

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590387

研究課題名(和文) ヒト前立腺癌のホルモン不応性獲得におけるセロトニンの役割と新たな治療標的の可能性

研究課題名(英文) Development of novel therapy for hormone-refractory prostate cancer patients through targeting 5-HT receptor and mast cells

研究代表者

中村 保宏 (NAKAMURA, Yasuhiro)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80396499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌細胞では、ER が発現し癌の進展に関与している。一方、5-HT受容体の1つ5-HTR4の前立腺癌細胞での発現も知られている。我々は、術前未治療のヒト前立腺癌検体での5-HTR4の発現状況を検討した。5-HTR4陽性例では陰性例に比べER の発現度が有意に高かった。癌細胞周囲間質には、肥満細胞が随所に認められた。LNCaP細胞を用いた検討では、癌細胞での5-HTR4発現と5-HTR4のアゴニスト添加によるER mRNAの発現上昇と癌細胞の遊走能低下が認められた。よって、前立腺癌組織では周囲間質の肥満細胞由来5-HTが、癌細胞の5-HTR4を介してその病態に影響していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：ER beta is well known to play important roles in the pathogenesis of prostate cancer. Increased expression of 5-HT receptor, especially type 4 (5-HTR4), has been also proposed to be involved in the pathogenesis and peritumoral mast cells have been known to be histopathologically present. In our immunohistochemical analysis (n=112), 5-HTR4 immunoreactivity was detected in 34% cases, and its immunoreactivity was significantly correlated with that of ER beta. Peritumoral mast cells, a potential site of serotonin production, were abundant within the tissues. 24h incubation of LNCaP cells with 5-HTR4 agonist increased the expression level of ER beta mRNA, while inhibited migration of cancer cells compared to controls. These findings indicated that 5-HTR4 may be involved in the pathogenesis of human prostate cancer cells possibly through 5-HT secreted by peritumoral mast cells.

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：内分泌・泌尿器

キーワード：前立腺癌 セロトニン受容体 エストロゲン受容体 肥満細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト前立腺癌細胞ではエストロゲン受容体 $\beta$  (ER $\beta$ )が発現しており、性ステロイドによる前立腺癌の進展に参与している。一方、去勢抵抗性前立腺癌(HPRC)では癌組織での微小環境形成の役割が重要と考えられているが、その中でもセロトニン(5-HT)受容体の1つである5-HTR4の癌細胞での発現亢進が注目されてきた。しかし、ヒト前立腺癌細胞での5-HTR4とER $\beta$ の発現度等との相関については一切検討されていない。

## 2. 研究の目的

- (1) 前立腺癌組織における5HTR4蛋白の発現を免疫組織化学的に検討し、ER $\beta$ を含むステロイドホルモン受容体発現度や臨床病理学的因子との関連を評価する。
- (2) 5-HTR4発現陽性前立腺癌培養細胞にアゴニスト添加を行い、ER $\beta$  mRNAの発現量、および遊走能の変化を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫組織化学的検討

対象： 東北大学病院において、前立腺癌と確定診断された症例(手術検体)  
ホルマリン固定・パラフィン包埋 (n=112; Age 63.2 $\pm$ 0.5y) (術前化学療法、放射線療法、ホルモン療法施行症例は除く。  
東北大学医学部倫理委員会承認済。)  
方法： The streptavidin-biotin amplification method 抗体：5HTR4 (MBL International), 5HT (DAKO), AR (DAKO), Ki-67 (Immunotech), ER $\beta$  (Immunotech Gene Tex, Inc.)  
評価方法： 癌細胞を1000個カウント、陽性細胞の割合(%)を求める(LI法)  
→ 5HTR4: 10%未満; 陰性( ) 10%以上; 陽性(+)  
統計解析:  $\chi^2$ -test or unpaired *t*-test (Statistical

significance:  $P < 0.05$ )

### (2) 定量 RT-PCR 法

培養細胞：LNCaP 前立腺癌培養細胞株 (5HTR4発現)

方法：Vehicle あるいは Cisapride monohydrate (5HTR4 agonist) を投与。

→24時間 incubation 後、ER $\beta$  mRNA 発現量を定量 RT-PCR で解析。

LightCycler System (Roche Diagnostics GmbH)を使用。補正はRPL13A (house keeping gene) mRNA で行う。

統計学的解析法： one-way ANOVA (Statistical significance:  $P < 0.05$ )

### (3) 癌細胞の遊走能測定

培養細胞：LNCaP 前立腺癌培養細胞株 (5HTR4発現)

方法：Vehicle あるいは Cisapride monohydrate (5HTR4 agonist) を投与。

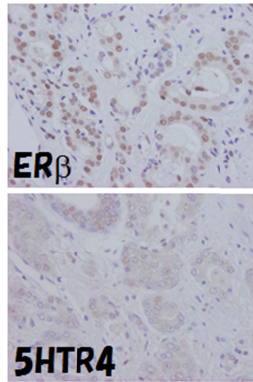
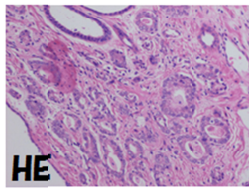
→24時間 incubation 後、細胞遊走能を解析。PET track-etched membrane cell culture inserts (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)を使用。  
統計学的解析法： one-way ANOVA (Statistical significance:  $P < 0.05$ )

## 4. 研究成果

### (1) 免疫組織化学的検討

全112例中38症例で5-HTR4が陽性所見を示し、陽性例では陰性例に比べER $\beta$ の発現度が有意に高かった( $P < 0.05$ )。一方、癌細胞での5-HT発現はほとんど認められなかったが、癌細胞周囲間質に肥満細胞が豊富に認められた。

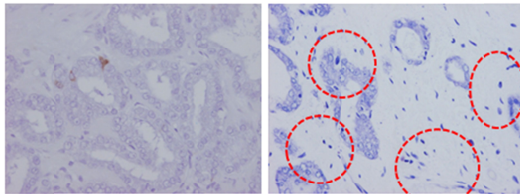
### ヒト前立腺癌組織



### ヒト前立腺癌組織

5HT

トルイジン青



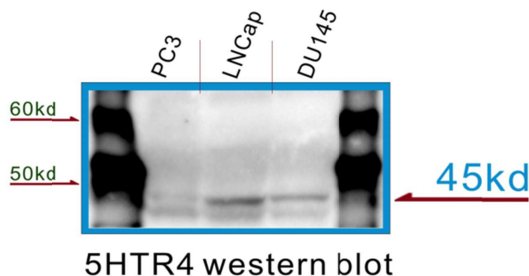
Mast cells

### 前立腺癌組織での5HTR4発現と臨床病理学的因子

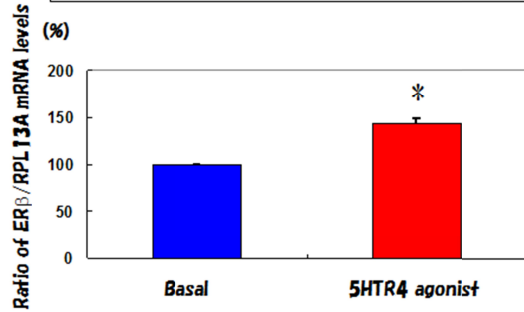
5HTR4		Positive (n=38)	Negative (n=74)	P value
Age (years)		63.3±0.9	63.1±0.7	0.882
PSA (ng/mL)		12.2±2.1	10.4±1.2	0.430
Gleason score	2-6	5 (4.5%)	19 (17.0%)	0.265
	7	16 (14.3%)	30 (26.9%)	
Stage	8-10	17 (15.2%)	25 (22.3%)	0.678
	pT2	20(17.9%)	39 (34.8%)	
	pT3	15(13.4%)	32 (28.6%)	
Lymph node	pT4	3 (2.7%)	3 (2.7%)	0.180
	(+)	4 (3.6%)	3 (2.7%)	
	(-)	34 (30.4%)	71 (63.4%)	0.757
AR LI (%)		76.2±3.7	77.5±2.4	0.034*
ERβ LI (%)		69.2±4.2	57.2±3.3	0.195
Ki-67 LI (%)		7.5±1.0	6.1±0.5	

### (2) 定量 RT-PCR 法

LNCaP 癌細胞で 5-HTR4 が発現し、5-HTR4 のアゴニスト添加により癌細胞での ERβ mRNA の発現上昇が認められた。



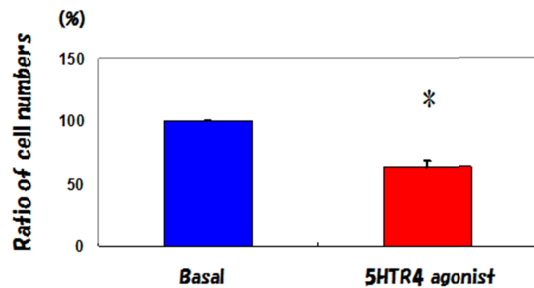
### LNCaP cell でのERβ mRNA発現量の変化(24h)



### (3) 癌細胞の遊走能測定

5-HTR4 のアゴニスト添加により癌細胞の遊走能低下が認められた。

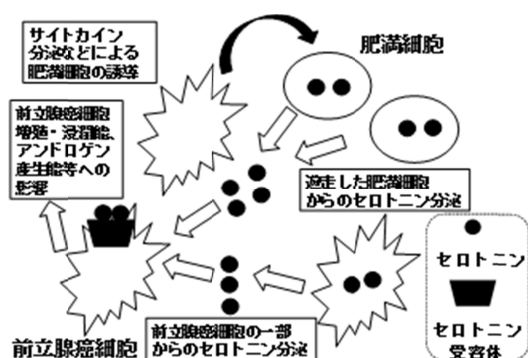
### LNCaP cell でのcell migrationの変化(24h)



### < 考察 >

ヒト前立腺癌細胞での 5HT 発現量は非常に少ない。一方で、癌細胞周囲間質に肥満細胞浸潤が比較的良好に認められた。よって、前立腺癌組織で作用する 5HT は主に肥満細胞由来である可能性が考えられた。今回の結果では、ヒト前立腺癌組織のうち 5HTR4 発現陽性例では陰性例に比し ERβ 発現が有意に高く、また LNCaP 細胞では、5HTR4 agonist 投与により ERβ mRNA 発現が有意に上昇することが確認された。過去の文献では、ヒト乳癌では 5HTR4 発現が ERα や PR の発現と有意に相関すること (Kopparapu et al., 2013)、ラット下垂体細胞では、E2 投与により 5HTR4 の発現が誘導されること (Papageorgiou et al., 2007) が知られている。よって、ヒト前立腺癌細胞でも 5HTR4 と ERβ は互いに関与し、HPRC 等に重要な役割を果たしている可能性が示唆さ

れる。



今回の結果では、LNCaP 細胞では、5HTR4 agonist 投与により遊走能が有意に低下した。しかし、過去の文献では前立腺癌では、5HT は癌の増殖や遊走を誘導すると考えられている(Amorino et al., 2004)。また、Glioma 細胞では、5HT が 5HT 受容体(5HTR)の他のサブタイプである 5HTR1A や 5HTR2 を介して癌細胞の浸潤や増殖能を亢進させることが報告されている(Merzak et al., 1996)。したがって、これらの癌細胞の種類、あるいは発現している 5HTR の subtype の差異を含め、5HT 自体の前立腺癌細胞遊走能への影響、さらにこの LNCaP 細胞株での 5HTR の subtype の発現度をさらに詳細に検討する必要がある。

以上から、ヒト前立腺癌細胞では、肥満細胞由来の 5HT が癌細胞に発現する 5HTR4 を介して、ER $\beta$  の発現や癌細胞の遊走能などの病態に関与している可能性が示唆された。

## 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)

[学会発表](計 4 件)

- 1) ヒト前立腺癌組織での 5-HTR4 によるエストロゲン受容体  $\beta$  (ER $\beta$ ) の発現調節、中村保宏、伊勢和恵、フェリゾラ サウロ、齊藤涼子、佐藤聡子、前川尚志、深谷佐智子、佐藤直実、勝島 浩

紀、柴原裕紀子、板倉裕子、谷内真司、笠島敦子、藤島史喜、渡辺みか、荒井陽一、笹野公伸 第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 25 日、広島

- 2) Serotonin receptor 4 (5-HTR4) regulates expression of ER beta (ER $\beta$ ) and cell growth in human prostate cancer, Yasuhiro Nakamura, Kazue Ise, Saulo JA Felizola, Keely M McNamara, Hironobu Sasano ENDO 2013、2013 年 6 月 15 日、米国、サンフランシスコ
- 3) Involvement of serotonin receptor 4 (5-HTR4) in ER beta expression and cancer development through peritumoral mast cells in human prostate cancer tissue, Yasuhiro Nakamura, Kazue Ise, Keely McNamara, Hironobu Sasano, Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference、2013 年 2 月 25 日、米国、マウイ
- 4) Involvement of serotonin receptor 4 (5-HTR4) in ER beta expression and invasion of peritumoral mast cells in human prostate cancer tissue, Yasuhiro Nakamura, Takashi Maekawa, Kazue Ise, Shigeto Ishidoya, Yoichi Arai, Hironobu Sasano Advances in Prostate Cancer Research、2012 年 2 月 7 日、米国、オーランド

## 6. 研究組織

- (1)研究代表者  
中村 保宏 (NAKAMURA, YASUHIRO)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：80396499
- (2)研究分担者  
なし
- (3)連携研究者 笹野公伸  
笹野 公伸 (SASANO, HIRONOBU)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：50187142