

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592399

研究課題名(和文) 前立腺がん幹細胞の同定と特異的がんワクチン療法の樹立

研究課題名(英文) Isolation of prostate cancer stem-like cell and establishment of specific prostate cancer immunotherapy

研究代表者

舂森 直哉 (MASUMORI, Naoya)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20295356

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)：本研究の目的は前立腺癌のがん幹細胞の同定と解析および治療法の樹立である。ヒト前立腺癌細胞株22Rv1に対してALDH1活性分析を行ったところ、ALDH1活性の高い細胞集団にがん幹細胞が多く含まれ、hepatocyte growth factor(HGF)を分泌することがわかった。前立腺癌患者の摘出標本のHGF免疫染色を行い術後のPSA再発との関係を調べた結果、HGF陽性率5%以上の症例群は5%未満の症例に比較し有意にPSA再発までの期間が短かった。HGFの抑制が癌の再発回避につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate prostate Cancer Stem Cells/ Cancer Initiating Cell (CSCs/CICs). Prostate CSCs / CICs were isolated as ALDH1 high cells using the ALDH1 activity assay. We found that prostate CSCs / CICs expressed higher levels of growth factors including hepatocyte growth factor (HGF). The results indicate that HGF secreted by prostate CSCs / CICs. The purpose of the next study was to evaluate the relationship between expression of HGF in prostate tissues and biochemical recurrence after radical prostatectomy. Immunohistochemical staining of HGF was compared to biochemical recurrence after radical prostatectomy. Patients with tumors exhibiting HGF positivity of 5% or more had a significantly shorter biochemical recurrence-free period than that of patients whose tumor HGF positivity was less than 5%. Our data suggests that therapeutic targeting of CSCs/CICs in prostate cancer is a future possibility

研究分野：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

前立腺がんは近年もっとも増加しているがんのひとつとして注目されている。早期であれば種々の治療により治癒が期待できる癌である。しかし進行癌の場合、あるいは早期であっても再発をきたした場合、前立腺がんは各種治療法に抵抗性となりゆっくりと進行しいずれ患者を死に至らしめる。進行が緩徐であることは、患者の病気の進行に恐れる期間が他臓器の癌種より長いとも言え、患者の慢性的な精神的ストレスも図りしえない。一方でその期間にさらに効果的な治療法が受けられれば、肉体的のみならず精神的にも患者を救うことができると考えている。

一般にがんが治療に抵抗性となる一因として、がん幹細胞の存在が唱えられている。がん幹細胞は自己複製能と多分化能を持ち合わせており、この性質はがんの転移・再発や抗がん剤への耐性に関与しているといわれる。つまり抗がん剤や放射線照射などを施しても効果を認めるのは一般のがん細胞のみであり、がん幹細胞は生き残ってしまうため、それが転移・再発に関与すると言うのである。がん幹細胞を標的として治療できれば、がん細胞すべてを取りこぼしなく治療することが可能である。すでに白血病幹細胞研究は進んでおり、米国では臨床応用に向けた研究が進んでいる。日本国内では患者組織からがん幹細胞を同定した報告はまれであり、岐阜大学のグループから悪性脳腫瘍において報告がある。前立腺のがん幹細胞研究は米国で盛んに進められているが、がん細胞一つをマウス1匹の腎被膜下に移植しその動態をさぐるものが多く、多くの時間と手間・費用がかかっている(2)と推測された。

2. 研究の目的

(1) がん幹細胞では Aldehyde Dehydrogenase 活性が高いと言われている。この特性を利用して行う ALDH1 活性分析により乳がんや脳腫瘍などのがん幹細胞の豊富な集団を同定することが可能となったと報告されていたが、前立腺がんにおいては報告がなかった。この方法を用いて、これまでより効率よくかつ確実に、ヒトにおけるがん幹細胞の豊富な細胞集団を同定しさらにはその特性を解析することを第一の目的とした。

(2) 前立腺がん患者の検体から組織を一部採取し、ALDH1 活性分析を行い、ヒトにおけるがん幹細胞を回収することを第二の目的とした。更にはそのがん幹細胞集団の解析からがん幹細胞特異的な細胞表面マーカーを同定しそれをターゲットとする、がんワクチ

ン療法を樹立することを第三の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌細胞株 22Rv1 に対して ALDH1 活性分析 (ALDEFLUOR® 試薬を使用) を行い、FACS Aria を用いてフローサイトメトリーを行い ALDH1 活性別に細胞を回収した。回収した細胞群 (ALDH1-high および ALDH1-low) に対し以下の検討を行った。

- ・腫瘍増殖試験
- ・sphere forming assay
- ・DNA microarray
- ・PCR
- ・Invasion assay

(2) DNA microarray で得られた ALDH1-high および ALDH1-low に特徴的な遺伝子の中で、ALDH1-high で高発現している遺伝子の性質につき調査した。(後に ALDH1-high 細胞集団を前立腺がん幹細胞集団と判断する)

(3) (2)の解析により本来間質細胞から分泌されていると言われる肝細胞増殖因子(HGF)をがん幹細胞集団が高発現していることが明らかとなった。そこで HGF の役割を調査する目的で、ALDH1 活性別細胞集団の培養液(回収後3日間培養)中の HGF 蛋白をエライザ法およびウェスタンブロット法により確認した。また 22Rv1 細胞に対して外因性の HGF を加えた状態、または筋線維芽細胞の培養液を加えた状態、さらには抗 HGF 抗体を加えた状態で、癌幹細胞に特徴的な sphere (浮遊細胞塊) 形成分析を行い sphere 形成能がどうなるか評価した。さらに、HGF の受容体である cMet を si-RNA 法によりノックダウンし、sphere 形成能の変化や NOD/SCID マウス皮下での腫瘍形成能の変化につき評価した。

(4) 前立腺癌患者標本を用いて ALDH1 活性分析を行った。また癌幹細胞マーカーの SOX2 と HGF とでの免疫染色を行い実際にヒトにおいてもがん幹細胞が存在するのか確認した。

(5) 2008年12月~2011年10月に前立腺癌の診断で根治的前立腺摘除術を施行した101例を対象とし、摘出標本を HGF および HGF の受容体である cMet で染色し陽性率、濃度を評価した(札幌医科大学自主臨床研究承認番号:25-36)。予後予測能評価のため HGF の陽性率と濃度の ROC 解析を行った結果、カットオフ値を陽性率 5%に設定することとした。対象を HGF 陽性率 5%以上と未満とで二群に分け、各種因子(年齢、Body Mass Index、術前 PSA、病理学的 T stage、切除断端陽性、Gleason score)と PSA 再発との関係を Fisher's exact test で評価した。また両群に

における PSA 再発までの期間を Kaplan-Meier 法および log rank test で評価した。さらに PSA 再発予測因子について単変量および多変量解析を行った

4. 研究成果

(1) 22Rv1 では ALDH1-high は全体の 6.8% に認められ (図 1) 高い造腫瘍能を示した ($p < 0.05$, t-test, 図 2)。また ALDH1-high では sphere 形成能が高く、PCR 法では幹細胞マーカーの PROM1 および NKX3-1 を高発現していたことより、がん幹細胞を豊富に含むと考えられた。Invasion assay では ALDH1-high の浸潤能が高かった。以上より ALDH1-high は前立腺がん幹細胞を多く含む細胞集団であると判断できた。

図 1

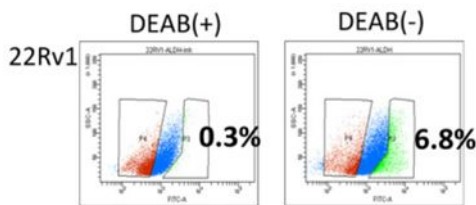


図 2



(2) DNA microarray の結果、ALDH1-high は ALDH1-low と比較して 200 以上の遺伝子の高発現を認めた。これらの遺伝子のうち特徴的なものに関して、実際に遺伝子高発現があるのか PCR 法で確認した。このうち通常は間質細胞で発現する HGF が ALDH1-high で高発現していることがわかった。(図 3)

図 3



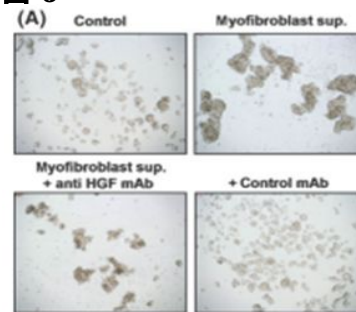
(3) ALDH1-high と ALDH1-low の培養液の HGF 蛋白量はエライザ法ならびにウェスタンブロット法のいずれでも有意に ALDH1-high で高濃度であることがわかった (図 4)。また 22Rv1 細胞に外因性の HGF を加えたところ Sphere 形成能が上昇することがわかった。ま

た間質細胞である筋線維芽細胞の培養液を加えた状態で Sphere 形成を評価したところ、形成能は上昇し、さらに抗 HGF 抗体 (mAb) を加えると形成能が落ちることがわかった (図 5)。c-MET mRNA をノックダウンすると、ALDH1 high 細胞の出現割合には影響しなかったが、その増殖と in vitro sphere 形成は抑制された。また、in vivo における腫瘍増殖能も抑制された。前立腺のがん幹細胞および筋線維芽細胞から分泌される HGF は、autocrine および paracrine によりがん幹細胞の維持に関与していると考えられた。

図 4

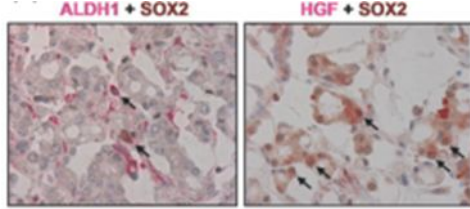


図 5



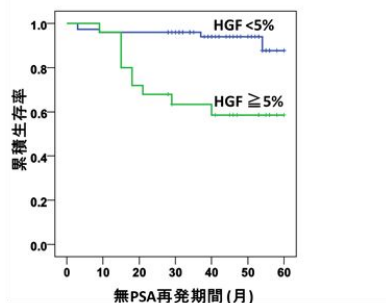
(4) 前立腺癌患者 7 人の手術標本から 5mm 角の癌の部位を切除し、ALDH1 活性分析を行った。患者検体の取り扱いおよび承諾については、札幌医科大学臨床研究審査委員会の承認を得た (22-43)。その結果 7-20% に上皮特異的マーカー陽性かつ ALDH1 陽性細胞が存在していた。さらに前立腺癌の摘出標本に対し癌幹細胞マーカーの SOX2 と HGF とでの二重免疫染色を行ったところ、矢印のごとく両者に染色される細胞が存在した。(図 6)

図 6



(5)101 例中 HGF 陽性細胞が存在したのは 45 例であり、45 例の HGF 陽性頻度は中央値 5%であった。また 101 例中 2 年以内に PSA 再発を来したものは 11 例であった。HGF 陽性率の 5%以上、5%未満で二群に分けて解析したところ、5%以上の群で有意に PSA 再発までの期間が短いことがわかった。(図 7)多変量解析の結果、術前 PSA と HGF が PSA 再発に関わる独立した予後因子であった。

図 7



本研究より、前立腺癌に存在しているがん幹細胞を回収・解析することが可能であることを証明した。またその結果、がん幹細胞に特徴的な成長因子である HGF の同定に至った。HGF を高発現している患者では術後の PSA 再発の頻度が高い可能性があり、こうした症例を適切に見つけ早期に治療することが術後再発予防に重要ではないかと考えている。HGF の作用を抑制することで再発が抑えられるか、今後も検討を継続したいと考えている。結果としてがん幹細胞に特異的な細胞表面マーカーは本研究では同定できず、免疫からの治療アプローチには至らなかったが、臨床的に重要な再発予防へのアプローチが一步進んだと言えよう。

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 3 件)

Sachiyo Nishida, Hiroshi Kitamura, Naoya Masumori, 他 7 名, Expression of hepatocyte growth factor in prostate cancer may indicate a biochemical recurrence after radical prostatectomy, Anticancer Research. 査読あり, Vol.35, No.1, 2015, pp413-418.

<http://ar.iijournals.org/content/35/1/413.1>

[ong](#)

Sachiyo Nishida, Hiroshi Kitamura, Naoya Masumori, 他 8 名, Prostate cancer stem-like cells/cancer-initiating cells have an autocrine system of hepatocyte growth factor. Cancer Science, 査読あり, Vol 104, No. 4, 2013, pp431-436
doi: 10.1111/cas.12104

Sachiyo Nishida, Hiroshi Kitamura, Naoya Masumori, 他 4 名, Gene Expression Profiles of Prostate Cancer Stem Cells Isolated by Aldehyde Dehydrogenase Activity Assay, Journal of Urology, 査読あり, Vol.188, No.1, 2012, pp294-299
doi: 10.1016/j.juro.2012.02.2555

〔学会発表〕(計 7 件)

Nishida S, Hirohashi Y, Torigoe T, Nojima M, Inoue R, Kitamura H, Tanaka T, Sato N, Masumori N: Expression hepatocyte growth factor in prostate cancer may indicate a biochemical recurrence after radical prostatectomy. 30th annual congress of European Association of Urology 2015.3.20 スペイン マドリッド

西田幸代, 廣橋良彦, 鳥越俊彦, 野島正寛, 北村 寛, 佐藤昇志, 舛森直哉: 前立腺癌の hepatocyte growth factor 発現は前立腺全摘後 PSA 再発の予測因子となりうる. 第 29 回前立腺シンポジウム 2013.12.14 東京コンファレンスセンター (東京都)

西田幸代, 鳥越俊彦, 廣橋良彦, 井上隆太, 田中俊明, 北村 寛, 高橋あかり, 舛森直哉, 塚本泰司, 佐藤昇志: 前立腺がん幹細胞における hepatocyte-growth factor (HGF) の自己分泌機構. 第 102 回日本病理学会総会 2013.6.6 ロイトン札幌 (札幌市)

Nishida S, Hirohashi Y, Torigoe T, Tanaka T, Kitamura H, Inoue R, Masumori N, Sato N, Tsukamoto T: Prostate cancer stem-like cells/cancer initiating cells have an autocrine system of Hepatocyte Growth Factor. American Urological Association Annual Meeting 2013.5.4 アメリカ サンディエゴ

西田幸代【特別講演】: ALDH1 活性で分離

した前立腺癌幹細胞の特徴と成長因子の自己分析機構. 第 387 回日本泌尿器科学会 北海道地方会 2012.10.13 札幌医科大学記念ホール (札幌市)

西田幸代、廣橋良彦、鳥越俊彦、田中俊明、北村 寛、高橋あかり、舛森直哉、塚本泰司、佐藤昇志 : Prostate cancer stem-like cells/cancer initiating cells have an autocrine system of Hepatocyte Growth Factor. 第 71 回日本癌学会総会 2012.9.19 ロイトン札幌 (札幌市)

西田幸代、鳥越俊彦、廣橋良彦、北村 寛、舛森直哉、佐藤昇志、塚本泰司 : ALDH1 活性分析により分離された前立腺癌幹細胞集団の特徴とその遺伝子発現. 第 100 回日本泌尿器科学会総会 2012.4.21 パシフィコ横浜 (横浜市)

〔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 :
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

舛森 直哉 (MASUMORI, Naoya)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 20295356

(2)研究分担者

北村 寛 (KITAMURA, Hiroshi)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 00404674

西田 幸代(NISHIDA, Sachiyo)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号 : 10509566

(3)連携研究者

()

研究者番号 :