

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：24601

研究種目：基礎研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390070

研究課題名（和文） 前立腺癌幹細胞の効率的な新規獲得法の確立と癌幹細胞維持メカニズムの解明

研究課題名（英文） Study on new approach to effective acquirement and the maintaining mechanisms of prostate cancer stem cell.

研究代表者

小西 登（KONISHI NOBORU）奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20145832

研究成果の概要（和文）：癌は少数の癌幹細胞（cancer stem cell）により形成、維持されているが、前立腺癌においては、癌組織中に存在する幹細胞と類似の機能を有する腫瘍始原細胞（tumor initiating cell, TIC）が癌発生のみならず、様々の治療や進展プロセスに重要であるといわれている。本研究では TIC を豊富に含む holoclone を安定的に樹立し、holoclone の維持メカニズムに細胞内活性酸素を調節する syndecan-1 が必要であることを見出した。さらに、syndecan-1 は前立腺癌発症マウスに関わっており、ヒト前立腺癌においても予後予測因子となりうることを示し、前立腺癌治療の重要な分子標的となりうることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：Increasing evidence suggests that tumor-initiating cells (TIC) contribute to the development of prostate cancer. We identify syndecan-1 as a key molecule for maintaining the stability of prostate cancer TIC. Holoclonal cells harboring biological properties of stemness overexpressed syndecan-1, but showed reduced expression of NADPH oxidase and synthesis of hydrogen peroxide and oxygen radicals. In the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model of prostate cancer, early intervention with a syndecan-1 inhibitor (OGT2115) or syndecan-1 RNAi reduced the cancer incidence and the number of c-kit<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> cells. Syndecan-1 immunopositivity in prostate cancer cells was significantly associated with biochemical recurrence after radical prostatectomy. Taken together, syndecan-1 contributes to prostatic carcinogenesis by maintaining TIC, and might be a novel target molecule for effective cancer therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	11,400,000	3,420,000	14,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：前立腺・癌幹細胞・癌化・CD133・CD44・syndecan-1

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌の発生・進展における「腫瘍始原細胞(tumor initiating cells, TIC)」の役割が

注目されている。癌組織中に存在する幹細胞と類似の機能を有する細胞で、幹細胞の癌化による癌発生だけでなく、放射線照射や化学

療法などの外部刺激に対して *de novo* で発生し、転移を含む癌進展プロセスに重要な影響をもたらす。前立腺癌も例外ではなく、TIC は癌発生に加え、ホルモン療法や化学・放射線治療抵抗性獲得に関与していると思われ、TIC の安定供給、生存にかかわる分子やそのシグナル伝達の解明はこれら臨床病理学的諸問題の解決につながるといえる。しかし、生物学的研究に耐えうる TIC を十分量確保することは極めて困難であり、これが TIC の機能や生存シグナル解析を大きく妨げる原因となっている。

## 2. 研究の目的

上記問題を解決するため、TIC が豊富に含まれる癌細胞クローンである holoclone に着目した。すでに腺癌をはじめ、holoclone が生物学的に stem cell property を有することが証明されている。本研究では、

- 1) 前立腺癌細胞株から安定した holoclone を樹立し、stem cell 様の生物学的特性を有するか否か観察する。
- 2) stem cell 様機能を有する前立腺癌由来 holoclone と conventional clone とで異なる発現 profile を示す遺伝子をピックアップする。中でも、当教室において prostatic stem/progenitor cells 生存シグナルに欠かせない分子として特定した転写因子 junB とその標的分子に着目し、比較検討する (Konishi N. et al Clin Cancer Res, 2008)。
- 3) 2) で抽出した分子の臨床病理学的意義を明確にし、前立腺癌治療、特にホルモン抵抗性を獲得した難治性癌や外科的治療の適応がない進行癌に対する新規の治療標的分子となるか否かの基礎データを獲得する。
- 4) ヒト前立腺癌発症モデル動物 (TRAMP マウス) を用い、2) で選択した分子の生物学的意義を検証する。

## 3. 研究の方法

本研究では、TIC を豊富に含む前立腺癌細胞由来の holoclone を用いて、前立腺癌における TIC 供給と維持ならびに腫瘍の発生、進展と治療抵抗性獲得における junB 標的分子の生物学的、臨床病理学的意義を解明する。

### 1) 分子生物学的検討

TIC rich クローン生存シグナルや腫瘍起源細胞としての機能 (自己再生能や microsphere 形成能、腫瘍形成能など) に及ぼす junB 標的分子の影響を *in vitro*, *in vivo* で解析する。

### 2) 病理組織学的検討

ヒト前立腺癌生検標本や前立腺全摘出材料を用いて、癌細胞における junB 標的分子

陽性率と病理学的パラメーターや再発 (生化学的再発を含む)、転移を含む生命予後との関連性を統計的に解析する。

### 3) 臨床応用に向けたトランスレーション研究

前立腺癌発生における junB 標的分子の意義や治療標的としての有用性について、前立腺癌発症モデル動物である TRAMP マウスを用いて解析する。標的分子の siRNA やシグナル阻害剤投与による前立腺癌発生、進展への抑制効果や化学・放射線照射感受性獲得メカニズムを明らかにする。

## 4. 研究成果

### 1) 前立腺癌 holoclone の樹立と stem cell property の解析

前立腺癌細胞株である PC3 を single cell として約 2 週間培養すると少数ながら holoclone が得られる。これらの clones は microsphere を形成し、NOD-SCID マウス移植実験にて少数の細胞移植でも触知可能な皮下腫瘍を形成し、腫瘍再現性を確認できるなど、stem cell に類似した生物学的特性を認める (表 1)。holoclone は CD44,  $\alpha 2 \beta$  integrin などの幹細胞マーカーを強発現し、conventional clones (meroclone, paraclone) に比して syndecan-1 (CD138) を強発現することを見出した (図 1)。

一方、syndecan-1 発現を siRNA 導入によって down-regulation すると、holoclone は細胞内活性酸素種 (過酸化水素や酸素ラジカル) の増加によって死滅した。syndecan-1 は、細胞内活性酸素種を適正なレベルに調節することで、holoclone の生存を維持すると考えられた。

表1 Tumorigenicity and serial transplantability of clones

Holoclone	Holoclone (a)		Holoclone (b)	
	(1) 1000	5/5 (20d)	(1) 1000	5/6 (30d)
(2) 1000	4/5 (28d)	(2) 1000	6/8 (27d)	
(3) 1000	6/8 (27d)	(3) 1000	5/7 (35d)	
Meroclone	● 1000	0/6	● 10000	0/5
Paraclone	● 1000	0/5	● 10000	0/7
	● 100000	0/4		

腫瘍細胞のヌードマウス皮下移植実験)

前立腺癌細胞株、PC3より得られたholocloneは、他のcloneに比べて、少数の細胞でも触知可能な腫瘍を形成する(tumorigenicity)。他のcloneでは10倍、100倍と増やしても腫瘍を形成できない。また、holocloneの移植により形成された腫瘍から細胞を抽出して再移植してもほぼ同様の腫瘍を形成することができる(serial transplantability)。

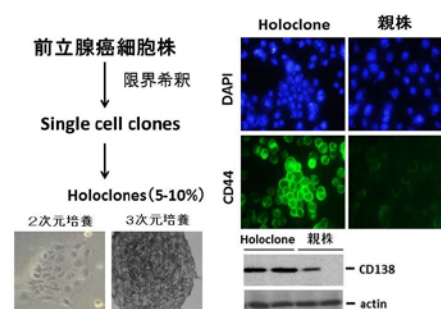


図1 Holoclone の Stemness と CD138 の高発現

ヒト前立腺癌細胞株を single cell として約 20 日培養すると、約 10% のコロニーのいって Holoclone が形成される。Holoclone は、3 次元培養下で高い microsphere 形成能を示し、CD44 発現も高い (Stemness)。また、Holoclone では、CD138 が強発現する。

2) syndecan-1 は前立腺癌の腫瘍増殖を促進する

前立腺癌細胞株である PC3 細胞に shRNA を導入して syndecan-1 を安定的に gene silencing してヌードマウス皮下に移植すると、コントロール細胞に比べて腫瘍細胞の増殖、皮下腫瘍の形成が顕著に抑制されるとともに (図 2A)、同腫瘍細胞内における stem cell marker 陽性細胞 (TIC) 数が顕著に抑制されることが判明した (図 2B)。syndecan-1 は TIC の安定供給とそれに伴う腫瘍増殖に重要な役割を担うと考察される。また、この結果は holoclone を用いることで、TIC の生物学的性状を正確に解析、把握できることを示唆する。

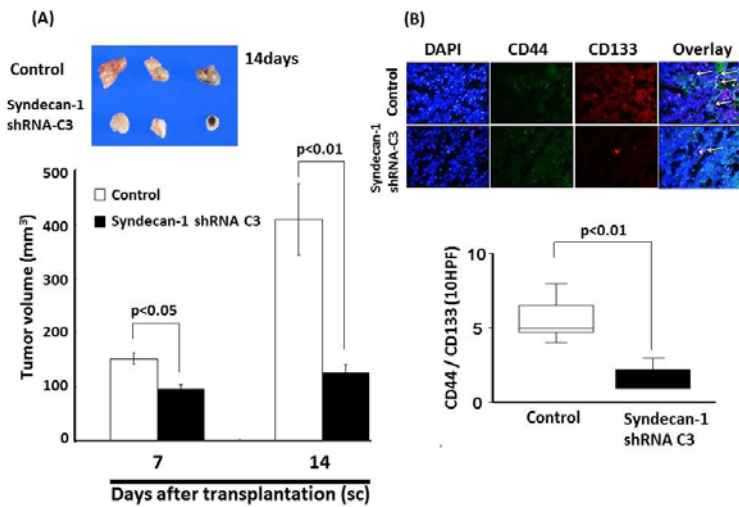


図2 Syndecan-1 ノックダウンによりTICs (CD133/CD44陽性)の数が減少し、*in vivo*腫瘍形成能が顕著に抑制される。

3) syndecan-1 は前立腺癌発生に関与する  
前立腺癌発症モデル動物 (TRAMP マウス) に syndecan-1 阻害剤である OGT2115 (4mM, 1回/日)あるいは syndecan-1 siRNA (20 $\mu$ M 1回/日)を腹腔内投与すると、前立腺癌の発生を有意に抑制させることができた (図 3A)。なお、異型増殖性病変 (ヒト high-grade intraepithelial lesion に相当) に対する抑制効果は認められなかった。興味深いことに、syndecan-1 阻害剤あるいは siRNA の投与により、マウス前立腺癌細胞内の c-kit/CD44 陽性細胞数が強く抑制されることも判明した (図 3B)。以上の結果から、syndecan-1 は TIC の生存と増生によって、前立腺浸潤癌への進展に大きく関与するといえる。また、TIC は癌発生の比較的初期の段階で重要な役割を担う一方、前癌病変形成の段階ではその意義は乏しい可能性がある。syndecan-1 を標的とする分子標的療法等、癌治療を行うことで、前立腺癌 TIC の機能をブロックし、再発を防ぐなど治療効果、予後の大幅な改善が期待される。

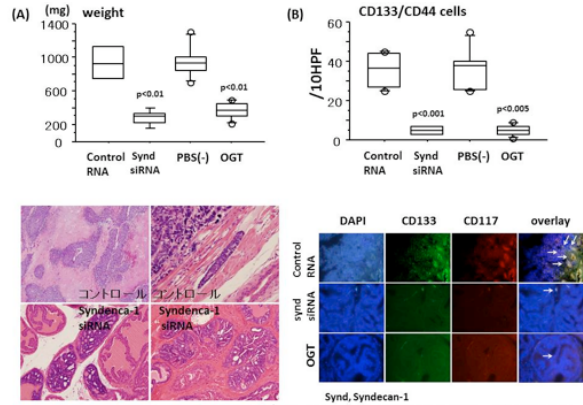


図3 Syndecan-1 阻害剤やノックダウンによりTICs (CD133/CD117陽性)の数が減少し、前立腺浸潤癌やその転移が強く抑制される。

4) Syndecan-1 発現はヒト前立腺癌の予後不良因子である

前立腺全摘出、116 症例 (術前化学療法なし) を用いて、癌細胞における syndecan-1 発現陽性率を免疫組織化学的に検討し、術後再発 (生化学的再発) との関連性を統計学的に解析した (症例の臨床病理学的概要を表 2 に示す)。その結果、癌細胞における Syndecan-1 発現レベルの高い score2 の症例では、有意に再発率が上昇することが分かった (図 4)。実験的事実に加え、ヒトの癌組織上においても syndecan-1 が前立腺癌の悪性度に重要な影響をもたらすことが示された。また、癌細胞における syndecan-1 発現レベルが、入院時 PSA やこれまでに報告されている既知の病理組織学的因子 (表 2) と同様、信頼性の高い前立腺癌予後予測因子となることが証明された。

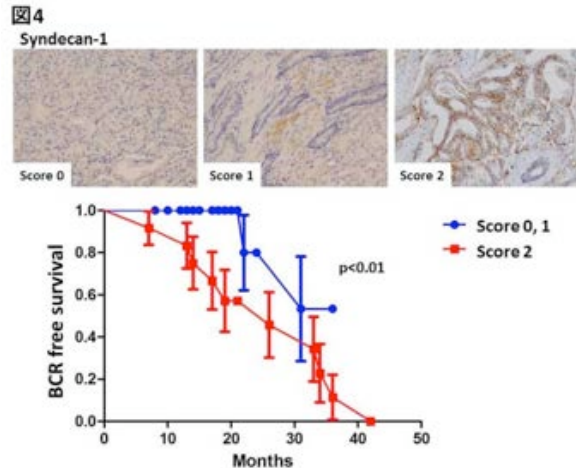


表2 前立腺癌症例の臨床病理学的概要

	BCR(-)	BCR(+)	p value
number of cases	67	39	
Mean age (y.o.)	67.1	68.7	n.s
PSA (ng/ml)			
<10	40	16	
10~20	20	14	
>20	7	9	<0.05
PSA nadr	0.02	0.14	<0.01 (*)
Gleason score			
~6	24	13	
7	33	15	
8~10	10	11	<0.05
Pathological T stage			
~T2	43	15	
T3-4	24	24	<0.05
Resection margin			
positive	52	23	
negative	15	16	<0.05

Chi-square test (\* Mann-Whitney U test)

5) まとめ

syndecan-1 は前立腺癌 TIC の生存を促し安定的に供給することで前立腺癌発生、進展をもたらすと考えられ、将来、前立腺癌治療の重要な分子標的となると期待される。

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 20 件)

- ① Tanaka, N., Fujimoto, K., Hirayama, A., Nakai, Y., Chihara, Y., Anai, S., Tomioka, A., Shimada, K., Konishi, N., Hirao, Y. Calculated Tumor Volume Is an Independent Predictor of Biochemical Recurrence in patients Who Underwent Retropubic Radical Prostatectomy. **Advance in Urology**, 査読有, 2012  
DOI: 10.1155/2012/204215
- ② Fujii, T., Shimada, K., Tanaka, N., Fujimoto, K., Konishi, N. Phyllodes tumor of the prostate. **Pathol Int**, 査読有, 62(3): 204-208, 2012  
DOI: 10.1111/j.1440-1827.2012.02796.x.
- ③ Asai, O., Nakatani, K., Konishi, N. (他 11 名, 11 番目) Decreased renal  $\alpha$ -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. **Kidney Int**, 査読有, 81:539-547, 2012  
DOI: 10.1038/ki.2011.423
- ④ 島田啓司、藤井智美、穴井智、藤本清秀、小西 登、CD138 を介する前立腺癌進展メカニズムの解析—tumor initiating cells への影響—、**泌尿器外科**、査読有、25:1597-1600、2012  
DOI コード, URL なし
- ⑤ Hotta, K., Sho, M., Yamato, I., Shimada, K., Harada, H., Akahori, T., Nakamura, S., Konishi, N., Yagita, H., Nonomura, K., Nakajima, Y. Direct targeting of fibroblast growth factor-inducible 14 protein protects against renal ischemia reperfusion injury. **Kidney Int**, 査読有, 79:151-153, 2011  
DOI: 10.1038/ki.2010.379
- ⑥ 島田啓司, 小西 登. 前立腺癌—基礎・臨床研究のアップデート— I.基礎 前立腺癌の病理 TNM 分類と取扱い規約の諸問題、**日本臨牀**、査読無、69:31-35, 2011  
DOI コード, URL なし
- ⑦ Tasaki, M., Shimada, K., Kimura, H., Tsujikawa, K., Konishi, N. ALKBH3, a human AlkB homologue, contributes to cell survival in human non-small-cell lung cancer. **Br J Cancer**, 査読有, 104:700-706, 2011  
DOI: 10.1038/sj.bjc.6606012
- ⑧ 穴井 智, 井上剛志, 池田朋博, 三宅牧人, 千原良友, 田中宣道, 藤本清秀, 平尾佳彦, 島田啓司, 小西 登. 放射線抵抗性前立腺癌に対する分子標的治療の試み **泌尿器外科**, 査読有, 24:1263-1265, 2011  
DOI コード, URL なし
- ⑨ Takeda, M., Kawaguchi, M., Kumatoriya, T., Horiuchi, T., Watanabe, K., Inoue, S., Konishi, N., Furuya, H. Effects of minocycline on hind-limb motor function and gray and white matter injury after spinal cord ischemia in rats. **Spine**, 査読有, 36:1919-1924, 2011  
DOI: 10.1097/BRS.0b013e3181ffda29
- ⑩ Tanaka, N., Fujimoto, K., Hirayama, A., Torimoto, K., Okajima, E., Tanaka, M., Miyake, M., Shimada, K., Konishi, N., Hirao, Y. Risk-stratified survival rates and predictors of biochemical recurrence after radical prostatectomy in a Nara, Japan, cohort study. **Int J Clin Oncol**, 査読有, 16:553-559, 2011  
DOI: 10.1007/s10147-011-0226-2
- ⑪ Hotta, K., Sho, M., Fujimoto, K., Shimada, K., Yamato, I., Anai, S., Konishi, N., Hirao, Y., Nonomura, K., Nakajima, Y. Prognostic significance of CD45RO+ memory T cells in renal cell carcinoma. **Br J Cancer**, 査読有, 105:1191-1196, 2011  
DOI: 10.1038/bjc.2011.368
- ⑫ Shimada, K., Anai, S., Marco DA, Fujimoto, K., Konishi, N. Cyclooxygenase 2-dependent and independent activation of Akt through casein kinase 2alpha contributes to human bladder cancer cell survival. **BMC Urol**, 査読有, 2011  
DOI: 10.1186/1471-2490-11-8
- ⑬ Shimada, K., Nakamura, M., De Velasco MA, Tanaka, M., Ouji, Y., Miyake, M., Fujimoto, K., Hirao, K., Konishi, N. Role of syndecan-1 (CD138) in cell survival of human urothelial carcinoma. **Cancer Sci**, 査読有, 101:155-160, 2010  
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01379.x.
- ⑭ Iwata, M., Inoue, S., Kawaguchi, M., Nakamura, M., Konishi, N., Furuya, H. Posttreatment but not pretreatment with selective beta-adrenoreceptor 1 antagonists provides neuroprotection in the hippocampus in rats subjected to transient forebrain ischemia. **Anesth Analg**, 査読有, 110: 1126-1132, 2010  
DOI: 10.1213/ANE.0b013e3181d278f7
- ⑮ 島田啓司, 小西 登. 第 11 章 尿管・膀胱・尿道 乳頭腫、**病理と臨床**、査読無、28:210-211, 2010  
DOI コード, URL なし

- ⑫ 小西 登. 第 12 章 男性生殖器 神経周囲浸潤、**病理と臨床**、査読無、28:236-237, 2010  
DOI コード, URL なし
- ⑬ 島田啓司, 小西 登. Syndecan-1(CD138)を介した前立腺癌進展メカニズム、**泌尿器外科**、査読有、23:1011-1014, 2010  
DOI コード, URL なし
- ⑭ 田中宣道, 富岡厚志, 仲川嘉紀, 林美樹, 百瀬均, 三馬省二, 岡島英二郎, 藤本清秀, 平尾佳彦, 浅川勇雄, 玉本哲郎, 長谷川正俊, 小西 登. ステージC前立腺癌症例における根治的前立腺全摘除術、外部照射放射線治療およびホルモン治療の治療成績、**泌尿器外科**、査読有、23:1079-1082, 2010  
DOI コード, URL なし
- ⑮ Park SY, Kim HS, Konishi, N. (他 12 名, 9 番目) Snail is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. **EMBO J**, 査読有, 29:3787-3796, 2010  
DOI: 10.1038/emboj.2010.254
- ⑯ Tanaka, N., Fujimoto, K., Asakawa, I., Hirayama, A., Yoneda, T., Yoshida, K., Hirao, Y., Hasegawa M., Konishi, N. Variations in health-related quality of life in Japanese men who underwent iodine-125 permanent brachytherapy for localized prostate cancer. **Brachytherapy**, 査読有, 9:300-306, 2010  
DOI: 10.1016/j.brachy.2009.07.013.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 穴井 智, 井上剛志, 三宅牧人, 池田朋博, 松村善昭, 田中宣道, 平尾佳彦, 島田啓司, 小西 登, 藤本清秀, 前立腺疾患の発生・進展における間質リモデリングの役割、第 28 回前立腺シンポジウム、2012 年 8 日、東京
- ② 田中宣道, 飯田孝太, 大西健太, 橋村正哉, 辰巳佳弘, 桑田真臣, 穴井 智, 松村善昭, 山本雅司, 島田啓司, 小西 登, 平尾佳彦, 藤本清秀, 年齢・体積別生検本数ノモグラムを用いた前立腺生検における至適生検本数の検討、第 28 回前立腺シンポジウム、2012 年 8 日、東京
- ③ 藤井智美, 島田啓司, 井筒千賀, 田中宣道, 藤本清秀, 平尾和也, 小西 登, 前立腺の良性腺管、前癌病変および癌に浸潤する炎症細胞の免疫組織化学的解析、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 21 日、札幌
- ④ 藤井智美, 島田啓司, 中谷公彦, 小西 登, 前立腺炎に関わる炎症細胞の免疫組織化学的解析、第 101 回病理学会総会、2012 年 4 月 27 日、東京
- ⑤ 田中宣道, 堀 俊太, 森澤洋介, 篠原雅岳, 喜馬啓介, 穴井 智, 鳥本一匡, 平山暁秀, 藤本清秀, 浅川勇雄, 長谷川正俊, 小西 登, 平尾佳彦, 前立腺癌小線源治療後の排尿障害に対する  $\alpha$ -1 ブロッカーの硬化-ナフトピジル・シロドシン対照試験、第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012 年 4 月 21 日、横浜
- ⑥ 小池浩之, デベラスコ マルコ, 山本 豊, 畑中祐二, ワン イー, 島田啓司, 吉川和宏, 荒尾徳三, 西尾和人, 小西 登, 植村天受, PTEN 遺伝子改変マウスを用いた酢酸クロルマジノンによる前立腺癌発癌抑制効果、第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011 年 4 月 23 日、名古屋
- ⑦ 田中宣道, 大塚憲司, 富岡厚志, 穴井 智, 三宅牧人, 井上剛志, 池田朋博, 松村善昭, 山本雅司, 藤本清秀, 平尾佳彦, 小西 登, 前立腺癌初期 staging における骨シンチの有用性、第 26 回前立腺シンポジウム、2010 年 12 月 12 日、東京
- ⑧ 穴井 智, 井上剛志, 池田朋博, 三宅牧人, 千原良友, 田中宣道, 藤本清秀, 平尾佳彦, 島田啓司, 小西 登, 放射線抵抗性前立腺癌に対する分子標的治療の試み、第 26 回前立腺シンポジウム、2010 年 12 月 11 日、東京
- ⑨ Shimada, K., Anai, S., Fujimoto, K., Hirao, Y., Tasaki, M., Konishi, N. A novel signal associated with reactive oxygen species for maintenance of prostate cancer stem cell-like population. 第 69 回日本癌学会総会、2010 年 9 月 23 日、大阪
- ⑩ Koike, H., Marco A. De Velasco, Shimada, K., Yoshikawa, K., Arao, T., Nishio, K., Konishi, N., Uemura, H. Pre-clinical chemopreventive efficacy of chlormadinone acetate against prostate cancer. 第 69 回日本癌学会総会、2010 年 9 月 23 日、大阪
- ⑪ Marco A. De Velasco, Koike, H., Shimada, K., Yoshikawa, K., Konishi, N., Arao, T., Nishio, K., Uemura, H. The phosphorylation status of FADD in biopsy specimens is associated with biochemical recurrence after prostatectomy. 第 69 回日本癌学会総会、2010 年 9 月 23 日、大阪
- ⑫ 小西 登, 島田啓司, 池田朋博, 田中宣道, Gleason 分類とハイリスク前立腺癌、第 37 回尿路悪性腫瘍研究会、2010 年 7 月 17 日、東京
- ⑬ 穴井 智, 井上剛志, 三宅牧人, 池田朋博, 富岡厚志, 桑田真臣, 松村善昭, 谷善啓, 田中宣道, 藤本清秀, 平尾佳彦, 島田啓司, 小西 登, 前立腺全摘標本における Molecular Profile による再発予測、

第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010 年  
4 月 27 日、盛岡

- ⑭ 島田啓司, Marco A. De Velasco, 植村天  
受, 田崎正人, 小西 登、CD138 を介し  
たホルモン不応性前立腺癌進展メカニズ  
ムの解析と病理学的意義について、第 99  
回日本病理学会総会、2010 年 4 月 28 日、  
東京

〔図書〕(計 1 件)

- ① 小西 登、島田啓司、最新医学社、最新医  
学 第 67 巻/第 3 号 特集 がんの分子病  
理診断 -免疫染色と遺伝子診断の進歩-、  
2012 年、413-418

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小西 登 (KONISHI NOBORU)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20145832

### (2) 研究分担者

島田啓司 (SHIMADA KEIJI)  
奈良県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90336850

### (3) 連携研究者

なし