

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592388

研究課題名(和文)炎症による前立腺発癌機構に関する研究

研究課題名(英文)Study of inflammation in prostate carcinogenesis

研究代表者

野々村 祝夫 (Nonomura, Norio)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30263263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：「前立腺炎症後の再生における骨髄由来細胞浸潤」GFPキメララットの経尿道的LPS投与による前立腺炎症モデルにおいて、その再生過程で前立腺に浸潤する細胞をFACSにて解析したところ、腺管内に骨髄由来の細胞が浸潤していることが明らかとなった。免疫組織染色や定量的PCRより、前立腺再生腺管内に浸潤する骨髄由来細胞が上皮系のマーカーであるcytokeratin 8(CK8)を発現していることが分かった。このことは炎症により破壊された前立腺においては、浸潤した骨髄由来細胞が上皮系幹細胞となって腺管再生に寄与している可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Using chimera rats that received allogenic bone marrow grafts from green fluorescent protein (GFP) transgenic rats, we investigated the existence of epithelial marker-positive BMDCs in injured prostate tissue caused by transurethral injection of lipopolysaccharide. Immunofluorescence staining showed that some cells in the stroma co-expressed GFP and pan-cytokeratin, which suggested the existence of epithelial marker-positive BMDCs. We collected bone marrow-derived non-hematopoietic cells (GFP+/CD45- cells) from the prostate. The number of cells in this population significantly increased in injured prostate compared with normal prostate tissue. In the prostate obtained from the chimera rats 34 weeks after lipopolysaccharide injection, GFP- and cytokeratin-positive cells were observed in the prostate gland, which suggested that some of the cells in the prostate gland regenerated after prostate inflammation derived from bone marrow.

研究分野：腫瘍

キーワード：前立腺

### 1. 研究開始当初の背景

現在までの多くの疫学的研究から、前立腺癌の発生・進展には、加齢、食事、炎症などの後天的要因が大きく関与していると考えられている。日本人の高齢化と生活様式の欧米化に伴って前立腺癌が増加していることを考えると、食事や炎症といった環境因子の影響について研究することは非常に重要である。

申請者らは、食肉の高温調理によって生じる発癌物質である heterocyclic amine の一つである PhIP(2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine)をラットに投与すると前立腺癌が発生し、その初期段階で肥満細胞やマクロファージなど自然免疫系の炎症細胞が前立腺に浸潤し、ヒト発癌過程に見られる炎症を伴った萎縮性病変である PIA (proliferative inflammatory atrophy)様病変が出現することを報告してきた(Cancer Res 67: 1378, 2007)。また、LPS (lipopolysaccharide)の経尿道的投与による前立腺炎が、PhIP の摂取により助長されることも明らかにしてきた。これらのことは、食餌性因子が炎症とリンクしながら前立腺発癌を促進させている可能性を示している。また、ヒトにおいても腫瘍の増殖や進展に自然免疫系の細胞が重要であることを明らかにしてきており(Br J Cancer 97: 952, 2007, BJU Int 107: 1918, 2011)、炎症はヒト前立腺発癌でも重要な役割を担っていると考えられている。

### 2. 研究の目的

PhIP という heterocyclic amine をラットに経口投与すると、前立腺に炎症が誘発され、prostatic intraepithelial neoplasia (PIN)様病変を経て、前立腺癌が生じる。また、ラットに経尿道的に Lipopolysaccharide (LPS)を注入すると、前立腺炎が生じ、上皮の脱落とそれに引き続く再生過程が観察される。この系を用いて、ラットにおける前立腺の発癌過程における経時的な遺伝子変化と幹細胞の動態を検討する。また、前立腺炎症後の再生過程における組織幹細胞の動態と組織変化に伴う遺伝子発現の解析を行う。

### 3. 研究の方法

ラット前立腺炎症後の再生過程における組織幹細胞の動態解析と、ラットの炎症後前立腺発癌モデルにおける遺伝子変化の解析を平行して行うため、以下に方法を記載する。

#### 「前立腺幹細胞の分離と機能解析」

雄ラットに LPS を経尿道的に投与することで、前立腺炎を引き起こす。炎症は前立腺腹葉に特異的に発生するため、前立腺腹葉を経時的に(3, 7, 14, 21, 35, 42 日)に採取する。採取した前立腺腹葉は細切し、pronase 処理した後、ナイロンメッシュで濾過して前立腺内の細胞を分離する。分離した細胞を赤血球系細胞のマーカーである CD45 と幹細胞マ-

ーカー (CD133, CD44, CD117 など) で標識し、フローサイトメトリーで分離する。CD45(-)、幹細胞マーカー(+)の細胞(X細胞)は前立腺幹細胞の可能性があり、このX細胞がどのような性質ももっている

[PhIP 誘導性ラット前立腺癌発癌課程における組織変化の観察]

上記研究と平行して、PhIP によって誘導される組織変化を経時的に観察し、前立腺癌の幹細胞マーカーのによる幹細胞の動態を解析する。また、Laser capture microdissection 法による DNA の抽出を行い、DNA array による遺伝子発現あるいはコピー数の変化を調べる。

### 4. 研究成果

「前立腺炎症後の再生における骨髄由来細胞浸潤」GFP キメララットの経尿道的 LPS 投与による前立腺炎症モデルにおいて、その再生過程で前立腺に浸潤する細胞を FACS にて解析したところ、腺管内に骨髄由来の細胞が浸潤していることが明らかとなった。免疫組織染色や定量的 PCR より、前立腺再生腺管内に浸潤する骨髄由来細胞が上皮系のマーカーである cytokeratin 8(CK8)を発現していることが分かった。このことは炎症により破壊された前立腺においては、浸潤した骨髄由来細胞が上皮系幹細胞となって腺管再生に寄与している可能性を示唆する。

「炎症と発癌」この系において前立腺の発癌誘導剤である PhIP を投与すると、癌には至らないまでも、前癌病変として知られる prostatic intraepithelial neoplasia (PIN)を高頻度に形成することが分かった。これらの PIN 病変においては細胞増殖が亢進しており、発癌の前段階に達しているものと判断された。しかし、長期に PhIP を投与しても発癌率には有意な差を見いだし得なかった。この PhIP による発癌誘導の系では、前立腺発癌に1年以上の期間を要してしまうため、繰り返し実験を行うことが困難である。

「遺伝子改変前立腺発癌モデルの導入」Cre/LoxP システムを用いた PTEN 遺伝子の前立腺特異的ノックアウトマウスを作成し、その発癌過程を観察した。6 週でほぼすべてのマウスの前立腺様病変が生じ、12 週で癌を形成することが観察された。この前立腺を摘出し、浸潤する細胞を骨髄由来細胞をその表面マーカーによって sorting し、さらに種々のマーカーで分画を調べた。その結果、全細胞中の骨髄由来細胞(CD45+)の増加、CD45+細胞中の MDSC 細胞(骨髄由来幹細胞)の比率の増加、CD45+細胞中の樹状細胞の増加を認めた。発癌過程での骨髄由来細胞、免疫系細胞の浸潤が認められ、何らかの役割を果たしていることが示唆された。

### 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)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Bone marrow-derived cells contribute to regeneration of injured prostate epithelium and stroma. Nakata W, Nakai Y, Yoshida T, Sato M, Hatano K, Nagahara A, Fujita K, Uemura M, Nonomura N. Prostate. 2015 Jun;75(8):806-14.

Inflammation and prostate carcinogenesis. Nakai Y. and N. Nonomura  
Int J Urol. 2013 Feb;20(2):150-60.

White blood cell count is positively associated with benign prostatic hyperplasia. Fujita K, Hosomi M, Nakagawa M, Tanigawa G, Imamura R, Uemura M, Nakai Y, Takayama H, Yamaguchi S, Nonomura N  
Int J Urol. 2014 Mar;21(3):308-12.

Residual prostate cancer cells after docetaxel therapy increase the tumorigenic potential via constitutive signaling of CXCR4, ERK1/2 and c-Myc. Hatano K, Yamaguchi S, Nimura K, Murakami K, Nagahara A, Fujita K, Uemura M, Nakai Y, Tsuchiya M, Nakayama M, Nonomura N, Kaneda Y.

Mol Cancer Res. 2013 Sep;11(9):1088-100.

〔学会発表〕(計 8 件)

Nakata W, Nakai Y, Yoshita T, Hatano K, Sato M, Nagahara A, Fujita K, Uemura M, Nonomura N.

Bone marrow-derived cells contribute to regeneration of Injured prostate epithelium and stroma  
AUA Annual Meeting 2015, Orlando (USA), 2014/5/16-5/21

Fujita K, Shimomura M, Nagahara A, Uemura M, Nakata W, Sato M, Nakai Y, Miyoshi E, Nonomura N.

Serum fucosylated haptoglobin as a novel prognostic biomarker predicting prostate cancer with Gleason 7 or more.  
29th Annual meeting of the European Association of Urology, 2014年04月11日~2014年04月15日, Stockholm (Sweden)

Fujita K, Shimomura M, Nagahara A, Uemura M, Nakata W, Sato M, Nakai Y, Miyoshi E, Nonomura N.

Serum fucosylated haptoglobin as a novel prognostic biomarker predicting prostate cancer: Detailed analysis of its oligosaccharide structures.  
AACR Annual Meeting, 2014年04月05日~2014年04月09日, San Diego (USA)

藤田和利, 中田 渡, 河嶋厚成, 氏家 剛, 永原 啓, 植村元秀, 下村真由香, 中の三弥子, 三善英知, 野々村祝夫

前立腺がん患者における血中フコシル化ハプトグロビンの解析および新規バイオマーカーとしての有用性の検討

第 103 回日本泌尿器科学会総会, 2015 年 04 月 18 日~2015 年 04 月 21 日, 金沢

河嶋厚成, John Okello, 氏家 剛, 永原 啓, 藤田和利, David Berman, 野々村祝夫

ミトコンドリア DNA に対する次世代シーケンスを用いた前立腺全摘標本および前立腺生検標本におけるクローン解析

第 103 回日本泌尿器科学会総会, 2015 年 04 月 18 日~2015 年 04 月 21 日, 金沢

川村憲彦, 波多野浩士, 中田 渡, 吉田栄宏, 河嶋厚成, 氏家 剛, 永原 啓, 藤田和利, 植村元秀, 金田安史, 野々村祝夫

ドセタキセル抵抗性の前立腺癌細胞では, CXCR4・p-ERK1/2・c-Myc の signaling loop が形成され, 腫瘍造成能が亢進している

第 103 回日本泌尿器科学会総会, 2015 年 04 月 18 日~2015 年 04 月 21 日, 金沢

中井康友, 藤田和利, 野々村祝夫

前立腺癌発癌と免疫細胞

第 33 回日本アンドロロジー学会

2013 年 07 月 26 日~2013 年 07 月 27 日, 大阪

中田 渡, 中井康友, 川村憲彦, 吉田栄宏, 佐藤元孝, 永原 啓, 藤田和利, 植村元秀, 野々村祝夫

前立腺の炎症-再生プロセスにおける骨髄由来細胞の役割

第 23 回泌尿器科分子・細胞研究会, 2014 年 03 月 14 日~2014 年 03 月 15 日, 山形

〔図書〕(計 0 件)

〔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 :

出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野々村 祝夫 (Nonomura, Norio)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：30263263

### (2) 研究分担者

中井 康友 (Nakai, Yasutomo)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：20432479

高山 仁志 (Takayama, Hitoshi)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：50403051

藤田 和利 (Fujita, Kazutoshi)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：50636181