

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K09713
 研究課題名(和文) イムノコンプレキソーム解析法を用いた去勢抵抗性前立腺癌特異的病態関連因子の検討

研究課題名(英文) A study of specific pathological features of castration-resistant prostate cancer using immune complexome analysis

研究代表者
 酒井 英樹 (Sakai, Hideki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：40235122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Large tumor suppressor 2 (LATS2) はアンドロゲン依存性に前立腺癌の抑制因子として機能し、前立腺癌ホルモン療法の治療効果および予後の有力な予測因子と考えられた。Stage-specific embryonic antigen (SSEA)-4は去勢抵抗性前立腺癌で過剰発現し、その発現の変化にアンドロゲン受容体発現およびアンドロゲン除去の関与が明らかとなった。SSEA-4は前立腺癌とくに去勢抵抗性前立腺癌に対する治療ターゲットとなり得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

前立腺癌細胞の増殖や進展にアンドロゲン受容体 (AR) を介したシグナル伝達経路が重要な役割を果たしている。一方、去勢抵抗性前立腺癌ではARを介さない増殖・進展機序が重要であり、AR経路と非AR経路の包括的な解明が求められる。今回の研究結果から、ホルモン感受性前立腺癌から去勢抵抗性前立腺癌へと進行する過程で、LATS2がアンドロゲン依存性抑制因子として機能し、SSEA-4がARに依存しないシグナル伝達経路に関与することが明らかとなった。この成果は、致命的な病態である去勢抵抗性前立腺癌への進行予防および新たな治療戦略を構築する上で重要な情報になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Large tumor suppressor 2 (LATS2) acts as a tumor suppressor in prostate cancer, and some pathological roles of LATS2 are dependent on the androgen dependence of prostate cancer. LATS2 expression could be a useful predictive factor for the histological effects following hormonal therapy and of outcome in patients with prostate cancer. Stage-specific embryonic antigen (SSEA)-4 is over-expressed in castration-resistant prostate cancer (CRPC) and the changes are mediated by complex mechanisms that related to the androgen receptor and hormonal therapy. SSEA-4 could be a potential therapeutic target in patients with prostate cancer, especially those with CRPC.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 去勢抵抗性前立腺癌 large tumor suppressor 2 SSEA-4

1 . 研究開始当初の背景

前立腺癌細胞の増殖や進展にアンドロゲン受容体(AR)を介した経路が重要な役割を果たしている。事実、AR経路を遮断するホルモン療法は、進行性前立腺癌患者に対する標準的治療法である。しかし、多くの患者はホルモン療法後に去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC) となり、第2世代抗アンドロゲン薬の投与や化学療法、放射線同位元素内用療法が行なわれるものの、その延命効果は限定的である。また、AR経路以外にも、各種の増殖因子やケモカイン、血管新生や免疫機能などが前立腺癌の進展に関与しており、AR経路と非AR経路を網羅する新たな治療戦略の構築が求められている。

我々は前立腺癌患者におけるホルモン療法の臨床的意義 (Prostate 2017;77:1408-15, Prostate. 2017; 77:255-62) や、非AR経路が前立腺癌の進展や予後に与える影響を解析することで (Trans Res. 2016, Prostate 2015, Urology 2013, Prostate 2012, Oncol Let 2010) 、CRPCの病態解明と新たな治療標的因子の同定を目指しているが、それらの議論において、以下のような問題点が挙げられる。

- (1) AR経路と非AR経路の間における分子生物学的な相互作用の情報が少ない。
- (2) CRPC患者の癌組織の採取は困難なため、in vivoでの病態解明が十分とは言えない。
- (3) Prostate specific antigen (PSA) に替わりうる臨床的有用性の高いバイオマーカーがない。

前立腺癌は男性で最も罹患率が高い癌であり、予防、診断、治療の更なる発展が求められている。AR経路と非AR経路の両方を包括的に含めた解析によってホルモン感受性前立腺癌からCRPCに至る病態を明らかにし、新たなバイオマーカーや新規治療標的の同定に関する検討が必要である。

2 . 研究の目的

本研究の目的は、前立腺癌のアンドロゲン依存性喪失に伴い生じる癌細胞と癌周囲微小環境の変化を、疾患特異的な免疫複合体を検出する新たな方法「イムノコンプレキソーム解析法」を用いて解析し、CRPCの病勢をより反映するバイオマーカーを確立することであり、併せてCRPCに対する新たな治療戦略の構築に関する議論に有益な情報を提供することである。

細胞、動物モデル、臨床検体での研究を統合的に遂行し、以下の解明を目指す。

- (1) 前立腺癌のホルモン療法や化学療法の抗腫瘍効果と関連する因子の同定。
- (2) CRPCの病態、予後を反映する新規バイオマーカーの同定

3 . 研究の方法

- (1) 前立腺癌自然発生マウスモデルKnock-in mouse of adenocarcinoma of the prostate (KIMAP)における癌特異的因子を経時的に検索するため、生後6週、10週、28週、52週および60週のKIMAPで血液中の免疫複合体をイムノコンプレキソーム解析法で検出する。さらに、計画的に担癌マウスの去勢を行い、マウス前立腺癌がCRPCとなる時期に新たに検出される因子の同定、およびホルモン療法に伴う癌特異的因子の分子生物学的変化を解析する。
- (2) Hippo pathway は前立腺癌の発癌と進行において重要な役割を果たしている。Large tumor suppressor 2 (LATS2) は、Hippo pathwayの重要な調節因子であり、細胞の生存と働きに重要な役割を果たすことが知られているが、前立腺癌におけるLATS2の病理学的役割に関してはほとんど解明されていない。そこで、前立腺癌におけるLATS2発現と、細胞増殖、転移、浸潤、ネオアジュバントホルモン療法の組織学的効果および生化学的再発との関連を検討する。
- (3) ヒトES細胞およびヒト胚性生殖細胞の細胞表面上に発現する糖鎖stage-specific embryonic antigen (SSEA)-4のCRPCにおける病理学的役割を検討する。前立腺癌細胞LNCaP、PC3、DU145およびLNCaPから樹立されたアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞AICaP1とAICaP2を用いてSSEA-4の発現と細胞増殖、遊走、浸潤との関連を調べ、ヒト去勢抵抗性前立腺癌組織におけるSSEA-4発現とAR発現との関連も併せて検討する。

4 . 研究成果

- (1) 各週齢でのKIMAPおよびwild typeマウスの血液採取ならびに前立腺組織の摘出、固定を行った。マウス血液を検体としたイムノコンプレキソーム解析では、測定のための至適条件

設定を行っており、今後解析を進める予定である。CRPCモデルを作製する目的で、KIMAPに外科的去勢を施行したが、その後の観察で多くのマウスが再増殖を示さず、CRPCに至らなかった。組織学的検討から、去勢により強い抗腫瘍効果が得られたことが判明したため、より悪性度の高い高週齢KIMAPでの解析を今後行う予定である。

(2) 前立腺癌における LATS2 発現の意義

LATS2 のノックダウンにより、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞である LNCaP 細胞の増殖能 ($P < 0.01$)、遊走能 ($P = 0.033$) および浸潤能 ($P = 0.039$) は有意に亢進したが、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞である PC3 細胞では増殖能 ($P = 0.344$) および浸潤能 ($P = 0.890$) に有意差がなく、遊走能 ($P < 0.001$) のみが亢進した。

前立腺癌組織では、51% (104/204) が LATS2 陽性であり、コントロール群の 80% (48/60) よりも低かった。LATS2 の発現は、組織学的 Grade Group ($P < 0.001$)、T stage ($P < 0.001$)、N stage ($P = 0.038$)、M stage ($P < 0.001$)、および増殖指数 (PI, $P < 0.001$) と負の相関があった。ロジスティック回帰分析を用いて、前立腺生検組織における LATS2 発現の有無と PI, Grade Group, T stage および転移の有無との関連を検討した。多変量解析の結果、LATS2 発現陰性と高 PI であることが有意に関連する因子であった [odds ratio = 6.34, 95% confidential interval (CI) = 3.24-12.39, $P < 0.001$]。さらに、LATS2 陽性組織では陰性組織と比較してネオアジュバントホルモン療法 (NHT) による組織学的治療効果が Grade3 (ほとんどすべての癌細胞が検出不能であるか、検出されず) と判定される割合が高かった ($P = 0.013$)。

根治的前立腺摘除術 (RP) 症例 133 人のうち、診断時生検標本において LATS2 発現が陰性であった患者の無生化学的再発 (BCR) 生存期間は陽性患者に比べて有意に短かった (図 1-A, $P < 0.001$)。同様に、NHT なしの手術標本において LATS2 発現が陰性であった患者の無 BCR 生存期間は陽性患者に比べて有意に短かった (図 1-B, $P = 0.002$)。Cox 比例ハザード解析を用いて、前立腺生検組織における LATS2 発現の有無、Grade Group, T stage, NHT の有無と無 BCR 期間との関連を検討した。多変量解析の結果、LATS2 発現の有無は無 BCR 期間と有意に関連していた [hazard ratio (HR) = 2.95, 95% CI = 1.60 - 5.41, $P = 0.001$]。同様に、NHT を施行していない RP 組織標本における LATS2 発現の有無、Grade Group, pT stage と無 BCR 期間との関連を検討した。多変量解析の結果、LATS2 発現の有無は無 BCR 期間と有意に関連のある因子であった (HR 3.00, 95% CI = 1.24-7.28, $P = 0.012$)。

以上より、LATS2 はアンドロゲン依存性に前立腺癌の抑制因子として機能していることが示唆された。前立腺癌組織における LATS2 発現は悪性度、臨床病期および増殖指数と負の相関があり、LATS2 は前立腺癌の腫瘍抑制因子である可能性が示唆された。また、LATS2 は NHT の組織学的効果を予測する有用な因子と考えられた。さらに、LATS2 発現は長い無 BCR 生存期間と関連していたことから、有力な予後予測因子であると考えられた。

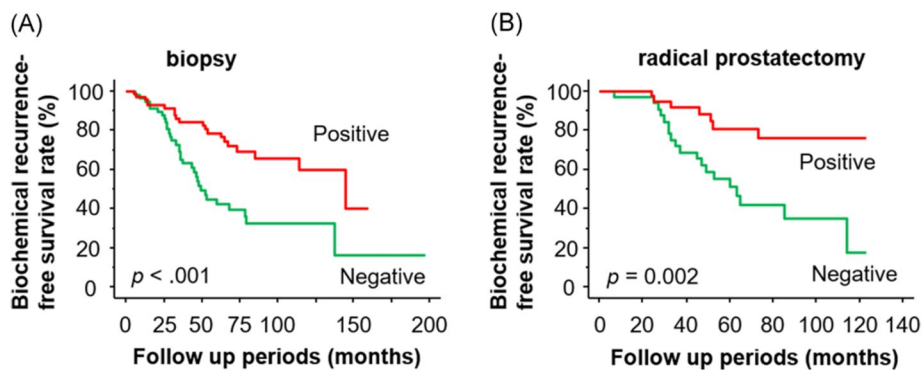


図 1. 根治的前立腺摘除術後の LATS2 発現別、無生化学的再発生存曲線 (Kaplan-Meier 法)。
(A) 診断時生検標本 (n=133), (B) 手術標本 (n=60)。

(3) 去勢抵抗性前立腺癌における SSEA-4 の病理学的意義

PC3, DU145, LNCaP, AICaP1, AICaP2 の 5 つの前立腺癌細胞株において、SSEA-4 の発現が認められたのは PC3 と DU145 および AICaP1 であり、これらの 3 つの細胞株はいずれも A R 陰性であった。一方で、LNCaP と AICaP2 では SSEA-4 の発現は認められず、A R 陽性であった。AICaP1 と AICaP2, LNCaP の比較では AICaP1 が後者 2 株よりも増殖能や遊走能、浸潤能に関して有意な上昇を示した ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$)。AICaP1 における SSEA-4 発現は A R cDNA のトランスフェクションで変化がみられなかった。

ホルモン感受性前立腺癌 (HSPC) 患者の検体では SSEA-4 発現が認められない組織があったのに対して (局所進行癌 22.2%, 転移性癌 9.5%), CRPC 患者の組織検体では

いずれも中等度以上の SSEA-4 の発現があり，強発現の割合は 55.6%であった．H S P C (局所進行癌および転移性癌)に比して，C R P C では SSEA-4 の発現強度は有意に高い結果であった ($p < 0.001$, $p = 0.025$)．また，高悪性度癌で SSEA-4 発現が有意に高かった．

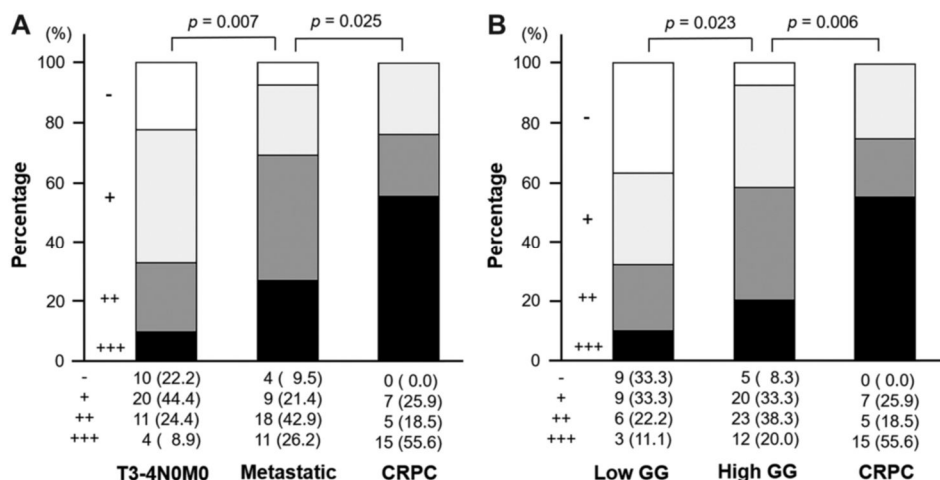


図 2. ホルモン感受性前立腺癌および去勢抵抗性前立腺癌における SSEA-4 発現
ホルモン感受性前立腺癌では転移癌 (A) および高 Gleason grade 癌 (B) で SSEA-4 の発現が高く、去勢抵抗性前立腺癌では全例に発現があり強度も強い。

C R P C 組織における SSEA-4 と A R 発現に関して，A R の発現強度が高いほど SSEA-4 の発現強度が低下していたが ($p = 0.004$)，H S P C では関連がみられなかった．以上より，SSEA-4 は C R P C で過剰発現し，その発現の変化に A R 発現およびアンドロゲン除去の関与が示唆され，SSEA-4 は C R P C の新しいバイオマーカーになり得ると考えられた．A R 陰性 C R P C において，A R に依存しないシグナル伝達経路の一部として SSEA-4 が関与しており，SSEA-4 の阻害は C R P C に対する治療ターゲットとなり得る可能性が示唆された．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Matsuda T, Miyata Y, Nakamura Y, Otsubo A, Mukae Y, Harada J, Mitsunari K, Matsuo T, Ohba K, Furusato B, Sakai H. | 4. 巻 81 |
| 2. 論文標題 Pathological significance and prognostic role of LATS2 in prostate cancer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Prostate | 6. 最初と最後の頁 1252-1260 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pros.24226 | 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 Harada J, Miyata Y, Taima T, Matsuda T, Mukae Y, Mitsunari K, Matsuo T, Ohba K, Suda T, Sakai H, Ito A, Saito S. | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 Stage-specific embryogenic antigen-4 expression in castration-resistant prostate cancer and its correlation with the androgen receptor | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Anticancer Research | 6. 最初と最後の頁 3327-3335 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.15120 | 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 - |

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 宮田 康好 (Miyata Yasuyoshi) (60380888) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・准教授 (17301) | |
| 研究分担者 | 大山 要 (Ohyama Kaname) (50437860) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・准教授 (17301) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|--------------------------------|---|----|
| 研究協力者 | 松田 剛 (Matsuda Tsuyoshi) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・大学院生 (17301) | |
| 研究協力者 | 原田 淳樹 (Harada Junki) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・大学院生 (17301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |