京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	寺 田 直 樹
論文題目	Identification of EP4 as a Potential Target for the Treatment of Castration-resistant Prostate Cancer Using a Novel Xenograft Model (新規 xenograft モデルを用いた去勢抵抗性前立腺癌治療標的分子 EP4 の同定)		

（論文内容の要旨）

【目的】前立腺癌の多くは、その増殖がアンドロゲン依存性であり、去勢療法は進行性前立腺癌の標準治療である。しかし治療開始後約２年で治療抵抗性を獲得し、去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）に移行する。CRPC に対する標準的な治療法は確立されておらず、その予後は不良である。新規に樹立したヒト前立腺癌 xenograft モデルを用いて、その増殖機構の解明と新たな治療法の開発を目指した研究を行った。

【対象と方法】Xenograft モデルの樹立：去勢抵抗性前立腺癌患者の局所再発組織を免疫不全マウスの皮下に移植することにより、継代可能な新規 xenograft モデル：KUCaP-2 を樹立した。KUCaP-2 を移植したマウスに対して外科的去勢術を行うと、腫瘍は一旦縮小し、1-2 ヶ月後に再増殖する。去勢抵抗性獲得に伴う遺伝子発現変化の解析：去勢前(AD)期、去勢後縮小(ND)期、去勢後再増殖(CR)期の各時期に腫瘍を採取し、前立腺癌の増殖の key factor である androgen receptor(AR)の発現を免疫染色法にて評価した。また、血清を採取し、AR の下流分子であり前立腺癌の腫瘍マーカーである PSA 値を測定した。治療標的分子の同定と臨床検体での評価：DNA microarray 法及び real time PCR 法により各時期の遺伝子発現の変化を比較検討した。AD 期、ND 期と比較し、CR 期で有意に発現が亢進している分子の１つである prostaglandin E receptor EP4 subtype（EP4)に着目し、その臨床検体における発現を、免疫染色法を用いて解析した。細胞株を用いた去勢抵抗性獲得機序の解明：アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株である LNCaP を親株とする EP4 強制発現株(LNCaP-EP4)を作成し、その細胞のアンドロゲン除去培養液下増殖能(in vitro)及び去勢マウス皮下増殖能(in vivo)をコントロール株(LNCaP-mock)と比較した。EP4 発現亢進による増殖能の変化と AR との関連性を、RNAi を用いた AR の発現抑制法、PSA の発現解析、レポーターアッセイを用いた AR の転写活性解析により評価した。Xenogrft を用いた新規治療法の開発：EP4 拮抗薬(ONO-AE3-208)を、LNCaP-EP4 や KUCaP-2 を移植したマウスに投与することにより、去勢抵抗性増殖が抑制されるかどうかを評価した。

【結果】KUCaP-2 は AR、PSA を発現したヒト前立腺癌の組織型を有する xenograft である。KUCaP-2 の AR は各時期において野生型であり、核における AR の発現は、AD 期と比べ ND 期で低下し、CR 期で再増加した。血清中 PSA 値も同様の変化を認めた。DNA microarray 法を用いた発現解析で、EP4 の CR/ND 比は既知の遺伝子の中で最も高く(ratio=15.7, p=0.029)、real time PCR でも同様の結果であった。臨床検体における EP4 の発現は、ホルモン未治療前立腺癌(n=27) と比較して CRPC(n=31)において有意に亢進していた(p=0.0001)。LNCaP-EP4 は、in vitro, in vivo においてアンドロゲン非依存性増殖能を獲得した。また、LNCaP-EP4 は、アンドロゲン除去下でも PSA を産生し、AR の発現抑制によりその増殖及び PSA 産生が低下した。また、レポーターアッセイにおいて、EP4 遺伝子導入により AR の転写活性亢進を認めた。以上の結果から、EP4 の発現亢進に伴うアンドロゲン非依存性増殖には AR の活性化が関与していることが示唆された。ONO-AE3-208 の in vitro 投与により、LNCaP-EP4 の PSA 産生が濃度依存性に低下し、in vivo 投与によりその去勢抵抗性増殖が抑制された。また、同薬剤の in vivo 投与により、KUCaP-2 の去勢抵抗性増殖も抑制された。

【結論】前立腺癌の臨床経過を再現できる優れた xenograft モデルである KUCaP-2 を樹立した。KUCaP-2 を用いた解析により、EP4 の発現亢進とそれに伴う AR の活性化が前立腺癌の去勢抵抗性増殖能獲得機序の 1 つであることを証明した。また、EP4 拮抗剤(ONO-AE3-208)を用いた抗 EP4 療法は CRPC に対する新規治療法になる可能性が示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

去勢療法は進行性前立腺癌の標準治療であるが、いずれは去勢療法に対する抵抗性を獲得する。その去勢抵抗性獲得機序の解明は臨床上重要である。申請者は、新規に樹立したヒト前立腺癌 xenograft モデル(KUCaP-2)を用いて、その去勢抵抗性獲得機序の解明と新たな治療法の開発を目指した研究を行った。KUCaP-2 は去勢により縮小した後に再増殖し、これは臨床癌が去勢抵抗性を獲得する経過と類似している。DNA microarray 法を用いた KUCaP-2 における遺伝子発現の網羅的解析の結果、去勢抵抗性獲得に際し prostaglandin E receptor EP4 subtype (EP4)の発現亢進を認めた。臨床検体における免疫染色においても、EP4 の発現亢進と去勢抵抗性との関連が示唆された。それらの関連を解析するために、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株である LNCaP に EP4 を強制発現させた LNCaP-EP4 を作成した。LNCaP-EP4 はアンドロゲン除去下でもアンドロゲン受容体(AR)が活性化し、in vitro 及び in vivo における去勢抵抗性を獲得した。EP4 拮抗剤(ONO-AE3-208)の投与は、LNCaP-EP4 の xenograft 及び KUCaP-2 の去勢抵抗性増殖を抑制した。以上により、EP4 の発現亢進とそれに伴う AR の活性化が前立腺癌の去勢抵抗性獲得機序の１つであることが証明され、抗 EP4 療法が去勢抵抗性前立腺癌に対する新規治療法になる可能性が示された。

本研究は、前立腺癌の治療において問題となる去勢抵抗性獲得機序の解明に貢献し、去勢抵抗性前立腺癌に対する新規治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成２２年２月１５日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降