




学位論文審査の結果の要旨

| | | | |
|--|---------|------|---|
| 審査区分 ①・論 | 第 533 号 | 氏 名 | 佐 藤 竜 太 |
| 審 査 委 員 会 委 員 | | 主査氏名 | 柴田 洋孝  |
| | | 副査氏名 | 白尾 國昭  |
| | | 副査氏名 | 奈須 家菜  |
| <p>論文題目 Angiopoietin-like protein 2 induces androgen-independent and malignant behavior in human prostate cancer cells (アンジオポエチン様因子 2 は前立腺癌細胞の悪性度と去勢抵抗性獲得を促進する)</p> <p>論文掲載雑誌名 Oncology Reports</p> <p>論文要旨 本論文は、血管新生因子アンジオポエチンと類似するアンジオポエチン様因子 2 (ANGPTL2) の泌尿器悪性腫瘍における意義を明らかにするために前立腺細胞株および前立腺癌組織を用いて検討したものである。前立腺癌細胞株 LNCaP では、ANGPTL ファミリーの中の ANGPTL2 が最も高発現を認めた。内因性 ANGPTL2 の発現を siRNA により抑制すると、LNCaP 細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が有意に低下した。また、アンドロゲン欠乏条件下で増殖する LNCaP/AI 細胞では、ANGPTL2 の発現が有意に亢進しており、siRNA-ANGPTL2 により、増殖能、遊走能、浸潤能ともに抑制された。</p> <p>次に、ANGPTL2 の安定発現細胞株を樹立したところ、アンドロゲン非依存性に増殖し、遊走能、浸潤能ともに亢進を認めた。以上より、ANGPTL2 は LNCaP 細胞のアンドロゲン非依存性の増殖、遊走、浸潤を誘導することが示された。ANGPTL2 は分泌蛋白で、その機能的受容体である Integrin $\alpha 5 \beta 1$ は LNCaP 細胞に発現しており、外因性に ANGPTL2 蛋白を添加すると遊走能が亢進し、抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体の添加により遊走能が阻害されたことから、ANGPTL2 は LNCaP 細胞から分泌され、自身の Integrin $\alpha 5 \beta 1$ 受容体を介して、遊走能の亢進をきたすことが示唆された。最後に、術前にアンドロゲン除去療法を行った前立腺癌組織では、行っていない組織都比べて、ANGPTL2 の発現亢進を認めた。</p> <p>以上の結果から、ANGPTL2 は前立腺癌細胞の悪性度を亢進させ、去勢抵抗性の獲得に関与すること示唆され、ANGPTL2 が前立腺癌、特に去勢抵抗性前立腺癌の新たな治療標的となり得る可能性が示唆された。</p> | | | |

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

| | | | |
|--|---------|--|-------|
| 審査区分 (課)・論 | 第 533 号 | 氏名 | 佐藤 竜太 |
| 審査委員会委員 | 主査氏名 | 柴田 洋孝 (印) | |
| | 副査氏名 | 白尾 国昭 (印) | |
| | 副査氏名 | 奈須 家栄 (印) | |
| <p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 去勢抵抗性前立腺がんの定義は何か？(ホルモン剤の自然耐性、獲得体制の観点から)。 2. ANGPTLs は分泌蛋白か？培養上清中の蛋白量を測定すべきではないか？ 3. ANGPTLs には血管新生作用はあるのか？ 4. ANGPTL2 以外の ANGPTLs の receptor も integrin α5β1 なのか？ 5. 正常前立腺組織、前立腺肥大症の組織の検討は行ったのか？ 6. 本研究で ANGPTL2 に着目した理由は何か？ 7. 細胞増殖のグラフの縦軸 cell number rate の数値は細胞数の絶対値による影響を受けないか？ 8. LNCaP/AI の作成についての記載がないが、自分たちで作成したのか？ 9. 4 種類の細胞株のうち、ANGPTL2 の発現が最も高かった DU145 で実験を行うのが適切と思われるが、LNCaP を用いたのはなぜか？ 10. Figure 1, Figure 3C, Figure 4C において、Student's t-test を行ったと記載しているが、多群間の比較には Student's t-test は不適切である。 11. Figure 1A において、異なる ANGPTLs の発現を RT-PCR で比較しても、primer によって PCR の増幅効率が異なるため、統計解析には意味がないのではないか？ 12. ANGPTL2 の安定発現細胞株の作製において、発現レベルの異なる株はいくつ作製したか？ 13. 前立腺がん患者の切除組織標本において、ホルモン療法を行わなかった患者より、ホルモン療法を行った患者で ANGPTL2 が強く染まったことについて考察は？このことと耐性獲得の機序との関連について説明せよ。 14. ANGPTL2 以外の ANGPTLs の発現は、LNCaP 以外の細胞株で検討したのか？ 15. Figure 8 において、染色強度はサンプルによって差があるはずなので、immunostaining score をつけて有意差があるかどうかを検討すべきではないか？ 16. LNCaP および前立腺癌組織における ANGPTL2 の免疫染色では細胞内局在が不明瞭である。 17. 乳がんなどのホルモン療法の耐性機序についてはどのような知見があるか？抗がん剤、分子標的薬などとは異なったものか？薬剤耐性の観点から今回の研究結果の位置づけについて説明せよ。 18. ANGPTL2 を標的とする治療が有効であると述べているが、ANGPTL2 の機能を阻害するような薬剤は存在するのか？また、integrin α5β1 の阻害剤はあるのか？ 19. 前立腺癌において、ANGPTL2 と同じように androgen insensitivity によって発現が変化する他の接着因子の報告はあるのか？ <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p> | | | |

(注) 不要の文字は 2 本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 佐藤 竜太

論 文 題 目

Angiopietin-like protein 2 induces androgen-independent and malignant behavior in human prostate cancer cells

(アンジオポエチン様因子 2 は前立腺癌細胞の悪性度と去勢抵抗性獲得を促進する)

要 旨

【目的】構造上は血管新生因子アンジオポエチン(Ang)と類似しているが、Ang の特異的受容体とは結合しない分泌型タンパクである、アンジオポエチン様因子(ANGPTLs)が同定されている。ANGPTLファミリーは全部で 7 種類存在し、脂質や糖の代謝や炎症制御等を示す。特に ANGPTL2 は糖尿病や皮膚癌、肺癌など様々な疾患の発症や進展への関与が報告されているが、泌尿器悪性腫瘍における ANGPTL2 に関する報告はない。今回我々は前立腺癌細胞株における ANGPTL2 の発現とその意義について検討した。

【研究対象及び方法】①アンドロゲン感受性前立腺癌細胞株 (LNCaP)にて ANGPTL の mRNA 発現を RT-PCR 法で比較した。また、その他の前立腺癌細胞株における ANGPTL2 の発現を Western blot・免疫染色にて確認した。②siRNA を導入し、ANGPTL2 の発現の違いによる増殖能、遊走能、浸潤能を検討した。③LNCaP と比較して有意に悪性度の高い、去勢抵抗性前立腺癌モデル LNCaP/AI と LNCaP の ANGPTL2 の発現を比較した。LNCaP/AI に siRNA を導入し、増殖能、遊走能、浸潤能を検討した。④LNCaP に ANGPTL2 cDNA 発現ベクターを遺伝子導入し、ANGPTL2 安定高発現細胞系

を樹立した。この細胞系での増殖能、遊走能、浸潤能を検討し、アンドロゲン除去培地における増殖能も検討した。⑤ ANGPTL2 の機能的受容体である Integrin $\alpha 5 \beta 1$ の発現を LNCaP において検討した。ANGPTL2 タンパクを添加して遊走能を検討すると同時に、抗 Integrin $\alpha 5 \beta 1$ 抗体を添加し、遊走能の変化を検討した。⑥ 前立腺全摘除術で得られた前立腺癌の臨床検体での ANGPTL2 の発現を免疫染色にて確認した。

【結果】① LNCaP において ANGPTL2 が高発現していた。また、その他の前立腺癌細胞でも ANGPTL2 の発現が確認された。② ANGPTL2 の発現を抑制すると LNCaP の増殖能、遊走能、浸潤能が有意に低下した。③ LNCaP と比較して有意に悪性度の高い LNCaP/AI では ANGPTL2 の発現が有意に亢進していた。LNCaP と同様に LNCaP/AI においても ANGPTL2 の発現を抑制すると増殖能、遊走能、浸潤能が有意に低下した。④ ANGPTL2 高発現細胞系はアンドロゲン非依存性の増殖を示した。遊走能、浸潤能も有意に亢進していた。⑤ Integrin $\alpha 5 \beta 1$ が LNCaP に発現しており、ANGPTL2 タンパクを添加すると遊走能が有意に亢進した。一方、抗 Integrin $\alpha 5 \beta 1$ 抗体を同時に添加すると遊走能が有意に阻害された。⑥ 術前にホルモン除去療法を行った前立腺癌の臨床検体ではホルモン除去療法を行っていない前立腺癌の臨床検体と比較して ANGPTL2 の発現が亢進していた。

【考察】 ANGPTL2 は前立腺癌細胞の悪性度を亢進させ、去勢抵抗性の獲得に関与していると考えられた。癌細胞自身が ANGPTL2 を分泌し、Integrin $\alpha 5 \beta 1$ 受容体を介して autocrine/paracrine 的作用で悪性度、去勢抵抗性の獲得を亢進させること、ホルモン療法後により多くの ANGPTL2 が誘導されることが示唆された。

【結論】 ANGPTL2 が前立腺癌、特に去勢抵抗性前立腺癌の新たな治療標的となり得る可能性が示唆された。