

【4】

氏 名	なか やま あき のり 中山 哲 成
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第800号
学位授与の日付	令和3年10月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (先端外科学)
学位論文題目	Effects of Curcumin combined with the 5-alpha reductase inhibitor Dutasteride on LNCaP prostate cancer cells (前立腺癌細胞LNCaPに対するデュタステリドとクルクミンの併用効果)
論文審査委員	(主査) 教授 釜 井 隆 男 (副査) 教授 麻 生 好 正 教授 高 倉 聡

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

アンドロゲンシグナル伝達経路は、前立腺細胞の増殖と分化だけでなく、発癌においても重要な役割を果たす。デュタステリドは、5 α 還元酵素阻害によりテストステロンからジヒドロテストステロンの変換を抑制し、前立腺組織内のジヒドロテストステロン濃度を減少させ、前立腺組織の縮小や抗アンドロゲン作用により前立腺特異抗原（Prostate specific antigen：PSA）を低下させる。一方、香辛料に含まれるポリフェノールの一種クルクミンは、DNA damage responseによるアポトーシスの誘導、アンドロゲン受容体の抑制効果、また、AKR1C2の発現上昇を介して、前立腺癌組織内のジヒドロテストステロン濃度を減少させることを我々は報告してきた（Cancer Sci. 2018；109：1230-1238.）

【目 的】

アンドロゲン依存性である前立腺癌細胞株LNCaPを用いて、デュタステリドとクルクミンによる相加効果の検討を試みた。

【対象と方法】

前立腺癌細胞株としてLNCaP細胞を用い、デュタステリドとクルクミンによる増殖能、アポトーシス、ならびにPSA産生能の定量的解析を行った。LNCaP細胞の培養液中にデュタステリドおよびクルクミンを投与し、Western blotting法を用いて、デュタステリドとクルクミン投与におけるDNA

damage responseの誘導、各種テストステロン関連合成酵素の発現を検討した。さらに前立腺癌細胞内のテストステロン、ジヒドロテストステロン濃度を液体クロマトグラフィ質量分析にて解析した。

【結 果】

1. 細胞増殖抑制効果とアポトーシスの誘導

クルクミンおよびデュタステリドを細胞培養液中に添加することにより、コントロールと比較して前立腺癌細胞の増殖を抑制した。また、クルクミンによりアポトーシスが誘導されたが、クルクミンとデュタステリドによる明らかな相加的作用は認められなかった。

2. テストステロン、ジヒドロテストステロン抑制効果

デュタステリド添加により、細胞内のテストステロン濃度は低下したが、クルクミンはさらに効果が高かった。テストステロンと同様にデュタステリド添加により、細胞内のジヒドロテストステロン濃度は低下したが、デュタステリドとクルクミンのあきらかな相加効果はみられなかった。デュタステリドとクルクミンの投与量をさげて、PSAについて検討を行ったところ、クルクミン5 μ Mの投与によりPSA産生に58%の低下がみられた。デュタステリドでは5 μ M投与により、PSA産生が48%低下した。またデュタステリドとクルクミンのPSA産生に対する効果は濃度依存的、相加的であった。

3. テストステロン関連合成酵素の発現ならびにDNA damage responseの検討

デュタステリドとクルクミン投与により、相加的にDNA damage responseに関わるリン酸化ATM、 γ H2AXが誘導されており、アポトーシスの指標であるPARPのcleavageを認めた。また、アンドロゲン受容体は濃度依存的に低下していた。AKR1C2のクルクミンによる発現上昇は認められたが、その他、各種テストステロン関連合成酵素発現の明らかな変化は認めなかった。

【考 察】

前立腺癌はすべての患者に積極的な治療が必要ではないため、正確なリスク評価とともに、増加する前立腺癌、特に臨床的に死に至るような悪性前立腺癌への進行をいかに予防するかが重要になってきている。デュタステリドを用いたREDUCE試験は、前立腺癌罹患のリスク減少について、その有効性と安全性を確認するために実施されたプラセボ対照ランダム化比較試験である。デュタステリドの投与によって、4年間の研究期間中に前立腺癌の発症のリスクは減少した。これらの結果からは、テストステロンの活性を抑制することが、前立腺癌のリスクを減少させていることが示唆される。本研究において、デュタステリドとクルクミンは前立腺癌細胞内のアンドロゲンシグナルにおいて、AKR1C2の発現上昇、5 α 還元酵素阻害により抑制的に働き、テストステロン、ジヒドロテストステロンの低下、それに伴うPSA産生の抑制効果から、前立腺癌に対して治療もしくは予防的に作用する可能性が示唆された。今後、前立腺全摘除後のPSAの生化学的再発患者を対象として、クルクミンのような副作用がほとんどない機能性食品とデュタステリドにより、PSAの生化学的再発を効果的に抑制できれば、患者のQOLを保つ有用な治療選択肢となるかもしれない。

【結 論】

デュタステリドとクルクミンは、前立腺癌細胞内のアンドロゲンシグナル伝達経路において抑制的に働き、前立腺癌の治療もしくは予防における相加効果が期待される。

論文審査の結果の要旨

【論文概要】

現在我が国の前立腺癌の罹患数は増加しており、2018年には男性癌罹患数第1位となった。前立腺癌発症のリスク因子の一つとしては、食事を中心とした欧米型へのライフスタイルの変化が指摘されている。申請者等は、これまでに抗酸化作用を有するクルクミンに着目し、これを内服することにより前立腺腫瘍マーカーである前立腺特異抗原（prostate specific antigen：PSA）が低下することを見出してきた。一方、前立腺癌がアンドロゲン依存性であることから、テストステロンより活性の高いジヒドロテストステロンへの変換を阻害するデュタステリドを内服することにより、低悪性度の前立腺癌罹患率を低下させるとの報告がある。

申請論文は、クルクミンとデュタステリドを前立腺癌細胞株LNCaPに投与し、その増殖能、アポトーシス、およびPSA産生能の変化について定量的解析を行い、western blotting法を用いて、クルクミンとデュタステリド投与におけるDNA damage responseの誘導、各種テストステロン関連合成酵素の発現を検討している。さらに前立腺癌細胞内のテストステロン、ジヒドロテストステロン濃度を質量分析法にて解析している。

その結果、クルクミンによりLNCaPのアポトーシスが誘導されること、クルクミンおよびデュタステリドを併用すると、より強くLNCaP内でのアンドロゲン合成経路が阻害され、LNCaP増殖およびPSA産生が低下することを見出している。

以上のことから、クルクミンおよびデュタステリドが、実臨床において、前立腺癌発症予防だけでなく、前立腺癌治療後再発に対する後治療の選択肢の一つとなる可能性が示唆された。

【研究方法の妥当性】

申請論文は、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株として用いられるLNCaPを使用し、これにクルクミンやデュタステリドを投与することで、その増殖抑制効果、また抑制メカニズムについて、western blotting法、liquid chromatograph-mass spectrometry（LC-MS/MS）およびenzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）といった測定法により客観的に検討を行っている。適切な試料および測定法が選択されており、本研究は妥当なものと考えられる。

【研究結果の新奇性・独創性】

これまでに申請者等は、抗酸化作用をもつイソフラボンやクルクミンを内服することにより血清PSAが低下することや、クルクミンを前立腺癌動物モデルに投与することにより増殖抑制効果を認めることを報告してきた。申請論文では、クルクミンとデュタステリドを併用することにより、in vitroにおいて前立腺癌細胞株LNCaPの増殖抑制効果がさらに強まることを見出している。この点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文は、代表的な前立腺癌細胞株LNCaPを使用し、適切な条件および測定法にて、クルクミンおよびデュタステリドがLNCaPに及ぼす影響について検討している。そこから導き出された結果は客観的かつ再現性があり、考察および結論も論理的に矛盾するものではなく、妥当なもの判断する。

【当該分野における位置付け】

前立腺癌疫学において、その発症に食生活等の環境因子が関与しているのか、また発症予防に機能性食品が有効であるか等に関しては、エビデンスレベルの高い報告が少ない。前立腺癌ガイドライン2016においても、抗酸化作用をもつ機能性食品が前立腺癌予防に有効との見解は未だエビデンスレベルが低く、化学予防薬として取り上げられているデュタステリドも同様である。申請論文は、抗酸化作用をもつクルクミンが前立腺癌細胞株の増殖を抑制すること、さらにはデュタステリドを併用することで、その効果が増強されることをin vitroで示している。またクルクミンやデュタステリドが、前立腺癌術後のPSA生化学的再発患者に対しても有効となる可能性にも言及している。これは前立腺癌予防や後治療として新しい治療体系を提案する内容であり、大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、臨床において前立腺癌予防や後治療を経験する中で、検討すべき事項を見出し、それを検証するための実験を計画、遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌に掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

In Vivo

(35 : 1443-1450, 2021)