

機関番号：23903

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790390

研究課題名 (和文) 前立腺癌骨転移巣の癌幹細胞に対する TGF $\beta$  の分化誘導作用の検討

研究課題名 (英文) Investigation into differentiation effect of TGF beta for cancer stem cells in bone-metastatic prostate cancer cells

研究代表者

佐藤 慎哉 (SATO SHINYA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30464564

研究成果の概要 (和文)：

本研究の結果により、前立腺癌骨転移巣において癌幹細胞が存在する可能性を示した。また TGFbeta シグナル遮断作用を有する薬剤により前立腺癌細胞の増殖が抑制されることを培養細胞実験、動物実験で示し、TGFbeta シグナルの制御が前立腺癌治療に有用であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We raised the possibility of the existence of cancer stem cells in bone-metastatic prostate cancer cells. We also showed that prostate cancer cell proliferation was decreased by TGF beta1 receptor inhibitors in vivo and in vitro, and clarified the significance of TGF beta signaling regulation as a new prostate cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：前立腺癌・癌幹細胞・骨微小環境・分化誘導・TGFbeta

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は米国において男性癌罹患率が1位の癌であり、近年本邦でも増加の一途をたどっている。前立腺癌は進行すると高率に骨転

移を来すが、その多くが既存の治療法に抵抗性であり、骨転移巣に対する新規治療法の発見が急務となっている。骨転移巣では癌細胞の他に骨を作る骨芽細胞や骨を破壊する破

骨細胞が多数存在する。我々はこれまでに TGFbeta の抑制により破骨細胞の分化誘導を阻害すると、骨微小環境における前立腺癌細胞の増殖抑制と骨破壊の減少が起きることを示した。TGFbeta は破骨細胞以外にも前立腺上皮を含む多くの組織の幹細胞に対する分化誘導因子として知られている。近年癌細胞の中に幹細胞様の働きを有する癌幹細胞が存在し、癌幹細胞が癌の発生・転移に重要な役割を有することが提唱されている。癌幹細胞は前立腺癌においても存在を示唆する報告があり、癌の新たな治療標的として注目されている。癌幹細胞の治療方法として分化誘導療法がある。分化誘導療法は癌幹細胞に分化誘導促進物質を投与することで、癌幹細胞が有する薬剤耐性や自己複製能を失くすことを治療機序とし、前立腺癌治療にも臨床応用が期待されている。分化誘導促進物質として TGFbeta などの成長因子やエピジェネティック変化などがある。我々は骨転移巣の前立腺癌に対する新たな治療法として、癌幹細胞の分化誘導療法に着目した。以上が本研究の背景、動機である。

## 2. 研究の目的

骨微小環境に存在する前立腺癌の癌幹細胞に対して TGFbeta により分化誘導を促進するという仮説を検証することが本研究の目的である。目的達成のために、(1)前立腺癌骨転移巣における癌幹細胞の確認、(2) *In vitro* における TGFbeta の癌幹細胞に対する分化誘導作用の検討(3) *In vivo* における TGFbeta の癌幹細胞に対する分化誘導作用の検討という3段階に分けた実験を計画した。

## 3. 研究の方法

(1)前立腺癌骨転移巣における癌幹細胞の確認

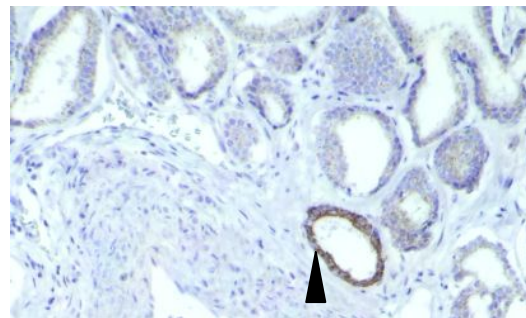
ヒト前立腺癌原発巣・骨転移巣の病理組織標本に対して、ヒト前立腺癌幹細胞マーカーである CD44、CD133 の免疫染色を行い、癌幹細胞の存在の有無と組織内の局在を調べた。

(2) *In vitro* における TGFbeta の癌幹細胞に対する分化誘導作用の検討

前立腺癌幹細胞を単離する目的で、ラット前立腺癌細胞株 PLS10 に対して限界希釈法を行った。またラット前立腺癌細胞株およびヒト前立腺癌細胞株 LNCaP、PC3 に対し、フローサイトメトリーを用いてヒト前立腺癌幹細胞マーカー CD44 の陽性率を測定した。ラット・ヒト前立腺癌細胞株に対して分化誘導作用を有する TGFbeta および HDAC 阻害剤を曝露した。薬剤耐性能を検索する目的で、ラット・ヒト前立腺癌細胞株に対して抗癌剤 Etoposide を曝露した。

(3) *In vivo* における TGFbeta の癌幹細胞に対する分化誘導作用の検討

CD44 を高発現するラット前立腺癌組織 PLS-P を F344 ラット頭蓋骨上に移植して前立腺癌骨転移巣の骨微小環境を再現するモデルラットに対して、TGFbeta シグナル阻害作用が報告されている薬剤 Tranilast を投与し移植腫瘍に対する影響を観察した。



## 4. 研究成果

(1)前立腺癌骨転移巣における癌幹細胞の確認

ヒト前立腺癌原発巣、骨転移巣の病理組織標本に前立腺癌幹細胞マーカー CD44、CD133 の

免疫染色を行った。その結果、CD44 陽性癌細胞の割合は原発巣において 0~35.2%、骨転移巣において 100%であった。また CD133 陽性癌細胞の割合は原発巣において 0~30.5%であった。骨転移巣は良い染色条件を得ることができなかった。CD44、CD133 陽性癌細胞の局在は、腫瘍腺管を形成する癌細胞の一部のみに局在する例は明らかでなく、図で示すように腫瘍腺管を形成する癌細胞全てに局在していた。また一部に CD44 と CD133 を共発現する癌細胞も観察された。Gleason pattern と CD44、CD133 陽性癌細胞の割合の相関は明らかでなかった。

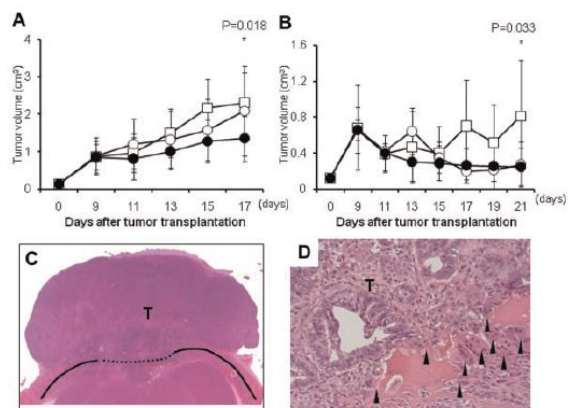
(図) CD133 陽性前立腺癌 (矢頭)

(2) *In vitro* における TGFbeta の癌幹細胞に対する分化誘導作用の検討

ラット前立腺癌細胞株 PLS10 に限界希釈法を行い、亜株 SCC2、SCC3 を得た。このうち SCC3 は親株と比較して抗癌剤 Etoposide に対する薬剤耐性が高く、また親株では見られなかった CD133 陽性癌細胞も観察された。この結果 SCC3 は親株と比較して前立腺癌幹細胞の性質を有する可能性が示唆された。またヒト前立腺癌細胞株 LNCaP、PC3 に対しフローサイトメトリーと免疫染色で CD44 発現を検索したところ、LNCaP と比較して PC3 で高い CD44 発現を認めた。CD133 発現は LNCaP と PC3 で有意な差は見られなかった。LNCaP、PC3 に TGFbeta のシグナル伝達経路を抑制する SB431542、Tranilast を曝露すると有意な細胞増殖抑制が観察されたが、細胞形態の変化は明らかでなかった。次に LNCaP、PC3 に幹細胞に対する分化誘導促進作用が報告されている HDAC 阻害剤 TrichostatinA を曝露すると、細胞増殖抑制および PC3 では細胞の大型化も観察された。

(3) *In vivo* における TGFbeta の癌幹細胞に対する分化誘導作用の検討

CD44 を高発現するラット前立腺癌組織 PLS-P を F344 ラット頭蓋骨上に移植すると、2 週間で頭部に腫瘍塊が形成された。この腫瘍移植ラットに対して TGFbeta 抑制作用が報告されている薬剤 Tranilast を 200mg/kg、あるいは 400mg/kg、移植後 9 日から 17 日まで投与したところ、400mg/kg 投与群で移植腫瘍体積の有意な縮小を認めた。腫瘍の細胞形態に大きな変化は見られなかった。また微小環境が Tranilast の治療効果に影響を与えるか検索するため、ラット皮下にも PLS-P を移植し同様の実験を行ったところ、やはり 400mg/kg 投与群で腫瘍体積の有意な縮小を認めた。



(図) 頭部移植前立腺癌、皮下移植前立腺癌の体積 (左が頭部移植腫瘍の体積、右が皮下移植腫瘍の体積。□が対照群、○が Tranilast 200mg/kg 投与群、●が Tranilast 400mg/kg 投与群) Sato S et al, The Prostate. 2010;70:229-238 より

以上の結果から、前立腺癌骨転移巣において癌幹細胞が存在する可能性が示唆された。また TGFbeta が癌幹細胞マーカーを高発現する前立腺癌細胞に対して細胞増殖抑制作用を有することが示された。また HDAC 阻害剤が前立腺癌細胞の形態変化を誘導することが示された。今後前立腺癌に分化誘導作用を有する薬剤を曝露した際に変化する遺伝子・蛋白発現を解析することで、新たな癌治療法の

確立に繋がる癌増殖抑制メカニズムを解明する予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Sato S, Takahashi S, Asamoto M, Naiki T, Naiki-Ito A, Asai K, and Shirai T, Tranilast suppresses prostate cancer growth and osteoclast differentiation in vivo and in vitro, *The Prostate*, 査読有, vol 70, 229-238, 2010
- ② Tang M, Asamoto M, Ogawa K, Naiki-Ito A, Sato S, Takahashi S, and Shirai T, Induction of apoptosis in the LNCaP human prostate carcinoma cell line and prostate adenocarcinomas of SV40T antigen transgenic rats by the Bowman-Birk inhibitor, *Pathol Int*, 査読有, vol 59, 790-796, 2010
- ③ Futakuchi M, Nannuru K.C, Varney ML, Sadanandam A, Nakao K, Asai K, Shirai T, Sato S, and Singh RK, Transforming growth factor-beta signaling at the tumor-bone interface promotes mammary tumor growth and osteoclast activation, *Cancer Science*, 査読有, vol 100, 71-81, 2009
- ④ Takahashi S, Takeshita K, Seeni A, Sugiura S, Tang M, Sato S, and Shirai T, Suppression of prostate cancer in a transgenic rat model via gamma-tocopherol activation of caspase signaling, *The Prostate*, 査読有, vol 100, 71-81, 2009

[学会発表] (計3件)

- ① 佐藤慎哉、白井智之ら、Trial to identify cancer stem cells in primary and bone metastatic prostate cancers、第69回日本癌学会、2010年9月24日、リーガロイヤルホテル (大阪府)
- ② 佐藤慎哉、白井智之ら、骨微小環境における前立腺癌幹細胞の同定に向けた試み、第99回日本病理学会、2010年4月28日、京王プラザホテル (東京都)
- ③ 佐藤慎哉、白井智之ら、骨微小環境における前立腺癌幹細胞同定の試み、第26回日本毒性病理学会、2010年2月3日、石川県立音楽堂 (石川県)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 慎哉 (SATO SHINYA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30464564