。このような背景から、ホルモン依存性喪失ヒト前立腺癌細胞の腫瘍形成における癌間質の役割を解明し、再燃前立腺癌の治療に対する新たなストラテジーの探索を試みている。

近年、我々は独自に確立したヒト前立腺癌細胞と線維芽細胞を混合させる *in vivo* 腫瘍形成モデルを活用して、1) サブタイプ選択性 α_1 受容体遮断薬ナフトピジルが腫瘍形成を有意に抑制すること。2) ナフトピジルは前立腺癌細胞と線維芽細胞のどちらにおいても細胞周期の停止 (G1 cell cycle arrest) を誘導したこと。3) ナフトピジルによる細胞増殖抑制および細胞周期の停止は、癌細胞や線維芽細胞が発現している α_1 受容体のサブタイプ発現パターンに関係していないことを見出した (Hori *et al.*, *Cancer Prevention Research*, 4: 87-96, 2011)。

ほとんどの薬剤は、単一の標的タンパク質に選択性を有するように開発されているが、本来の標的以外にも結合することは多々ある。なかには、本来意図しない標的との「オフターゲット」な結合によって様々な重症度の副作用が引き起こされるのだが、そうした結合の一部は新たな薬効、つまり想定外の効果を生み出す可能性もある。このように、オフターゲット効果は、多くの場合は望ましくない有害事象をもたらす作用として捉えがちだが、現実にはこのオフターゲット効果が有益に働くことによって

使用されている薬剤も存在する。そのため、本研究課題を計画することで、ナフトピジルが有するオフターゲット効果、すなわち前立腺肥大症治療薬による前立腺癌の増殖抑制メカニズムを深く理解することに加え、癌間質を標的として再燃前立腺癌の増殖を抑制する、という発想が臨床応用できるか否かを検証できると期待された。

2. 研究の目的

本研究課題では、前立腺癌細胞に対して前立腺肥大症治療薬ナフトピジルのオフターゲット効果を引き出す標的分子もしくは細胞内シグナル伝達経路の同定と、前立腺肥大症治療薬による癌間質を標的とした再燃前立腺癌の増殖抑制が可能か否かを、独自に作製する *in vivo* 腫瘍形成モデルを用いて検証することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞株

正常ヒト前立腺ストローマ細胞 PrSC を Lonza 社から購入し、ストローマ細胞培地キットにて継代維持した。PCR による遺伝子発現解析の結果から、PrSC は線維芽細胞-筋線維芽細胞の性質を有することを確認した。ヒト前立腺腫瘍由来癌関連線維芽細胞 PCaSC-8 は摘出手術標本から初代培養することにより作製した。

アンドロゲン低感受性 E9 細胞は、アンドロゲン感受性 LNCaP を限外希釈することにより単離し、アンドロゲン不応性 AIDL 細胞は、LNCaP を血清中ホルモン除去下で培養することにより樹立した。生化学的特性として合成アンドロゲン R1881 に対する反応性を比較し、E9 はアンドロゲン低感受性、AIDL はアンドロゲン不応性であることを確認した。

標準阻害剤キット

文科省科研費・新学術領域・がん支援・化学療法基盤支援活動班から無償で分与された。基本的に標的分子がはっきりとしていて、現在のサイエンスで阻害剤として定着し、バイオプローブとして有用な低分子化合物と既存の制癌剤で構成する。キット(#1-#4)は 96 well V 底プレートの各 well に阻害剤を濃度 2 mM (in DMSO) で 5 μ L (10 nmol) ずつ分注し、作製されている。

英文表記: SCADS Inhibitor Kit, Screening Committee of Anticancer Drugs supported by

Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas, Scientific Support Programs for Cancer Research, from The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan

in vitro 細胞増殖試験

各細胞株 (1 万個) を 96 穴プレートに播種し、24 時間後から阻害剤キット #1-#4 (終濃度: 10 μ M) で 3 日間、処理した。生細胞の割合は Cell Counting kit-8 (同仁化学研究所) を用いて評価した。

4. 研究成果

平成 23 年度

本年度は、ヒト前立腺腫瘍から初代培養して得られた癌間質細胞PCaSC-8を用いて、ナフトピジルをはじめとする前立腺肥大症治療薬への反応性を検証し、さらにナフトピジルによる細胞周期阻害作用機構の解明を行った。

【検討1】市販の正常ヒト前立腺ストローマ細胞PrSC (Lonza社)に対する増殖抑制作用と比較して弱いものの、ナフトピジルはPCaSC-8の細胞増殖を有意に抑制した。ナフトピジル以外に実臨床で使用される前立腺肥大症治療薬タムスロシンやシロドシンによる抑制作用は極めて弱いものであった。

【検討2】PrSCをTGF β で処理すると細胞増殖が有意に抑制された。次に、TGF β で前処理したPrSCに対してナフトピジルを作用させたところ、ナフトピジルによる増殖抑制作用は観察されなかった。

アンドロゲン低感受性ヒト前立腺癌細胞に対して細胞周期阻害作用を発揮するナフトピジルは、ヒト前立腺腫瘍から初代培養して得られたPCaSC-8に対しても強い増殖抑制作用を示したため、癌間質を標的とした再燃前立腺癌の新規治療法の確立に向けた第一歩となる結果が得られた。また、TGF β により細胞増殖を停止させた間質細胞に対してナフトピジルが増殖抑制作用を発揮しなかったため、ナフトピジルは体内において活発に増殖する癌細胞を特異的に標的とする、すなわち正常細胞への攻撃が弱く、副作用が出にくい薬剤である可能性が示唆された。

平成 24 年度

本年度は、ナフトピジルによる細胞増殖抑

制の程度が異なる①市販の正常ヒト前立腺ストローマ細胞 PrSC (Lonza 社) と②ヒト前立腺腫瘍から初代培養して得られた癌間質細胞 PCaSC-8 を用いて、ナフトピジルによる細胞増殖抑制に関わる細胞内シグナル伝達経路の同定を試みた。

【検討 1】文科省科研費・新学術領域・がん支援・化学療法基盤支援活動班より分与された、320 種類以上の化合物を含む標準阻害剤キットを用いてナフトピジルと同じ細胞増殖抑制パターンを示す化合物を探索した。その結果、GSK-3 と CDK に対する阻害剤がナフトピジルに近似した作用を示すことを見出した。

【検討 2】ウェスタンブロッティング法により、ナフトピジルによる GSK-3 のリン酸化阻害と CDK2 タンパク質量の低下を確認した。

320 種類以上の化合物を含む標準阻害剤キットを用いた網羅的な解析により、ナフトピジルによる細胞増殖抑制に関わる細胞内シグナル伝達経路を GSK-3 および CDK2 シグナルと絞り込むことに成功した。現在のところ、臨床で用いられている GSK-3 阻害剤はない。よって、GSK-3 阻害作用を有する既存薬ナフトピジルを有効活用して、GSK-3 シグナルが強く関わるアルツハイマー病など他の疾患治療薬として再開発していく可能性が示唆された。

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 7 件)

- 1) Nishikawa K, Soga N, Ishii K, Kato M, Iwamoto Y, Hori Y, Etoh M, Ohkawara T, Yamada T, Uchida K, Kise H, Arima K, Narita M, Shiraishi T, Sugimura Y. Manserin as a novel histochemical neuroendocrine marker in prostate cancer. *Urologic Oncology* (in press) (査読有り)
- 2) Iguchi K, Fukami K, Ishii K, Otsuka T, Usui S, Sugimura Y, Hirano K. Low androgen sensitivity is associated with low levels of Akt phosphorylation in LNCaP-E9 cells. *Journal of Andrology*, 33: 660-666, 2012. (査読有り)

- 3) Iguchi K, Hayakawa Y, **Ishii K**, Matsumoto K, Usui S, Sugimura Y, Hirano K. Characterization of the low pH/low nutrient-resistant LNCaP cell subline LNCaP-F10. *Oncology Reports*, 28: 2009-2015, 2012. (査読有り)
- 4) **Ishii K**, Mizokami A, Tsunoda T, Iguchi K, Kato M, Hori Y, Arima K, Namiki M, Sugimura Y. Heterogeneous induction of carcinoma-associated fibroblast-like differentiation in normal human prostatic fibroblasts by co-culturing with prostate cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112: 3604-3611, 2011. (査読有り)
- 5) Arase S, **Ishii K**, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y. Endocrine disrupter bisphenol A increases *in situ* estrogen production in mouse urogenital sinus. *Biology of Reproduction*, 84: 734-742, 2011. (査読有り)
- 6) Hori Y, **Ishii K**, Kanda H, Iwamoto Y, Nishikawa K, Soga N, Kise H, Arima K, Sugimura Y. Naftopidil, a subtype selective α_1 -adrenoceptor antagonist, suppresses human prostate tumor growth by altering interactions between tumor cells and stroma. *Cancer Prevention Research*, 4: 87-96, 2011. (査読有り)
- 7) Otsuka T, Iguchi K, Fukami K, **Ishii K**, Usui S, Sugimura Y, Hirano K. Androgen receptor W741C and T877A mutations in AIDL cells, an androgen independent subline of prostate cancer LNCaP cells. *Tumor Biology*, 32: 1097-1102, 2011. (査読有り)

[学会発表] (計 27 件)

- 1) 第 22 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 25 年 3 月 8-9 日・高知市)
エストロゲンにより誘導される前立腺基底上皮細胞過増殖の分子機構
加藤 学、**石井 健一朗**、佐々木 豪、岩本 陽一、堀 靖英、山田 泰司、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
- 2) 第 28 回 前立腺シンポジウム (平成 24 年 12 月 8-9 日・品川)
前立腺疾患の発生・進展における間質リモデリングの役割
石井 健一朗、加藤 学、白石 泰三、杉

村 芳樹

- 3) 25th Annual Fall Meeting of the Society for Basic Urologic Research (SBUR) (平成 24 年 11 月 15-18 日・Florida)
A potential role of stromal interleukin-6 as paracrine-acting angiogenic cytokine in prostate cancer microenvironment
Kenichiro Ishii, Manabu Kato, Yoichi Iwamoto, Takeshi Sasaki, Kazuhiro Iguchi, Atushi Mizokami, Kiminobu Arima, Taizo Shiraishi, Yoshiki Sugimura
- 4) 25th Annual Fall Meeting of the Society for Basic Urologic Research (SBUR) (平成 24 年 11 月 15-18 日・Florida)
A potential role of TGF alpha in estrogenically induced squamous metaplasia in mouse prostate
Manabu Kato, **Kenichiro Ishii**, Takeshi Sasaki, Yoichi Iwamoto, Yasuhide Hori, Yasushi Yamada, Kiminobu Arima, Taizo Shiraishi, Yoshiki Sugimura
- 5) 第 71 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 24 年 9 月 19-21 日・札幌市)
フェニルピペラジン誘導体ナフトピジルの消化器がん化学予防に向けた新規治療戦略
石井 健一朗、広川 佳史、米田 操、藤原 雅也、今井 裕、白石 泰三
- 6) 第 71 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 24 年 9 月 19-21 日・札幌市)
癌関連線維芽細胞由来インターロイキン-6 による前立腺癌一問質のパラクライン・ループ活性化機構
加藤 学、**石井 健一朗**、井口 和弘、溝上 敦、堀 靖英、山田 泰司、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
- 7) 第 71 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 24 年 9 月 19-21 日・札幌市)
TGF β により前立腺癌細胞が腫瘍微小環境に及ぼす影響とその病理学的検討
広川 佳史、**石井 健一朗**、藤原 雅也、今井 裕、米田 操、白石 泰三
- 8) 第 31 回 日本アンドロロジー学会学術大会 (平成 24 年 6 月 29-30 日・神戸市)
TGF α -EGF 受容体シグナルを介したエストロゲンによる前立腺基底上皮細胞の異常増殖と扁平上皮化生の誘導機構
加藤 学、**石井 健一朗**、岩本 陽一、堀 靖英、山田 泰司、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
- 9) The 2012 American Urological

- Association (AUA) Annual Meeting (平成 24 年 5 月 19-23 日・Atlanta)
Aberrant activation of paracrine loop between prostate cancer cells and carcinoma-associated fibroblasts by overexpression of stromal interleukin-6
Kenichiro Ishii, Yoichi Iwamoto, Manabu Kato, Kazuhiro Iguchi, Atushi Mizokami, Kiminobu Arima, Taizo Shiraishi, Yoshiki Sugimura
- 10) The 2012 American Urological Association (AUA) Annual Meeting (平成 24 年 5 月 19-23 日・Atlanta)
Up-regulation of fibroblast growth factor 2 in castration-induced mouse prostate stromal remodeling lead to imbalance of basal epithelial-stromal interactions
Manabu Kato, Kenichiro Ishii, Yoichi Iwamoto, Yasuhide Hori, Yasushi Yamada, Kiminobu Arima, Taizo Shiraishi, Yoshiki Sugimura
- 11) 第 100 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 24 年 4 月 21 日-24 日・横浜市)
前立腺癌-間質相互作用: 去勢後の前立腺間質のリモデリングと増殖因子の解析
加藤 学、石井 健一郎、岩本 陽一、堀 靖英、神田 英輝、山田 泰司、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
- 12) 第 100 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 24 年 4 月 21 日-24 日・横浜市)
ヒト前立腺癌移植モデルにおける α_1 アドレナリン受容体遮断薬が放射線感受性に与える影響
岩本 陽一、神田 英輝、石井 健一郎、加藤 学、堀 靖英、山田 泰司、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 13) 第 21 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 24 年 2 月 10-11 日・札幌市)
癌間質由来インターロイキン-6 による前立腺癌-間質のパラクライン・ループ活性化機構
石井 健一郎、岩本 陽一、加藤 学、井口 和弘、溝上 敦、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
- 14) 第 21 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 24 年 2 月 10-11 日・札幌市)
去勢後の前立腺間質リモデリングによる FGF2 発現上昇が基底上皮-間質相互作用に及ぼす影響
加藤 学、石井 健一郎、岩本 陽一、堀 靖英、山田 泰司、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
- 15) 第 21 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 24 年 2 月 10-11 日・札幌市)
ヒト前立腺癌移植モデルにおける α_1 アドレナリン受容体遮断薬が放射線感受性に与える影響
岩本 陽一、神田 英輝、石井 健一郎、加藤 学、堀 靖英、山田 泰司、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 16) 第 1 回 テネインシンフォーラム (平成 23 年 11 月 5 日・津市)
テネインシン C 欠損マウス前立腺における二核細胞の出現
石井 健一郎
- 17) International Society for Oncological Biomarkers and Tumor Biology 2011 (平成 23 年 10 月 15 日-10 月 19 日・Italy, Firenze)
Prostate cancer LNCaP-F10 cells are resistant against cell death induced by low pH and low nutrition culture condition
Kazuhiro Iguchi, Yuri Hayakawa, Kenichiro Ishii, Kaoru Matsumoto, Shigeyuki Usui, Yoshiki Sugimura, Kazuyuki Hirano
- 18) 第 70 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 23 年 10 月 3-5 日・名古屋市)
前立腺癌-間質相互作用を標的にした新規治療戦略
石井 健一郎、堀 靖英、杉村 芳樹
- 19) 第 70 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 23 年 10 月 3-5 日・名古屋市)
TGF- β の長期刺激が前立腺癌細胞株に及ぼす影響と THP-1 分化マクロファージ様細胞に対する作用
広川 佳史、石井 健一郎、米田 操、今井 裕、白石 泰三
- 20) 第 70 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 23 年 10 月 3-5 日・名古屋市)
低栄養・低 pH 耐性前立腺癌細胞 LNCaP-F10 細胞の性状解析
早川 友里、井口 和弘、石井 健一郎、松本 芳、臼井 茂之、杉村 芳樹、平野 和行
- 21) 9th World Congress on Urological Research (平成 23 年 9 月 15 日-9 月 17 日・Austria, Innsbruck)
Heterogeneous induction of carcinoma-associated fibroblast-like differentiation in normal human

prostatic fibroblasts by co-culturing with prostate cancer cells

Kenichiro Ishii, Atsushi Mizokami, Toshiyuki Tsunoda, Kazuhiro Iguchi, Manabu Kato, Yasuhide Hori, Kiminobu Arima, Mikio Namiki, Yoshiki Sugimura

- 22) 9th World Congress on Urological Research (平成 23 年 9 月 15 日-9 月 17 日・Austria, Innsbruck)

Mechanisms of prostatic structure maintenance by actions of androgen

Manabu Kato, Kenichiro Ishii, Yoichi Iwamoto, Yasuhide Hori, Yasushi Yamada, Kiminobu Arima, Taizo Shiraishi, Yoshiki Sugimura

- 23) 第 30 回 日本アンドロロジー学会学術大会 (平成 23 年 7 月 22-23 日・東京)

動物モデルと前立腺増殖機構

石井 健一朗、加藤 学、杉村 芳樹

- 24) 第 30 回 日本アンドロロジー学会学術大会 (平成 23 年 7 月 22-23 日・東京)

アンドロゲン依存的な前立腺組織構築の維持機構

加藤 学、石井 健一朗、岩本 陽一、堀 靖英、山田 泰司、曾我 倫久人、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹

- 25) 第 57 回 日本薬学会東海支部総会・大会 (平成 23 年 7 月 9 日・名古屋市)

前立腺癌細胞株 LNCaP 細胞の亜株のアンドロゲン応答性変化機序

大塚 崇史、井口 和弘、深見 和宏、石井 健一朗、白井 茂之、杉村 芳樹、平野 和行

- 26) 第 99 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 23 年 4 月 21 日-24 日・名古屋市)

ヒト前立腺癌細胞および間質細胞に対するフェニルピペラジン誘導体の細胞周期阻害作用

石井 健一朗、堀 靖英、岩本 陽一、西川 晃平、加藤 学、神田 英輝、有馬 公伸、杉村 芳樹

- 27) 第 99 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 23 年 4 月 21 日-24 日・名古屋市)

前立腺癌組織における新規神経内分泌物質 Manserin 発現の検討

西川 晃平、曾我 倫久人、岩本 陽一、堀 靖英、石井 健一朗、木瀬 英明、有馬 公伸、杉村 芳樹

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

三重大学大学院医学系研究科

腎泌尿器外科学

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/urology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 健一朗 (ISHII KENICHIRO)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90397513

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者