

令和元年5月20日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11000

研究課題名(和文) 前立腺癌細胞分化の揺らぎによる去勢抵抗性獲得機構

研究課題名(英文) Mechanisms for development of castration resistance by fluctuation of the differentiation in human prostate cancer cells

研究代表者

石井 健一郎 (Ishii, Kenichiro)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90397513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌への進展機構としてホルモン療法後に生じる癌間質構造の多様性に着目した。癌間質を構成するactiveな線維芽細胞は細胞増殖因子やサイトカイン、細胞外マトリックスの構築などを介し、前立腺癌の悪性・進展を促進させる。ヒト前立腺癌患者由来線維芽細胞とヒト前立腺癌細胞をin vitro共培養したところ、いくつかの線維芽細胞は癌細胞における癌抑制遺伝子の発現量を有意に低下させた。一方で、癌遺伝子の発現量を有意に増加させる線維芽細胞も確認された。つまり、activeな線維芽細胞は癌細胞の増殖に関わるだけでなく、癌細胞の分化状態をも変化させ、去勢抵抗性の獲得に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行性前立腺癌に対するホルモン療法は約4割の患者にしか効果がなく、残りの6割は初めからホルモン療法に反応しないか、最初は効果が認められるものの徐々に効果が減弱し、最終的に去勢抵抗性前立腺癌へと進展することが大きな課題である。我々は前立腺癌の去勢抵抗性獲得には癌細胞周囲に存在する線維芽細胞からのパラクライン的な刺激が重要な役割を担うと考えている。今回の結果は、進行性前立腺癌に対する治療としてホルモン療法だけでは不十分であり、癌微小環境を構成するactiveな線維芽細胞の増殖や機能を阻害することが去勢抵抗性前立腺癌への進展を抑制する有用な治療法となる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In the tumor microenvironment, heterogeneous stromal component of prostate cancer (PCa) tissue contains multiple populations of fibroblasts that are associated with tumorigenesis. Fibroblasts secrete a number of growth factors, cytokines, ECM proteins, and miRNAs that stimulate progression of PCa cells. In this study, we investigated the effects of fibroblasts on androgen-sensitive human PCa cell line LNCaP focusing on the expression of cancer-related genes. As for tumor suppressor genes, mRNA expression of NKX3-1 in LNCaP cells was decreased by co-culturing with fibroblasts. As for oncogenes, mRNA expressions of NFKB1 and SRC in LNCaP cells was increased by co-culturing with fibroblasts. Our data showed that mRNA expressions of cancer-related genes in LNCaP cells were highly disturbed by co-culturing with fibroblasts. The use of PCa patients-derived fibroblasts may allow us to investigate the characteristics of aggressive fibroblasts in the development of castration-resistant PCa.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 ホルモン療法 癌細胞分化 線維芽細胞の多様性 前立腺癌患者由来線維芽細胞
in vitro共培養実験 癌抑制遺伝子 癌遺伝子

1. 研究開始当初の背景

現在、根治切除が不可能な進行性前立腺癌患者に対して、外科的な去勢術もしくは薬物によって去勢状態をもたらすホルモン療法が広く行われている。しかし、これらの治療が奏功する期間に限られており、患者の多くは去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer: CRPC) と呼ばれる状態となり、その治療は依然として困難を極める。CRPC 患者の癌細胞はアンドロゲン依存性が低下・喪失しているだけでなく、ドセタキセル等の抗癌剤への反応性も乏しい低分化な uncontrollable cancer cells である。前立腺癌細胞の発生および悪性化を細胞生物学的に考えると、遺伝子変異や癌化に関わるエピジェネティック異常により発生する初期の癌細胞は、その元となる成熟上皮細胞の性質を保持している、つまり高分化な controllable cancer cells である。我々は前立腺癌の治療において、癌細胞を高分化で維持することができれば、uncontrollable な CRPC へと進展することもなく、放射線や薬物治療の効果を持続できると考えている。

受精卵から個体が形成される一連の過程において、細胞分化は「振り子」のように揺らいでいる。細胞が増殖を繰り返し、周囲細胞との相互作用を介して細胞分化の揺らぎ幅は次第に小さくなっていく。つまり、高分化な成熟上皮細胞というのは細胞分化の揺らぎ幅が小さくなった結果、特定の機能を獲得した細胞と言える。一方、発生初期の癌細胞は細胞分化の揺らぎ幅が小さく、元となる成熟上皮細胞の性質を維持している高分化な controllable cancer cells と捉えることができる。しかし、何らかの原因で癌細胞の揺らぎ幅が大きくなると低分化な uncontrollable cancer cells へと悪性化する。この点について我々は、進行性前立腺癌患者に対するホルモン療法が癌細胞分化の揺らぎ幅を大きくする理由の1つと考えている。

例えば、去勢下で発現上昇する細胞増殖因子のうち、FGF-7/KGF は前立腺の発生や形態形成過程で上皮細胞に働きかける間質由来因子であり、アンドロゲン非存在下でも前立腺を発生させる程の強力なアンドロゲン様作用を有する。そのため、前立腺癌間質に FGF-7/KGF 発現線維芽細胞が存在していれば、ホルモン療法下でも癌細胞のアンドロゲン受容体 (AR) シグナルを活性化させることができ、高分化な controllable cancer cells として維持できることが期待される。一方、FGF-7/KGF 非発現線維芽細胞であれば癌細胞の AR シグナルを活性化できない、つまり癌細胞の分化を維持できないために uncontrollable cancer cells へと悪性化し、予後不良の CRPC へと進展するのかもしれない。

2. 研究の目的

我々は、ホルモン療法による前立腺癌間質リモデリングの誘導が癌細胞分化の揺らぎ幅を大きくし、低分化な uncontrollable cancer cells へと導いてしまうことが CRPC への進展機構の1つになると考えている。そこで、複数の前立腺癌患者の針生検組織から初代培養した線維芽細胞から成る「みえ泌尿器疾患線維芽細胞パネル」を活用し、癌細胞と組み合わせる線維芽細胞の性質によって癌細胞の分化状態が変化するメカニズムを科学的に解明する。最終目標はホルモン療法と併用可能な、癌細胞分化の揺らぎを抑制する新たな治療薬・治療法を開発し、CRPC への進展を阻止することである。

3. 研究の方法

(1) 使用した細胞

アンドロゲン感受性ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞、その亜株でアンドロゲン低感受性 E9 および F10 細胞は LNCaP 細胞を限外希釈することにより単離した。アンドロゲン不応性 AIDL 細胞は LNCaP 細胞をホルモン除去下で長期間、培養することにより樹立した。正常ヒト前立腺線維芽細胞 PrSC は Lonza 社から購入し、ヒト前立腺癌関連線維芽細胞 (carcinoma-associated fibroblasts: CAFs) モデル pcPrFs は前立腺癌患者の針生検検体から初代培養することにより作製した。PrSC および pcPrFs はストローマ細胞培地キット (Lonza 社) にて継代維持した。

(2) *in vitro* 共培養実験

前立腺間質における線維芽細胞の多様性がヒト前立腺癌細胞に与える影響を検討する目的で、pcPrFs と LNCaP 細胞もしくは亜株 (E9, F10, AIDL 細胞) との *in vitro* 共培養実験を施行した。実験では PrSC を比較対象細胞とし、pcPrFs シリーズ: M5, M6, M7, M10, M11, M18, M23, M24, M26, M31 を用いた。

【評価 1】BD Falcon セルカルチャーインサートを用いた *in vitro* 共培養実験では、LNCaP 細胞の亜株 (E9, F10, AIDL 細胞) に対して PrSC および pcPrFs (-M5, -M6, -M7) それぞれを組み合わせ、4 日間の共培養を行った後に、LNCaP 細胞の細胞増殖率、分泌タンパク質量、細胞内タンパク質発現量および細胞内シグナル伝達経路の活性について比較検討した。

【評価 2】LNCaP 細胞に対して PrSC および pcPrFs それぞれを組み合わせ、24 時間および 48 時間の共培養を行った後に、LNCaP 細胞における癌抑制遺伝子 (*TP53*, *NKX3-1*, *CDKN2A*) および癌遺伝子 (*NFKB1*, *SRC*, *MYC*) の mRNA 発現量の変化を TaqMan probe を用いたリアルタイム PCR にて比較検討した。

4 . 研究成果

(1) 前立腺癌細胞内 AR シグナルに対する線維芽細胞の影響

LNCaP 細胞の亜株 (E9, F10, AIDL 細胞) と pcPrFs (-M5, -M6, -M7) との *in vitro* 共培養により、E9 および AIDL 細胞の増殖率は有意に上昇した。一方、pcPrFs と共培養した F10 細胞の増殖率に変化は認められなかった。pcPrFs との共培養による癌細胞内 AR シグナルの活性化 (前立腺特異抗原 prostate-specific antigen: PSA 発現量の増加) は E9 細胞においてのみ観察された。幾つかの増殖因子 (精製タンパク質) は E9 細胞の増殖率を有意に上昇させたが、F10 細胞では増殖が抑えられる増殖因子 (精製タンパク質) も確認された。精製 EGF 処理した E9 および AIDL 細胞の増殖率は有意に上昇するとともに、リン酸化 Akt および MAPK タンパク質発現量が顕著に増加した。一方、F10 細胞の増殖率は精製 EGF 処理でも変化しなかった。さらに、精製 EGF 処理した F10 細胞ではリン酸化 Akt および MAPK タンパク質発現量に変化は認められなかった。精製 EGF 処理した E9 細胞からの PSA 分泌量は有意に増加した。F10 細胞では AR のスプライスバリエント AR-V7 の発現を認めた。

以上の結果より、我々は LNCaP 細胞を親株とした 2 つのアンドロゲン低感受性の亜株 (E9 および F10 細胞) を用いることで、アンドロゲン低感受性という共通の特徴を有する癌細胞であっても線維芽細胞からのパラクライン刺激に反応する癌細胞 (E9 細胞) と反応しない癌細胞 (F10 細胞) が共存している可能性を明らかにした。また、アンドロゲン不応性の癌細胞 (AIDL 細胞) であっても線維芽細胞からのパラクライン刺激に反応したことは、ホルモン療法が無効な低分化な前立腺癌細胞に対しては癌細胞内シグナル伝達経路が重要な治療標的となることを示唆するものと考えた。

(2) 癌関連遺伝子発現に対する線維芽細胞の影響

PrSC および pcPrFs (-M5, -M6, -M7, -M10, -M11, , -M18, -M23, -M24, -M26, -M31) との *in vitro* 共培養において、いずれの線維芽細胞との共培養群でも LNCaP 細胞における *TP53* および *CDKN2A* mRNA 量に明らかな変化は認められなかった。一方、*NKX3-1* mRNA 発現量は複数の pcPrFs (-M6, -M7, -M10, -M11) との共培養群で低下することが明らかとなった。また、*NFKB1* および *SRC* mRNA 発現量は複数の pcPrFs (-M6, -M7, -M24, -M26) との共培養群で増加したものの、*MYC* mRNA 発現量に明らかな変化は認められなかった。

以上の結果より、pcPrFs が産生・分泌するパラクライン因子として、癌細胞内 AR シグナルを活性化させる増殖因子やサイトカインだけでなく、癌細胞の分化に関わる癌遺伝子発現を変動させる、例えばエクソソームに内包される miRNA が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- 1) **Ishii K**, Sasaki T, Iguchi K, Kato M, Kanda H, **Hirokawa Y**, Arima K, Watanabe M, **Sugimura Y**. Pirfenidone, an anti-fibrotic drug, suppresses the growth of human prostate cancer cells by inducing G₁ cell cycle arrest. *Journal of Clinical Medicine*, 8: E44, 2019. (査読あり)
DOI: 10.3390/jcm8010044
- 2) Sasaki T, Franco OE, Ohishi K, **Ishii K**, Crawford SE, Takahashi N, Katayama N, **Sugimura Y**, Hayward SW. Nilotinib, a tyrosine kinase inhibitor, decreases androgen receptor and prostate-specific antigen expression. *Prostate*, 79: 259-264, 2019. (査読あり)
DOI: 10.1002/pros.23730
- 3) **Ishii K**, Takahashi S, **Sugimura Y**, Watanabe M. Role of stromal paracrine signals in proliferative diseases of the aging human prostate. *Journal of Clinical Medicine*, 7: 68, 2018. (査読あり)
DOI: 10.3390/jcm7040068
- 4) **Ishii K**, Sasaki T, Iguchi K, Kajiwara S, Kato M, Kanda H, **Hirokawa Y**, Arima K, Mizokami A, **Sugimura Y**. Interleukin-6 induces VEGF secretion from prostate cancer cells in a manner independent of androgen receptor activation. *Prostate*, 78: 849-856, 2018. (査読あり)
DOI: 10.1002/pros.23643
- 5) **Ishii K**, Matsuoka I, Kajiwara S, Sasaki T, Miki M, Kato M, Kanda H, Arima K, **Shiraishi T**, **Sugimura Y**. Additive naftopidil treatment synergizes docetaxel-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144: 89-98, 2018.(査読あり) DOI: 10.1007/s00432-017-2536-x
- 6) Iwamoto Y, **Ishii K**, Kanda H, Kato M, Miki M, Kajiwara S, Arima K, **Shiraishi T**, **Sugimura Y**. Combination treatment with naftopidil increases the efficacy of radiotherapy in PC-3 human prostate cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 143: 933-939, 2017. (査読あり)
DOI: 10.1007/s00432-017-2367-9
- 7) Sasaki T, **Ishii K**, Iwamoto Y, Kato M, Miki M, Kanda H, Arima K, **Shiraishi T**, **Sugimura Y**. Fibroblasts prolong serum prostate-specific antigen decline after androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Laboratory Investigations*, 96: 338-349, 2016. (査読あり)
DOI: 10.1038/labinvest.2015.136

〔学会発表〕(計 18 件)

- 1) The American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2019 (平成 31 年 3 月 29 日 - 4 月 3 日)Atlanta (USA):Loss of fibroblasts-dependent androgen receptor activation in prostate cancer cells develops castration-resistant prostate cancer : **Ishii K**, Matsuoka I, Sasaki T, Kato M, Nishikawa K, Kanda H, **Hirokawa Y**, Iguchi K, Arima K, Watanabe M, **Sugimura Y**
- 2) 第 77 回 日本癌学会学術総会 (平成 30 年 9 月 27 - 29 日)大阪国際会議場 (大阪府・大阪市): Characterization of human prostate cancer LNCaP sublines differing in androgen-sensitivity: interactions between cancer cells and fibroblasts : **Ishii K**, Kajiwara S, Iguchi K, Kato M, **Hirokawa Y**, Arima K, Watanabe M, **Sugimura Y**
- 3) 第 77 回 日本癌学会学術総会 (平成 30 年 9 月 27 - 29 日)大阪国際会議場 (大阪府・大阪市): Fibroblasts disturb the expression of cancer-related genes in non-transformed human prostatic epithelial cell line BPH-1 : Kato M, **Ishii K**, Kajiwara S, **Hirokawa Y**, Arima K, Watanabe M, **Sugimura Y**
- 4) 第 33 回 発癌病理研究会 (平成 30 年 8 月 29 - 31 日)御殿場高原リゾート 時之栖 (静岡県・御殿場市): 前立腺間質リモデリングは前立腺癌の発生にどう関わるのか: **石井健一朗**、**梶原進也**、**佐々木 豪**、**臼杵 恵梨**、**渡邊 昌俊**、**杉村 芳樹**
- 5) 第 5 回 前立腺生物学シンポジウム (平成 30 年 7 月 12 - 13 日)鳥羽国際ホテル (三重県・鳥羽市): 前立腺癌微小環境における細胞間相互作用 : **石井 健一朗**、**杉村 芳樹**
- 6) 第 107 回 日本病理学会総会 (平成 30 年 6 月 21 - 23 日)ロイトン札幌 (北海道・札幌市): Fibroblasts preserve androgen receptor signaling in prostate cancer cells under androgen deprivation : **Ishii K**, Matsuoka I, Sasaki T, Kajiwara S, Kanda H, **Hirokawa Y**, Iguchi K, Arima K, Watanabe M, **Sugimura Y**

- 7) 第106回 日本泌尿器科学会総会(平成30年4月19-22日)京都国際会議場(京都府・京都市): 前立腺癌間質の多様性は前立腺癌不均一性にどう影響するのか: 石井 健一朗、梶原 進也、吉川 裕美、佐々木 豪、三木 学、加藤 学、神田 英輝、有馬 公伸、渡邊 昌俊、杉村 芳樹
- 8) 第106回 日本泌尿器科学会総会(平成30年4月19-22日)京都国際会議場(京都府・京都市): 癌間質への反応性により異なる去勢抵抗性前立腺癌への進展機構: 松尾 いづみ、石井 健一朗、佐々木 豪、三木 学、梶原 進也、加藤 学、神田 英輝、有馬 公伸、渡邊 昌俊、杉村 芳樹
- 9) 第33回 前立腺シンポジウム(平成29年12月9-10日)東京コンファレンスセンター(東京都・品川区): 前立腺癌微小環境における細胞間相互作用リガンド非依存的なアンドロゲン受容体活性化機構の多様性から考える前立腺癌治療の課題と展望: 石井 健一朗、佐々木 豪、渡邊 昌俊、杉村 芳樹
- 10) 第76回 日本癌学会学術総会(平成29年9月28-30日)パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市): Aberrant activation of androgen-low-sensitive prostate cancer cells-fibroblasts interactions under androgen deprivation: 石井 健一朗、井口 和弘、梶原 進也、加藤 学、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
- 11) 第76回 日本癌学会学術総会(平成29年9月28-30日)パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市): Role of epithelial-fibroblasts interactions in initiation of prostate cancer: 梶原 進也、石井 健一朗、加藤 学、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 12) 第105回 日本泌尿器科学会総会(平成29年4月21-24日)城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市): 前立腺癌関連線維芽細胞の自律的増殖機構: 石井 健一朗、梶原 進也、佐々木 豪、三木 学、加藤 学、神田 英輝、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 13) 第105回 日本泌尿器科学会総会(平成29年4月21-24日)城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市): 前立腺癌進展におけるリガンド非依存的なアンドロゲン受容体活性化分子機構: 松岡 いづみ、石井 健一朗、佐々木 豪、三木 学、梶原 進也、加藤 学、神田 英輝、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 14) 第75回 日本癌学会学術総会(平成28年10月6-8日)パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市): 前立腺癌微小環境における間質性細胞間相互作用の異常活性化: 石井 健一朗、加藤 学、有馬 公伸、溝上 敦、白石 泰三、杉村 芳樹
- 15) 111st American Urological Association Annual Meeting(平成28年5月6-10日)San Diego (USA): A new insight of cell-cell interactions in tumor stroma of prostate cancer: Ishii K, Sasaki T, Miki M, Kato M, Kanda H, Arima K, Shiraishi T, Sugimura Y
- 16) 111st American Urological Association Annual Meeting(平成28年5月6-10日)San Diego (USA): Fibroblasts prolong serum prostate-specific antigen decline after androgen deprivation therapy in prostate cancer: Sasaki T, Ishii K, Miki M, Kanda H, Arima K, Shiraishi T, Sugimura Y
- 17) 第104回 日本泌尿器科学会総会(平成28年4月23-25日)仙台国際センター(宮城県・仙台市): 前立腺癌関連線維芽細胞の自律的増殖機構: 石井 健一朗、佐々木 豪、三木 学、加藤 学、神田 英輝、有馬 公伸、溝上 敦、白石 泰三、杉村 芳樹
- 18) 第104回 日本泌尿器科学会総会(平成28年4月23-25日)仙台国際センター(宮城県・仙台市) 既存医薬品のオフターゲット効果を活用した去勢抵抗性前立腺癌治療への新規アプローチ: 松岡 いづみ、石井 健一朗、佐々木 豪、三木 学、加藤 学、神田 英輝、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：広川 佳史
ローマ字氏名：(HIROKAWA, yoshifumi)
所属研究機関名：三重大学
部局名：医学系研究科
職名：講師
研究者番号（8桁）：30322738

研究分担者氏名：杉村 芳樹
ローマ字氏名：(SUGIMURA, yoshiki)
所属研究機関名：三重大学
部局名：医学系研究科
職名：リサーチアソシエイト
研究者番号（8桁）：90179151

研究分担者氏名：白石 泰三
ローマ字氏名：(SHIRAISHI, taizo)
所属研究機関名：三重大学
部局名：医学系研究科
職名：客員教授
研究者番号（8桁）：30162762

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。