

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16690

研究課題名(和文) 癌間質と去勢抵抗性前立腺癌；スプライシングバリエント制御による新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Effects of prostate cancer associated fibroblasts in the expression of aberrant androgen splicing variants in prostate cancer cells

研究代表者

佐々木 豪 (Sasaki, Takeshi)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20644941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)において、血中循環前立腺癌細胞にアンドロゲン受容体スプライシングバリエント(ARVs)の発現が見られた場合、新規AR阻害薬も無効である。癌関連線維芽細胞(CAFs)を中心とする癌微小環境が、前立腺癌細胞の細胞内シグナルを活性化し、治療抵抗性ARVsの発現を誘導するという仮説を立て、前立腺癌細胞株におけるARVs発現に対する前立腺線維芽細胞の役割を検討した。その結果、一部の癌関連線維芽細胞が前立腺癌細胞におけるARVs発現を上昇させることを明らかにした。前立腺癌関連線維芽細胞由来パラクライン刺激による前立腺癌細胞のARVs発現修飾作用の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

本研究結果から、前立腺癌間質の多様性に着目した、前立腺癌関連線維芽細胞(CAFs)由来パラクライン刺激による前立腺癌細胞のアンドロゲン受容体スプライシングバリエント(ARVs)発現修飾作用の可能性が示唆された。治療前のCAFの性状解析を行い、CAF由来ARVs発現誘導因子を阻害することで癌細胞のARVs発現上昇を阻止し、長期に治療奏効性を維持できる可能性が示された。これまでの画一的なホルモン治療と異なり、個々の患者に合わせ、癌間質をターゲットとした治療薬の併用というオーダーメイド医療の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：Expression of androgen receptor (AR) splice variant (AR-V) has been identified as the mechanism associated with the development of castration-resistant prostate cancer (PCa). However, the mechanisms mediating increased expression of aberrant AR-Vs in PCa are still largely unknown. The purpose of this study was to identify if prostate fibroblasts in tumor stroma induces the expression of aberrant AR-Vs in PCa. We investigated the mRNA expression of AR, PSA, AR-V1, AR-V567es, AR-V7, and its target genes by co-cultured with three fibroblasts lines (PrSC, pcPrFs-M28, and pcPrFs-M31). mRNA expression of AR, AR-V1, and AR-V7 in LNCaP cells were increased by co-culture with pcPrFs-M28 but not with PrSC and pcPrFs-M31. Primary cultured prostate fibroblasts from prostate cancer specimens increased expression of aberrant AR-V1 and AR-V7 in PCa cells. Prostate fibroblasts in tumor stroma may be a target for the treatment preventing the expression of aberrant AR-Vs in PCa.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 癌関連線維芽細胞 スプライシングバリエント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢社会における前立腺癌の増加が医療社会的に注目されている。実際、2017年のわが国におけるがん統計予測(国立がん研究センターホームページ)では、男性癌のうち、前立腺癌はがん罹患数で胃癌、肺癌に次ぐ第3位(86100人)、がん死亡数で肺癌、胃癌、大腸癌、肝臓癌、膵臓癌に次ぐ第6位(12200人)になると予測される。

前立腺組織の発生、増殖、癌化においてアンドロゲン受容体(AR)とアンドロゲンが中心的な役割を担っており、進行性前立腺癌に対する第一選択治療は内分泌療法(完全アンドロゲン除去療法、去勢療法)である。進行性前立腺癌は、治療開始後1-2年は約80%の患者で制癌作用を示すが、3-5年後にその半数以上に再び癌の増殖がみられる去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)となり、癌死に至る。近年、CRPCに対する新規アンドロゲン受容体(AR)阻害薬が開発され、予後の改善が期待されるが、一方で、血中循環前立腺癌細胞にアンドロゲン受容体スプライシングバリエーション(ARVs)の発現が見られた場合、新規AR阻害薬も無効であることが報告されている(Antonarakis, et al. New Engl J Med 2014)。

スプライシングは、高等真核生物においてmRNA前駆体からイントロンを除去し、エクソン同士を繋ぎ合わせる遺伝子発現に必須な過程であり、遺伝子発現の多様性に重要な役割を果たしている。すべてのエクソンがその順番を変えずに連結される恒常的スプライシングと、一部のエクソンが欠損し、異なる組み合わせから生み出される選択的スプライシングが存在する。選択的スプライシングによる遺伝子発現は、蛋白質の多様性を生み出し、生命維持に重要な役割を果たしている。一方で、スプライシング異常に起因する疾患も報告されている。ARは8つのエクソンを有し、ARVsは約21種類報告されており、一部のARVsはリガンドであるアンドロゲンが結合することなく、恒常的に活性化されたARを誘導し、前立腺上皮細胞の異常増殖を来す。特にARV7の発現は、内分泌治療後の腫瘍内アンドロゲンレベルの低下とともに上昇し、新規AR阻害薬抵抗性を示すことが知られている。詳細なメカニズムは未解決であるが、低アンドロゲン環境下を補う形でARVsが発現する可能性が示唆されている。

現在、進行性前立腺癌に対する内分泌療法が第一選択治療であるが、内分泌治療自体が治療抵抗性ARVsを生み出している可能性があり、長期治療奏効性を維持するためにも、ARVs発現上昇を阻止し、致死的なCRPCへの進展を防ぐことが非常に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、癌関連線維芽細胞(Cancer associated fibroblasts; CAFs)を中心とする癌微小環境が、前立腺癌細胞の細胞内シグナルを活性化し(NF- κ Bシグナルを候補とする)、治療抵抗性ARVsの発現を誘導するという仮説を立て、CAFsの多様な表現型を解析することで、ARVs発現誘導因子を同定する。CAF由来ARVs発現誘導因子を阻害することで、癌細胞のARVs発現上昇を阻止し、長期に治療奏効性を維持するという新規治療戦略を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

細胞株

本研究は三重大学医学部倫理委員会の承認を受け、対象となる患者には口頭ならびに書面で説明の上、本人の同意が得られた検体を使用した。前立腺生検標本から前立腺線維芽細胞の初代培養を行った。組織を5mm³に細切り、1×PBSで洗浄、0.05% Trypsin-EDTAで酵素消化を行った後、間質細胞基本培地(SCBM™)にて培養した。正常ヒト前立腺ストローマ細胞PrSCはLonza社から購入し、アンドロゲン感受性前立腺癌細胞株(LNCaP細胞、22Rv1細胞)はATCC社から購入した。

in vitro 共培養試験

トランスウェルチャンバーを用い、10%FBS-RPMI環境下で前立腺癌細胞株(LNCaP細胞、22Rv1細胞)とPrSCまたは初代培養前立腺線維芽細胞との共培養を行い、LNCaP細胞、22Rv1細胞の細胞内挙動を評価した。

4. 研究成果

平成30年度

本年度は、前立腺生検標本から前立腺線維芽細胞の初代培養を行った。それら前立腺線維芽細胞を用い、*in vitro*でアンドロゲン感受性前立腺癌細胞(LNCaP細胞、22Rv1細胞)と前立腺線維芽細胞とを共培養し、AR、PSA、ARV1、ARV7、ARV567esのmRNA発現を解析した。またAR抗体(N-20)を用いて共培養によるLNCaP、22Rv1における蛋白発現も解析した。ヒト前立腺癌細胞のARVs発現修飾作用を有する可能性のあるCAF候補因子の同定を行った。

【検討結果】初代培養で得られた前立腺癌患者由来線維芽細胞のうち、一部のCAFsとの共培養でのみLNCaP細胞のARV1、ARV7のmRNA発現が上昇することを見出した。22Rv1細胞のAR、ARVs蛋白発現はいずれのCAFsとの共培養でも上昇した。

初代培養で得られた前立腺癌患者由来線維芽細胞がヒト前立腺癌細胞の ARVs 発現修飾作用を有する可能性が示された。

令和元年度

本年度は、初代培養で得られた前立腺癌患者由来線維芽細胞のうち 2 検体を用い、アンドロゲン感受性前立腺癌細胞株 (LNCaP 細胞) との共培養を行い、LNCaP 細胞の mRNA を回収後、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行い、ARVs 発現修飾作用を規定する線維芽細胞由来因子の同定を試みた。

【検討結果】 前立腺癌患者由来線維芽細胞との共培養により LNCaP 細胞の FBX011、GAL3ST1、EPHA5 は発現が低下し、RAET1E、P2RY2、IL-4R、IL7、NRG3、SVIL は発現が増加した。

前立腺癌患者由来の線維芽細胞が分泌するパラクライン因子のうち、ARVs 発現修飾作用を規定する複数のパラクライン因子の候補を見出した。

本研究から、前立腺癌間質の多様性に着目した、前立腺癌関連線維芽細胞由来パラクライン刺激による前立腺癌細胞の ARVs 発現修飾作用の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasaki T, Sugimura Y	4. 巻 7
2. 論文標題 The Importance of Time to Prostate-Specific Antigen (PSA) Nadir after Primary Androgen Deprivation Therapy in Hormone-Negative Prostate Cancer Patients.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Med	6. 最初と最後の頁 565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm7120565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miki M, Ishii K, Sasaki T, Kato M, Kajiwara S, Kanda H, Arima K, Hirokawa Y, Watanabe M, Sugimura Y.	4. 巻 36
2. 論文標題 Predicting the tumorigenic phenotype of human bladder cancer cells by combining with fetal rat mesenchyme.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Urol Oncol	6. 最初と最後の頁 472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.urolonc.2018.07.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishii K, Sasaki T, Iguchi K, Kajiwara S, Kato M, Kanda H, Hirokawa Y, Arima K, Mizokami A, Sugimura Y.	4. 巻 78
2. 論文標題 Interleukin-6 induces VEGF secretion from prostate cancer cells in a manner independent of androgen receptor activation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Prostate.	6. 最初と最後の頁 849-856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pros.23643.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishii K, Matsuoka I, Kajiwara S, Sasaki T, Miki M, Kato M, Kanda H, Arima K, Shiraishi T, Sugimura Y.	4. 巻 144
2. 論文標題 Additive naftopidil treatment synergizes docetaxel-induced apoptosis in human prostate cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cancer Res Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 89-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-017-2536-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki T, Franco OE, Ohishi K, Filipovich Y, Ishii K, Crawford SE, Takahashi N, Katayama N, Sugimura Y, Hayward SW.	4. 巻 79
2. 論文標題 Tyrosine kinase inhibitor therapy prescribed for non-urolologic diseases can modify PSA titers in urology patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Prostate	6. 最初と最後の頁 259-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pros.23730	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishii K, Matsuoka I, Sasaki T, Nishikawa K, Kanda H, Imai H, Hirokawa Y, Iguchi K, Arima K, Sugimura Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Loss of Fibroblast-Dependent Androgen Receptor Activation in Prostate Cancer Cells is Involved in the Mechanism of Acquired Resistance to Castration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Med	6. 最初と最後の頁 1379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8091379	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takeshi Sasaki, Omar E. Franco, Yana Filipovich, LaTayia Aaron, Philip Fitchev, Douglas W. Strand, Susan E. Crawford, Simon W. Hayward
2. 発表標題 Long-term leptin administration reduces prostatic epithelial hyperplasia in the obob mouse model
3. 学会等名 AUA - 第113回米国泌尿器学会議 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木豪、杉村芳樹、Simon W. Hayward
2. 発表標題 遺伝的肥満ob/obマウス前立腺上皮過形成における長期レプチン投与の影響
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木豪、大石晃嗣、石井健一朗、高橋直人、片山直之、杉村芳樹
2. 発表標題 チロシキナーゼ阻害剤、ニロチニブによる前立腺癌細胞に対するオフターゲット効果
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木豪、大和俊介、渡邊晋、杉野友亮、加藤学、舛井覚、西川晃平、吉尾裕子、神田英輝
2. 発表標題 前立腺癌における癌関連線維芽細胞性状解析の臨床的有用性
3. 学会等名 第69回日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----