

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19558

研究課題名（和文）ポストAR時代の治療戦略構築に向けたアンドロゲン非依存前立腺癌進展機構の解明

研究課題名（英文）The mechanism of AR signaling-independent prostate cancer

研究代表者

溝上 敦（Mizokami, Atsushi）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50248580

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト前立腺癌細胞株LNCaPおよびC4-2Bとヒト肝間質細胞株Fa2N-4の共培養では、前立腺癌細胞の増殖が促進されたがごく軽度であった一方、前立腺癌細胞の遊走は非常に大きく促進された。ARをノックダウンさせたものと共培養するとこの遊走能は低下した。共培養上清における分泌蛋白においては、midkine、CCL20、CXCL12の分泌が亢進していた。血管内皮への接着に關与するCD44は去勢抵抗性タキサン耐性細胞で発現が亢進した。前立腺癌細胞がひとたび肝に達すると、ARシグナル遮断下では遊走能が低下し間葉上皮移行を起こし定着しやすくな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

強力な新世代AR標的薬が開発され、ARシグナルを究極的に抑制できるようになった結果、ARシグナルが増殖に全く關与しない新世代AR標的薬耐性前立腺癌細胞が生命予後を規定する時代が到来している。本研究の結果、ARシグナルに依存しない、タキサン耐性を有するような状態になった前立腺癌細胞は、肝転移を起こし、さらに定着する機構が存在する可能性が示された。本機構は進行前立腺癌に対する新たな治療ターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The increase in proliferation of C4-2B and LNCaP cells cocultured with Fa2N-4 cells was small, but the increase in migration of those cells were huge. Whereas, this migration increase of cancer cells was decreased by AR knockdown in Fa2N-4. In these coculture systems, midkine, CCL20, and CXCL12 secretions were increased in supernatant. In addition, expression of CD44, which is an important molecule for cell-cell adhesion, was increased in taxane-resistant DU145 cells, suggesting that liver metastasized prostate cancer cells are tends to decrease their migration ability and show mesenchymal-epithelial transition under AR signal blockade status.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 肝転移 肝間質細胞 間葉上皮移行

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌細胞はアンドロゲン依存性に増殖するため、アンドロゲン除去療法が行われる。しかし、多くの症例で無効=去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer: CRPC) となる。CRPC となっても、様々な活性化経路でアンドロゲン受容体 (androgen receptor: AR) が刺激されるため、より強力に AR シグナルを抑制する二次治療が行われる。これまでは、AR シグナル活性化経路の全容解明により CRPC は完全に制圧できると考えられていた。しかし近年、様々なアンドロゲン産生阻害剤や新世代抗アンドロゲン剤 (AR signaling targeted therapy: ARST) が開発され、以前より AR シグナルを強力に抑制できる時代となった。前立腺特異抗原 (prostate-specific antigen: PSA) は AR シグナルのみにより誘導されるため、個々の細胞において PSA 産生は AR シグナルの活性とパラレルである。

最近、AR 陽性でありながら PSA が全く発現していない CRPC や AR 自体が発現しない CRPC が増加している。このような CRPC では、明確に AR シグナルとは異なる経路により増殖・転移が誘導されている。我々は、明らかに AR シグナルに依存しない前立腺癌 (AR signaling-independent prostate cancer: ARIP) 細胞が生命予後を規定する時代=前立腺癌における「ポスト AR 時代」が到来したと考えている。

以前、AR シグナルを抑制することで前立腺癌細胞の転移能が亢進することを報告した。AR に制御されているケモカイン CCL2 の自己分泌作用が亢進することによって、自らの細胞に STAT3 のリン酸化などを介した上皮間葉移行を誘導する (Izumi K, Mizokami A, et al. EMBO Mol Med. 2013;5:1383-401)。肝における免疫環境・細胞間相互作用が ARIP のスイッチに関与すると考え、Fa2N-4 と C4-2B を用いた予備実験を行った。ARST 下の環境を想定し各細胞の AR をノックダウン (-siAR) したものとコントロール (-cont) を作成し共培養を行った。C4-2B-cont または C4-2B-siAR 単独培養では転移能の活性化を示す STAT3 のリン酸化はごく低いレベルで認められるのみであったが、C4-2B-cont の Fa2N-4-cont との共培養では強く認められた。この結果から進行前立腺癌の治療開始前の段階ですでに生じている微小な肝転移においては前立腺癌細胞の転移能が高められている状態にあることが推測された。次に、ARST が行なわれている肝転移モデルとして C4-2B-siAR と Fa2N-4-siAR を共培養したところ、さらに強く STAT3 リン酸化が認められた。ところが、CCL2 を加えると逆に STAT3 リン酸化は抑制された。この結果からは、治療開始とともに転移能が亢進するが、時間経過とともに CCL2 が豊富な微小環境が醸成されると転移能が低下 (間葉上皮移行) し、癌細胞の接着・増殖能が亢進するフェーズとなることを示している。これは臨床的に ARIP が肝転移巣が画像的に検出できるまでに増大している段階を表していると考えられる。さらに細胞間相互作用・構造破壊が加わり、大量の癌細胞が血中へ流出し転移を起こすと考えられる。仮説の一部を支持する結果であり、仮説が臨床的に成立する可能性を十分期待させるものであった。

2. 研究の目的

AR に依存しない病態としてよく知られているのは神経内分泌分化 (neuroendocrine differentiation: NED) である。NED は他の神経内分泌癌の治療に準じてプラチナ系を主体とした抗癌化学療法が行なわれるが極めて予後不良である。ARST 台頭後、NED マーカーの発現がない症例も増加しており、NED は ARIP の一形態に過ぎないことが明らかとなってきた。骨転移が主体の初期前立腺癌とは異なり、ARIP に特徴的な臨床像は肝転移である。肝転移の出現を機に ARIP であることが明らかになることも多い。興味深いことに、ARST やタキサン系抗癌剤の治療歴が増えると肝転移の出現が有意に増加する (Iwamoto H, Izumi K, Mizokami A, et al. Prostate. 2021;81:72-80)。この肝転移の出現を起点に、一気に病態の悪化を見ることが多い。これらの事実から ARIP と前治療・肝転移の間に何らかの関連が存在することが示唆される。我々は、肝転移が ARIP を誘導する、すなわち、肝転移微小環境に ARIP への変化を誘導するスイッチが存在する、という仮説を立てた。

多彩な AR シグナル活性化経路の全容を解明することによって CRPC を完全に制圧できると考えられているため、AR シグナル活性化機構は前立腺癌の基礎研究の花形的テーマである。強力な ARST が台頭する「ポスト AR 時代」では、ARST 無効までのタイムラグを経て ARIP が増加すると予想される。我々は敢えて AR を標的としない機序の解明に挑戦してきた。AR シグナルがドライバーとならない前立腺癌は唯一 NED として認識されていたが、実臨床上からも NED は ARIP の一亜型にすぎないと考えている。NED 以外の ARIP に対しては全く有効な治療法がないのが現状である。肝転移の出現は ARIP の特徴であり予兆でもある。すなわち、肝転移はやにわに様々部位へ多発転移をきたす ARIP 増悪の起点と考えられる。本仮説においては明らかにすべき点が多数存在するが、ユニークな発想であり、特定の転移部位が癌全体の悪化の発火点であることが明らかになれば、治療標的となりやすく、臨床応用も容易である。極めて挑戦的課題だが、機序が解明されたときのインパクトは大きいと考えられる。各臓器特異的な組織構造や細胞組成による転移促進機構が存在するならば、様々な臓器特異的な転移制御薬の開発の足掛かりになる可

能性もある。既存治療との併用による相乗効果も期待でき、将来の癌治療体系を根本的に見直す潜在性を有する研究と考えている。この機構を解明し、治療法のないARIPに対する新規標的を見出し生存期間延長につなげることを究極的な目的とした。

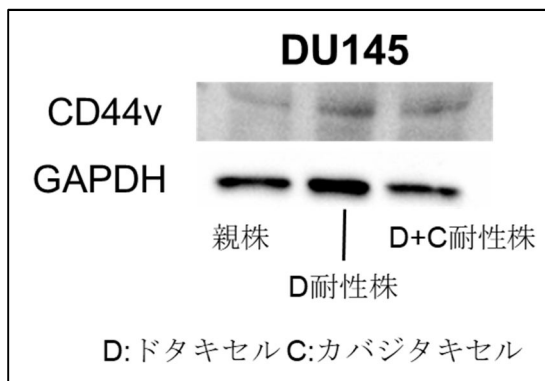
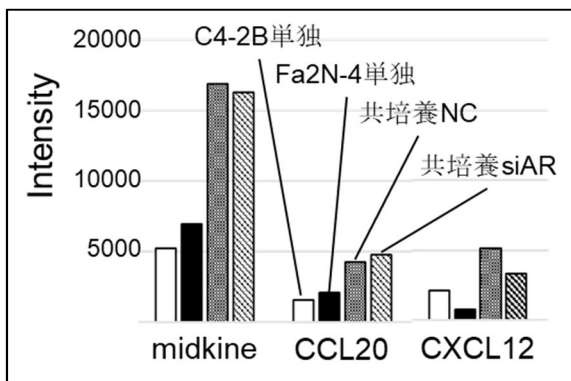
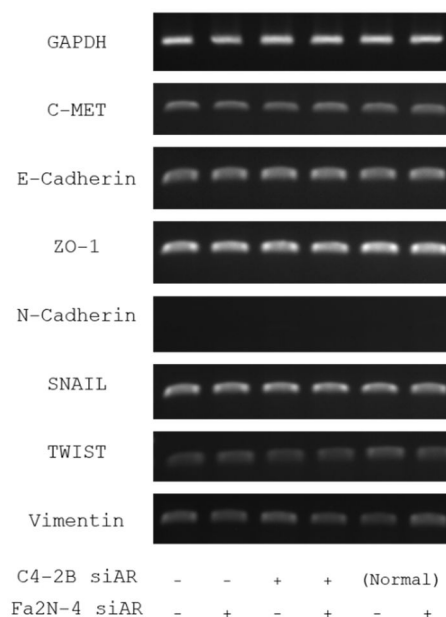
3. 研究の方法

- (1) 肝転移微小環境にARIPへの変化を誘導するスイッチが存在する、という仮説のもと、肝転移微小環境を想定し、肝実質において最も多く存在する細胞である肝間質細胞と類似するであろうヒト肝間質細胞株Fa2N-4を用い、ヒト前立腺癌細胞LNCaPおよびC4-2Bとの共培養を行い、表現型の変化を検討した。
- (2) LNCaPおよびC4-2BならびにFa2N-4それぞれについてARのノックダウンを行った場合にも共培養を行い、変化を検討した
- (3) ウェスタンブロット等でSTAT3やAKTの変化を観察し、表現型へ影響を及ぼすメカニズムを明らかにした。
- (4) 共培養において、培養上清のサイトカイン・ケモカインを測定し変化のあるものを同定した。
- (5) 肝転移が増加する際の前立腺癌細胞モデルとして、ホルモン感受性のないヒト前立腺癌細胞株DU145をタキサン系抗癌剤に対して耐性を付加したDU145-TxR-CxRを用い、細胞接着能について検討した。

4. 研究成果

LNCaPおよびC4-2BとFa2N-4の共培養では、前立腺癌細胞の増殖が促進されたがごく軽度であった一方、前立腺癌細胞の遊走は非常に大きく促進された。興味深いことにFa2N-4のARをノックダウンさせるとこの遊走能は低下した。前立腺癌細胞のSTAT3の活性化もFa2N-4のARをノックダウンさせたものと共培養したときには低下した。これはアンドロゲン除去療法などによりARシグナルを遮断すると、前立腺癌細胞の転移能が亢進し肝まで達しやすいが、前立腺癌細胞がひとたび肝に達すると、ARシグナル遮断下では遊走能が低下する、つまり間葉上皮移行を起こし定着しやすくなる、という可能性を示唆しているのではないかと考えている。

C4-2BのARをノックダウンしたものをFa2N-4のARをノックダウンさせたものと共培養したとき、STAT3の活性化の低下と同様に、AKTの活性化も抑制される傾向が観察された。間葉上皮移行に関与する分子として、細胞間のタイトジャンクションに関わるZo-1をはじめ各種マーカーについて、この共培養時におけるC4-2Bでの変化をPCRで調べたが、大きな変化は認められなかった(右図)。



一方、共培養上清における分泌蛋白においては、C4-2B単独、Fa2N-4単独上清と比較し、ARノックアウト、非ノックアウトいずれでもmidkine、CCL20、CXCL12の分泌が亢進していることが明らかとなった(左上図)。CXCL12は、当研究室で過去に去勢抵抗性前立腺癌において転移をはじめ癌細胞の活性に重要な因子であることを明らかにしているCXCR4のリガンドである。また、興味深いことに、CD44は血管内皮への接着に関与する重要な癌細胞表面蛋白であるが、DU145-TxR-CxRにおいてはCD44の発現が亢進することもわかった(上右図)。

ARIP においては肝間質細胞と前立腺癌細胞の相互作用を介して、肝への転移形成から増悪過程においてケモカインが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加納洋、泉浩二、Natsagdorj Ariunbold、福田理恵、神島泰樹、島田貴史、内藤伶奈人、牧野友幸、門本卓、岩本大旭、八重樫洋、角野佳史、溝上敦
2. 発表標題 CCL2-CCR2はアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞のカバジタキセル体制に関与する
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroaki Iwamoto, Kouji Izumi, Yoshifumi Kadono, Atsushi Mizokami
2. 発表標題 Anticancer effects of coffee diterpenes kahweol acetate and cafectol on prostate cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本大旭、泉浩二、内藤伶奈人、牧野友幸、門本卓、八重樫洋、角野佳史、溝上敦
2. 発表標題 新規アンドロゲン受容体シグナル伝達阻害薬とタキサン系抗癌剤は去勢抵抗性前立腺癌の内臓転移を誘発する
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉浩二
2. 発表標題 アンドロゲン受容体シグナルの両価性 基礎部門ワークショップ「前立腺癌におけるアンドロゲン受容体研究の最前線」
3. 学会等名 第36回前立腺シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加納洋, 泉浩二, 神島泰樹, 島田貴史, 門本卓, 岩本大旭, 八重樫洋, 溝上敦
2. 発表標題 ARシグナル抑制によるCCL20-CCR6経路の活性化を介した前立腺癌転移促進機構
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2022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
研究分担者	泉 浩二 (Izumi Kouji) (80646787)	金沢大学・附属病院・講師 (13301)	

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