

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09418

研究課題名（和文）癌関連線維芽細胞の形質転換による前立腺癌の進展制御

研究課題名（英文）Regulation of prostate cancer progression by transformation of cancer-associated fibroblasts.

研究代表者

佐々木 豪（Sasaki, Takeshi）

三重大学・医学部附属病院・講師

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）：複数の前立腺癌由来線維芽細胞とアンドロゲン感受性前立腺癌細胞（LNCaP）との混合マウス移植モデルを作製した。一部の線維芽細胞において、癌抑制性の性質を示す線維芽細胞を確認することができた。混合マウス移植モデルに用いた前立腺癌由来線維芽細胞を用い、癌促進性、抑制性に関与しているとされる分子生物学的マーカーで発現解析し、癌抑制性線維芽細胞に特徴的な遺伝子発現パターンを見出した。続いて、それらの遺伝子発現パターン（癌抑制性線維芽細胞）を誘導する因子候補の探索を行った。本研究から、癌抑制性線維芽細胞の存在が示唆され、それらが特徴的な分子生物学的マーカーを有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

本研究成果から、癌抑制性線維芽細胞の存在が示唆され、それらが特徴的な分子生物学的マーカーを有している可能性が示唆された。また、癌促進性線維芽細胞（いわゆるCancer-associated fibroblasts: CAFs）を癌抑制性線維芽細胞への誘導を試みた。しかしながら、癌抑制性線維芽細胞への誘導因子の同定には至らなかった。今後、癌周囲の線維芽細胞を癌抑制性線維芽細胞へ形質転換することで、癌細胞の悪性化を阻止し、前立腺癌の進展を制御するという新規治療戦略を構築することができる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In vivo mouse model was created with multiple prostate cancer-derived fibroblasts and androgen-sensitive prostate cancer cells (LNCaP). In some fibroblasts, we were able to identify fibroblasts that exhibited tumor suppressive characteristics. Using the prostate cancer-derived fibroblasts used in vivo mouse model, we analyzed these expressions with molecular biological markers that are thought to be involved in cancer promotion and suppression, and found gene expression patterns characteristic of tumor suppressive fibroblasts. We then searched for candidate factors that induce those gene expression patterns (cancer-suppressive fibroblasts). This study suggested the existence of tumor suppressor fibroblasts and the possibility that they may possess specific molecular biological markers.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 線維芽細胞 癌抑制

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2019年のわが国におけるがん統計予測では、男性癌のうち、前立腺癌はがん罹患数で大腸癌、胃癌、肺癌に次ぐ第4位(78500人)、がん死亡数で肺癌、胃癌、大腸癌、膵臓癌、肝臓癌に次ぐ第6位(12600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、前立腺癌の10-20%を占める進行癌に対する第一選択治療は内分泌療法(アンドロゲン除去療法)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。とくに難治性となる悪性度の高い前立腺癌(Gleason's Pattern 4 or 5)では腺管構造が崩れ、癌細胞周囲に多数の間質細胞が動員される。Ayalaらは前立腺癌間質を定量化し、前立腺癌間質グレード分類が予後規定因子であることを報告した(Ayala, Clin Can Res 2003)。

癌間質細胞のうち、最も多くの割合を占めるのが癌関連線維芽細胞(Cancer associated fibroblasts: CAFs)である。CAFsの起源は未だ不明であり、正常線維芽細胞、老化線維芽細胞、内皮細胞、骨髄由来間質細胞、周皮細胞、癌細胞などの様々な細胞が起源として考えられている。近年、多数のCAFsを標的とした薬剤の開発が行われ、臨床研究および臨床試験が進行中である(Laurent, Nat Rev Cancer 2020)。実際にCAFs標的薬の治療メカニズムとして、CAFsの活性化抑制(FGFR, Hedgehog)、CAFs活性化抑制+作用抑制(TGF β , Angiotensin R)、CAFsの作用抑制(CXCR4, ROCK, FAK, LOXL2, CTGF, Hyaluronic acid, FAP-expressing cells)、CAFsの中和(Vitamin A metabolism, Vitamin DR)に分類される。いずれの薬剤も癌促進性CAFsの作用喪失を目的としている。

申請者は不均一性を有するCAFsがCRPCの進展に関与する可能性を明らかにし、癌抑制性線維芽細胞の存在を報告した(Sasaki, Lab Invest 2016)。近年、他癌腫においても癌抑制性線維芽細胞の存在が報告された(Chang, Can Res 2012, Enomoto, Can Res 2019)。正常線維芽細胞からのCAFs(癌促進性)への誘導は、YAP, TGF β , Stiffness, Passage, Aging, Hypoxiaが候補因子として挙げられているが、CAFs(癌促進性)からの癌抑制性線維芽細胞への形質転換が可能かどうかは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究課題では、CAFs(癌促進性)と癌抑制性線維芽細胞とは互いに形質転換するという仮説を立て、申請者らが初代培養で樹立した多数症例の前立腺癌CAFsパネルを用い、CAFs(癌促進性)と癌抑制性線維芽細胞の性状を決定する因子の同定を試みる。癌促進性CAFsを癌抑制性線維芽細胞へ形質転換することで、癌細胞の悪性を阻止し、前立腺癌の進展を制御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

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5 mm³に細切し、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)はATCC社から購入した。

4. 研究成果

令和3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い、それら前立腺線維芽細胞を用い、アンドロゲン感受性LNCaP細胞単独あるいは正常ヒト前立腺間質細胞PrSC、初代培養で得られた複数の前立腺癌患者由来線維芽細胞との混合でヌードマウスの腎被膜下へ移植した。腎被膜下移植後4週間ごと殺、組織を回収し、ホルマリン固定後パラフィンブロックを作製した。移植後の組織はHE染色およびKi67、CD31による免疫染色を用い評価した。癌抑制性の性質を示す線維芽細胞の同定を行った。

【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、一部の線維芽細胞(pcPrF-M28)との混合移植で、前立腺癌CAFs(癌促進性)やPrSCと比較し、腫瘍形成が抑制されていた。

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、癌抑制性の性質を示す線維芽細胞(pcPrF-M28)の存在が明らかとなった。

令和4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4検体を用い、癌促進性、抑制性に関与するマーカーである*Islr*, *Slit2*, *Wnt3a*, *Tnc*, *Pin1*, *Fap*, *Acta2*, *Pdgfra*, *Vim*,

Calponin の mRNA 発現を解析し、癌抑制性線維芽細胞に特徴的な遺伝子発現パターンを明らかにすることを試みた。

【検討結果】 一部の前立腺癌患者由来線維芽細胞では、癌抑制性マーカーである *Islr*, *Slit2*, *Wnt3a* の発現が上昇し、CAFs に特徴的な癌促進性マーカー (*Tnc*, *Pin1*, *Fap*, *Acta2*, *Pdgfra*, *Vim*, *Calponin*) の発現が低下していた。

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、癌抑制性マーカーの発現上昇を示す線維芽細胞の存在が明らかとなった。

令和5年度

本年度は、前年度に CAFs に特徴的な癌促進性マーカー (*Tnc*, *Pin1*, *Fap*, *Acta2*, *Pdgfra*, *Vim*, *Calponin*) の発現が上昇していた前立腺癌患者由来線維芽細胞に Vitamin A, Vitamin D の添加し、癌抑制性マーカーである *Islr*, *Slit2*, *Wnt3a* の発現上昇を誘導できるかを検証した。

【検討結果】 前立腺癌患者由来線維芽細胞に Vitamin A, Vitamin D の添加し、添加時間、添加濃度を調整したが癌抑制性マーカーである *Islr*, *Slit2*, *Wnt3a* の発現上昇は誘導できなかった。

本研究から、前立腺癌患者由来線維芽細胞のうち、癌抑制性の性質を示す線維芽細胞 (pcPrF-M28) の存在が明らかとなった。癌抑制性線維芽細胞は、CAFs (癌促進性) と異なる特徴的な遺伝子発現パターンを有していた。CAFs (癌促進性) から癌抑制性線維芽細胞への誘導は Vitamin A, VitaminD の添加では誘導されなかったため、今後さらなる癌抑制性線維芽細胞への誘導因子の探索が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 0件）

1. 著者名 Sasaki Takeshi, Matsumoto Ryuki, Higashi Shinichiro, Kato Manabu, Masui Satoru, Yoshio Yuko, Nishikawa Kouhei, Inoue Takahiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Impact of family history on clinicopathological variables and disease progression in Japanese prostate cancer patients undergoing robotic assisted radical prostatectomy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 1339 ~ 1346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14990	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 Takeshi, Ebara Shin, Tatenuma Tomoyuki, Ikehata Yoshinori, Nakayama Akinori, Kato Daiki, Toide Masahiro, Yoneda Tatsuaki, Sakaguchi Kazushige, Teishima Jun, Makiyama Kazuhide, Kitamura Hiroshi, Saito Kazutaka, Koie Takuya, Koga Fumitaka, Urakami Shinji, Inoue Takahiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Prognostic differences among Grade Group 4 subgroups in robotic assisted radical prostatectomy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BJU Compass	6. 最初と最後の頁 392 ~ 399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bco2.160	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 Takeshi, Yoshikawa Yumi, Kageyama Takumi, Sugino Yusuke, Kato Manabu, Masui Satoru, Nishikawa Kouhei, Inoue Takahiro	4. 巻 83
2. 論文標題 Prostate fibroblasts enhance androgen receptor splice variant 7 expression in prostate cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Prostate	6. 最初と最後の頁 364 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pros.24468	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 Inoue Takahiro, Sasaki Takeshi, Kato Manabu, Masui Satoru, Nishikawa Kohei	4. 巻 128
2. 論文標題 Warning against second generation antiandrogen for metastatic castration sensitive prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BJU International	6. 最初と最後の頁 550 ~ 550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bju.15561	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 Takeshi, Nishikawa Kouhei, Kato Manabu, Masui Satoru, Yoshio Yuko, Sugimura Yoshiki, Inoue Takahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Neoadjuvant Chemohormonal Therapy before Radical Prostatectomy for Japanese Patients with High-Risk Localized Prostate Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 24 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medsci9020024	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 -

〔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	加藤 学 (Kato Manabu) (60626117)	三重大学・医学部附属病院・助教 (14101)	
研究分担者	井上 貴博 (Inoue Takahiro) (80511881)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	

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