

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18556

研究課題名(和文) 前立腺癌の去勢抵抗性獲得におけるCD105が関連する内皮間葉分化転換の役割

研究課題名(英文) Endothelial-mesenchymal transition promotes the neuroendocrine differentiation of prostate cancer

研究代表者

加藤 学 (Kato, Manabu)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：60626117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVECに、IL-1 /TGF- 2を添加し、HUVECのEndMTが誘導される。HUVECEndMTedと前立腺癌上皮(LNCaP)を共培養することで、共培養したLNCaPにおいて神経内分泌化マーカーのChromogranin Aの発現上昇を認めた。共培養後のLNCaPの遺伝子網羅的解析において、Synaptophysinなどの他の神経内分泌化マーカーの上昇もみられた。ヒト神経内分泌化前立腺癌検体において、血管内皮細胞は神経内分泌化した前立腺癌細胞と近接していることがわかった。EndMTを誘導したHUVECは、LNCaPの神経内分泌化を促進する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホルモン治療によって血管内皮細胞がEndMTを生じ、その際に産生される増殖因子、サイトカインなどの液性因子が前立腺癌上皮細胞の去勢抵抗性変異および神経内分泌化への進展に関与していると仮説をたてている。神経内分泌化した去勢抵抗性前立腺癌に対する有効な治療法はなく、予後も不良である。最近新規ホルモン剤を使用することで強力にアンドロゲン・アンドロゲン受容体経路の遮断が可能となったが、逆にこれらの経路に依存しない神経内分泌化した前立腺癌に変異する症例が増加している。そのメカニズムの解明によって多くの前立腺癌患者の治療が飛躍的に進む可能性を含んだ研究課題である。

研究成果の概要(英文)：Endothelial-mesenchymal transition (EndMT) has been implicated in the malignant transformation of various tumors. Endothelial and tumor cells with neuroendocrine differentiation (NED) were found to be in close proximity in human prostate cancer (PC). This study investigates whether the EndMT of endothelial cells in the vicinity of cancer cells contributes to the NED of PC. We induced EndMT in HUVEC by IL-1b and TGF-b2 and co-cultured them with LNCaP. Then we evaluated the expression of neuroendocrine markers and cell proliferation of LNCaP. We comprehensively analyzed the gene expression of EndMTed HUVEC to identify factors inducing NED of LNCaP. When co-cultured with EndMTed HUVEC, LNCaP exhibited increased expression of neuroendocrine markers and cell proliferation. Several genes with significantly upregulated expression in EndMTed HUVEC were indicated as involved in the NED. Thus, EndMT of endothelial cells in the prostate microenvironment may play a role in the NED of PC.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 血管内皮細胞 血管内皮間葉移行 神経内分泌分化 ホルモン療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1.研究開始当初の背景

進行性前立腺癌の標準的治療はホルモン治療であるが、その多くは 2-3 年以内に難治性の去勢抵抗性癌(CRPC)に変化する。近年アンドロゲン・アンドロゲン受容体経路を強力にブロックする新規ホルモン剤の開発が進み、それらが臨床で使用できるようになったことで進行性前立腺癌の予後は改善しているものの、満足できるものではない。また最近では新規ホルモン剤を使用することで CRPC の中でもより悪性度の高い神経内分泌化した前立腺癌に変異を来す症例が増加している。

### 2.研究の目的

癌の発生進展にはその周囲環境の関与が重要とされている。その構成要素である線維芽細胞は、前立腺上皮細胞の腫瘍形成を促進する線維芽細胞を CAFs(Cancer-Associated Fibroblast)、促進しない線維芽細胞を NAFs (normal-associated fibroblasts)に大別され、CAFと NAFは互いに異なる生物学的特性を有するとされているが、不明な点が多い。

申請者らは、前立腺癌患者組織の神経内分泌化した前立腺癌上皮細胞の周囲に血管内皮細胞に発現を主に認める CD105(endoglin)陽性の CAFs が集積していることを見いだした(Kato 2019 Oncogene)。さらに、CAF、長期継代し腫瘍促進能の低下した CAFsHiP、NAFs の遺伝子発現解析を行ったところ Secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1)の発現が CAFs で亢進しており、CD105 が SFRP1 の発現を制御していることを示した(Kato 2019 Oncogene)。興味深いことにアンドロゲン・アンドロゲン受容体経路を抑制するとヒト前立腺癌組織内で CAFs における CD105/SFEBP1 の発現が上昇し、癌上皮細胞で神経内分泌化マーカーである chromogranin A の発現上昇を認めた(Kato 2019 Oncogene)。CAFと前立腺癌細胞株の混合培養系で、CAFにおける CD105/SFEBP1 経路が癌上皮の神経内分泌化を促進していることがわかった(Kato 2019 Oncogene)。

### 3.研究の方法

そこで CD105 がもともと血管内皮細胞に発現していることに着目し、血管内皮細胞が線維芽細胞様の変化を来す内皮間葉転換 Endothelial-mesenchymal transition(EndMT) (Ubil E et. Al, Nature, 2015) が、前立腺癌の神経内分泌化に関与している仮説を立てた。IL-1 と TGF $\beta$  2 をヒト血管内皮細胞に作用させ EndMT を誘導し、その EndMT した HUVEC とヒト前立腺癌細胞株(LNCaP)を共培養し、LNCaP における神経内分泌マーカーが上昇することを観察する。どのような液性因子が関与しているかをコントロールの HUVEC と EndMT した HUVEC 間で RNAseq にて解析する。

### 4.研究成果

EndMT した HUVEC と LNCaP との共培養にて、LNCaP における神経内分泌マーカーの発現上昇を認めた。さらに HUVEC の RNAseq にて GCSF の発現上昇を認めた。実際 GCSF を LNCaP に作用させると神経内分泌マーカーの発現上昇を認めた。

#### (1) 本研究に関連する既報告データ等

内皮間葉転換(EndMT)については、動脈硬化(Li Y et.al. Nat Rev Cardiol. 2018)や糖尿病性腎症(Criem N et. al. Sci Rep. 2018)、膠原病、肺線維症の組織リモデリングにおける治癒過程に関与するため、その解明が治療戦略につながるとされている(Jimenez SA et. al. Matrix Biol. 2016)。前立腺癌微小環境においても、TGF $\beta$  を介したシグナル経路により特に腫瘍内血管が血管内皮細胞特異的な CD31 等を喪失するだけでなく、細胞間接着が減弱し、幹細胞特異的マーカーを発現する変化が観察されている(Zhu K et. al. Sci Rep 2014)。しかし、基礎研究データの蓄積も少なく、臨床応用へは至っていない現状である。

#### (2)本研究の新規性や独創性

ホルモン治療に抵抗性の難治性癌である去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)では、新規ホルモン剤やタキサン系抗癌剤を投与することが標準的な治療法であるが、依然として奏効期間が短いことや、有害事象が原因で治療を継続できない症例が少なくない。とくに新規ホルモン剤を使うことで高頻度に出現する神経内分泌化した CRPC に対する有効な治療法はなく、新規治療法の開発は喫緊の課題である。

ホルモン治療によって、血管内皮細胞が内皮間葉転換(EndMT)化すること、さらにこの内皮間葉転換(EndMT)が前立腺癌の神経内分泌化に関与すること、この2点に関する研究報告はこれまで皆無であることから、我々の仮説が証明されれば、世界初の成果となる。またこの EndMT をターゲットにした独自の治療法を開発することで難治性の神経内分泌化 CRPC 患者への福音となると考えている。

### 研究の詳細

上記目的を達成するために、どのような研究デザイン(臨床研究であれば、前向き/後向き、介入/非介入、ブラインド/非ブラインド等)で実施するのか、目標症例数、主要評価項目、観察期間等を含め具体的にご記入ください。

- ・後述の研究予算総額との整合性があることをご確認ください。
- ・複数年にわたり、すでに開始されている研究の場合は、進捗状況を記載してください。

本研究課題では、前立腺癌の周囲に存在する血管内皮細胞のホルモン治療に伴う内皮-間葉転換(EndMT)の機構を検討し、どのようなメカニズムで EndMT が前立腺癌上皮細胞の神経内分泌化に影響しているか、細胞相互の生物学的特性(分泌する液性因子、細胞表面マーカー等)を検討し、どのように段階的に前立腺癌の神経内分泌化を促進するかを、分子生物学的手法、さらに動物実験により解析する。具体的には内皮間葉転換(EndMT)した血管内皮細胞が前立腺癌上皮細胞にどのような影響(増殖・神経内分泌化など)を来すかを共培養、混合移植実験で検討する。また、血管内皮細胞と前立腺癌上皮細胞のマウス腎被膜下混合移植実験で、マウスを去勢した時に血管内皮細胞が EndMT 化するのか、さらには前立腺癌上皮細胞の神経内分泌化に係わる EndMT 化した血管内皮細胞からの液性因子を同定し、前立腺癌上皮細胞の増殖、浸潤、血管増生などへの影響を検討するとともに、ヒト去勢抵抗性前立腺癌組織内で EndMT が起きているのか、血管内皮細胞と前立腺癌上皮細胞との関係を免疫染色法などで検証する。さらには前立腺癌の神経内分泌化に係わる血管内皮細胞からの液性因子の産生もしくは発現を阻害することにより、前立腺癌細胞の神経内分泌化去勢抵抗性前立腺癌への進展を抑制することが可能であるかを検討する。

#### これまでの研究進捗状況

- (1) 血管内皮細胞の内皮間葉転換が前立腺癌上皮の神経内分泌化に及ぼす影響の解明  
ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell; HUVEC) に、IL-1/TGF- $\beta$ 2 を添加することで、HUVEC の EndMT が誘導される (Tacia TA, et. Al. Cell Prol, 2019)。この EndMT を誘導した HUVEC (HUVECEndMTed) では、内皮マーカー (CD31, CD34, CD144) の発現が低下し、間葉系マーカー (CD105, TGLN, CNN) の発現が上昇することが確認された。HUVECEndMTed と前立腺癌上皮 (LNCaP) を共培養することで、共培養した LNCaP において神経内分泌化マーカーである Chromogranin A の発現上昇を認めた。共培養後の LNCaP の遺伝子網羅的解析において、Synaptophysin などの他の神経内分泌化マーカーの上昇もみられた。また、ヒト神経内分泌化前立腺癌検体において、蛍光二重免疫染色により血管内皮細胞は神経内分泌化した前立腺癌細胞と近接していることがわかった。以上のことより、EndMT を誘導した HUVEC は、LNCaP の神経内分泌化を促進する可能性が示された。
- (2) HUVECEndMTed が LNCaP の神経内分泌化に与える影響の解明  
EndMT を誘導した HUVEC (HUVECEndMTed) では、遺伝子網羅的解析により、いくつかの遺伝子の発現がコントロール(操作を加えていない HUVEC)と比較して有意に上昇していた。これらの因子が LNCaP の神経内分泌化に直接的に作用している可能性がある。

#### 今後の課題

- (1) 上記 (1)で得られた変化が、他の前立腺癌細胞株でも起こるのかを検証する。C4-2、VCaP、PC3、22RV1 でも HUVECEndMTed との共培養を行い、前立腺癌上皮の神経内分泌化が促進されるかを確認する。
- (2) 上記 (2)で得られた分子のうち、細胞外分泌分子に着目して、これらの分子を LNCaP に投与した時に LNCaP が神経内分泌化するかを確認するとともに、その分子メカニズムを解明する。
- (3) これまでの研究により得られた in vitro での結果を、in vivo での再現実験を行う。前立腺癌上皮細胞 (LNCaP) と血管内皮細胞をラットコラーゲンで混合し、免疫不全マウス腎被膜下移植する実験(腫瘍形成試験)を行う。マウス去勢状態にし、腫瘍の形状、組織学的所見、腫瘍の生物学的変化(特に血管新生、間質での EndMT 変化)を観察する。また EndMT が生じている部位周辺の前立腺癌上皮細胞の形質(特に神経内分泌変化を示唆する蛋白(Chromogranin A 等)の発現変化が生じていないかを詳細に検討する。

#### 研究から期待される結果

当該研究を実施することにより、どのような結果が期待され、またそれがどのように日本の医学・薬学の発展に寄与し、社会貢献につながると考えられるのかをご記入ください。  
例)・研究成果が、いつ、誰に、どの程度、どんなメリットがあるのか、その理由・その研究成果を応用し、将来的にどのような社会貢献が考えられるか。

近年、前立腺癌患者の増加が医療社会的に注目されており、我が国における前立腺癌罹患数は全癌腫のトップである。前立腺癌に対する治療の1つとしてアンドロゲン除去療法(ホルモン治療)が一般的に行われている。ホルモン治療開始後、一定期間は癌細胞の増殖が抑制され、PSA 値の低下、症状の寛解を認めるが、多くは2-3年でホルモン治療に抵抗性を示す去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)となる。CRPC に対しては近年様々な新規治療薬が確立されているが、依然として予後が悪いことが深刻な問題である。  
ホルモン治療によって血管内皮細胞が EndMT を生じ、その際に産生される増殖因子、サイトカ

インなどの液性因子が前立腺癌上皮細胞の去勢抵抗性変異および神経内分泌化への進展に関与していると仮説をたてている。神経内分泌化した去勢抵抗性前立腺癌に対する有効な治療法はなく、予後も不良である。最近は新規ホルモン剤を使用することで強力にアンドロゲン・アンドロゲン受容体経路の遮断が可能となったが、逆にこれらの経路に依存しない神経内分泌化した前立腺癌に変異する症例が増加している。

これまで世界に類をみない我々の仮説が本研究で証明することができれば、難治性の神経内分泌化した前立腺癌に対するあらたな治療シーズ発見に繋がり、ひいては新規の治療法の開発に繋がると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------