

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890115

研究課題名(和文) 前立腺癌浸潤・転移における骨髄由来細胞の役割の検討

研究課題名(英文) Myelo-derived cells in the invasion and metastasis of prostate cancer

研究代表者

藤田 和利 (Fujita, Kazutoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50636181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：Cre-loxPシステムを用いて、PTENを前立腺特異的にノックアウトしたマウス(PTEN^{-/-}マウス)とPTENとTP53を前立腺特異的にノックアウトしたマウス(Pten^{-/-}TP53^{-/-}マウス)の2系統のマウスを作成した。現在マウスにGFPマウス由来の骨髄移植を行う予定をしている。骨髄移植の系を立ち上げるために、ラットにGFPラット由来の骨髄を移植し、キメララットを作成した。この前立腺に炎症または精巣摘除を行うことにより前立腺を破壊し、骨髄由来細胞がどのようにふるまうかを組織学的に検討、前立腺の破壊に伴い骨髄由来細胞が前立腺腺管および間質に遊走してくることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Using Cre-loxP systems, we created prostate-specific PTEN knockout mice and prostate-specific PTEN/TP53 mice. We are doing the transplantation of bone marrow from GFP-mice. To establish the bone marrow transplantation in mice, we first create the chimera rats which have the transplantation of bone marrow cells derived from GFP rat. After the injury to the prostate by the inflammation or the castration, the prostate of chimera rats were analyzed histologically. We confirmed the myelo-derived stromal cells were infiltrated into the prostate epithelial layers and stroma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 PTEN

1. 研究開始当初の背景

日本において年間4万2千人が前立腺癌に罹患しており、早期発見例が増えつつある一方、一部の患者では治療にも関わらず前立腺癌は進行し、年間1万人が死亡している。進行、転移のメカニズムは徐々に明らかになりつつあるが、未だ臨床で使用できる有効な治療法は少ない。そのため、前立腺癌の進行、転移のメカニズムを新たな視点から解明することが重要となっている。我々はこれまで前立腺癌の発生モデルとして GFP ラット由来の骨髄細胞を移植した GFP キメララットを作成し、炎症に伴う前立腺上皮の破壊再生に骨髄細胞の影響を調べてきた。その結果、GFP 細胞陽性の骨髄由来細胞が炎症による破壊、再生後に前立腺上皮内に存在することが明らかとなった。

Veronica らは、同様に GFP キメラマウスを作成し、精巣摘除およびテストステロン補充による上皮の退縮、再生モデルを用いて、前立腺内の骨髄由来細胞の検討をした¹⁾。マウスでも我々の結果と同様に骨髄由来細胞が再生後の前立腺上皮内に存在し、その GFP 細胞は骨髄由来間葉系幹細胞 (BMDC) であると報告されている。皮膚の創傷治癒や臓器の阻血再還流障害では BMDC が障害部位に遊走し、組織修復に重要な役割を果たしていることがこれまでに報告されている²⁾。前立腺癌の発生にも炎症および組織の修復が重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある³⁾。炎症、組織修復の環境と癌の浸潤の環境は共通する点が多く、浸潤性前立腺癌においても、骨髄由来細胞が何らかの役割をはたしていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、まず①浸潤性前立腺癌モデルであるノックアウトマウスを作成し、

浸潤性前立腺癌における BMDC の役割を解明すること、さらに②増殖、浸潤、転移を促進する BMDC からのシグナルを同定し、それを抑制することにより進行性前立腺癌の治療に結びつけることにある

3. 研究の方法

(1) 浸潤性前立腺癌マウスモデルの作成
Pten と Trp53 遺伝子を両方同時にノックアウトしたマウスは生後 30 週齢で前立腺癌が進行し死亡することが報告されている¹⁾。Cre-loxP システムを用いて、Pten と Trp53 を前立腺特異的にノックアウトしたマウス (Pten^{-/-}Trp53^{-/-}マウス) を作成する。具体的には日本チャールス・リバー株式会社を通して Jackson Laboratory 社より Pten と Trp53 の配列に LoxP を配した B6.129S4-Pten^{tm1Hwu}/J マウスと B6.129P2-Trp53^{tmBrn}/J マウスを購入する。前立腺上皮に特異的に発現する Probasin プロモーターを Cre レコンビナーゼを Probasin-Cre4 トランスジェニックマウスを作成し、交配することにより前立腺特異的に Cre レコンビナーゼが発現し、前立腺上皮のみで Pten と Trp53 がノックアウトされるダブルノックアウトマウスを作成する。ダブルノックアウトマウス作成が困難であった場合、前立腺特異的に Pten をノックアウトしたマウスでも前立腺癌が発生するため、Pten ノックアウトマウスを以降の実験で代用する。

(2) 4-6 週齢 Pten^{-/-}Trp53^{-/-}マウスに 950rad 全身放射線照射し、内在性の骨髄を破壊する。その後 GFP マウスの骨髄細胞 1X10⁷/500 μl を尾静脈より注射し、骨髄移植を行い。1カ月後に末梢血の白血球細胞を蛍光顕微鏡で観察し、GFP 陽性骨髄細胞が生着したかを確認する。

(3) マウス前立腺癌組織の解析
骨髄移植後の 20 週齢のマウスの前立腺癌

組織を摘除し、パンサイトケラチン抗体で免疫染色する。蛍光顕微鏡で GFP 細胞の局在を調べ、更に間葉系マーカー (CD29,CD90)、pancytokeratin と 2 重免疫染色を行い骨髄由来 GFP 陽性細胞の局在や形態学的特徴を調べる。

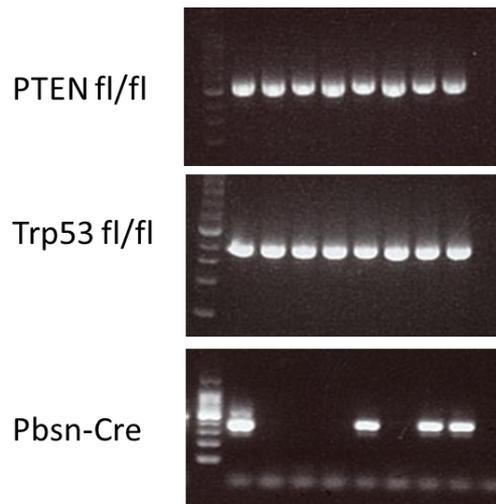
(4) GFP 陽性細胞が、骨髄由来間葉系細胞であると確認できれば、前立腺癌組織を酵素処理し、単細胞浮遊液にし、CD29 陽性、GFP 陽性および CD45 陰性の分画をセルソーターにて単離する。単離した細胞のサイトカインの発現を cDNA マイクロアレイおよびサイトカインアレイで調べ、腫瘍の増殖浸潤に関わる物質の特定を試みる。

骨髄由来 GFP 陽性細胞が間葉系幹細胞で無かった場合には、骨髄由来 GFP 陽性細胞の特定 (免疫担当細胞、血管内皮細胞など) を行い、癌組織における役割を明らかにする。

4. 研究成果

B6.129S4-Pten^{tm1Hwu}/J マウス、
B6.129P2-Trp53^{tmBrn}/J マウス、
Probasin-Cre4 トランスジェニックマウスをそれぞれ導入した。まず今回導入時にマウスの感染症チェックで感染を認めたため、一旦 wild type のマウス卵子と、導入した 3 種類のトランスジェニックマウスを体外受精し、SPF マウスに受精卵を移植した上で、SPF 化した 3 種類のトランスジェニックマウスを得た。それぞれのマウスを交配した上で、Pten^{fl/fl} と Pbasin-Cre^{+/-} のダブルトランスジェニックマウスおよび Pten^{fl/fl}, Trp53^{fl/fl} と Pbasin-Cre^{+/-} のトリプルトランスジェニックマウスを最終的に得た。トリプルトランスジェニックマウスの Genotype の結果を図 1 に示す。

図 1



現在前立腺癌マウスモデルが作成できたところであり、放射線照射を行い骨髄を破壊した後に、前立腺癌を発生しない GFP マウス由来の骨髄移植を行っている。今回、導入したマウスを SPF 化するのに時間を要したため、ラットに GFP ラット由来の骨髄を移植し、キメララットを作成した。この前立腺に炎症または精巣摘除を行うことにより前立腺を破壊し、骨髄由来細胞がどのようにふるまうかを組織学的、およびフローサイトメトリーを用いて検討した。前立腺の破壊に伴い骨髄由来細胞が前立腺腺管および間質に遊走してくることを確認し、長期に存在することを確認した (図 2)。またこれらの細胞のマーカーを確認すると上皮系のマーカーの発現を認め、間葉-上皮転換を起こしている可能性が示唆された (図 3)。これにより前立腺癌においても同様の現象が起きている可能性があり、作成した前立腺癌モデルマウスで確認している。

図 2

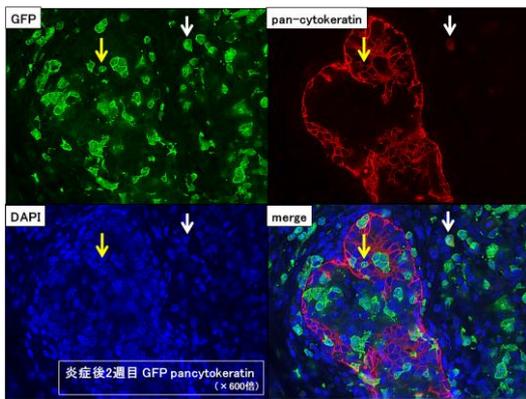
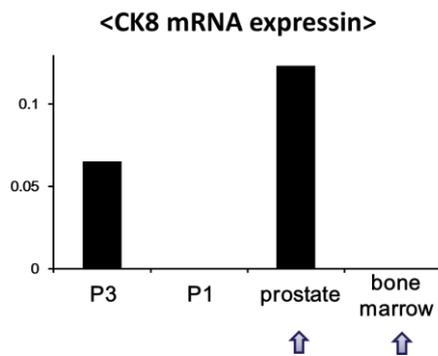
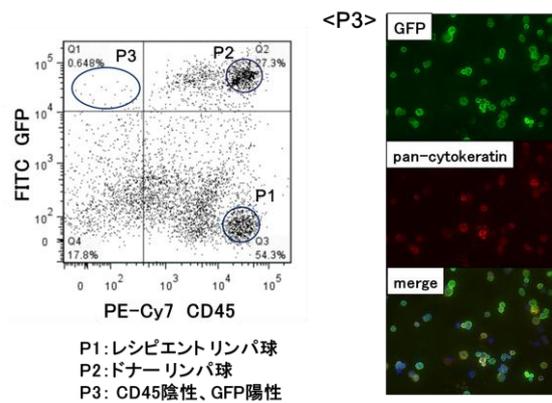


図 3



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 2件)

1. 63回 日本泌尿器科学会中部総会
「前立腺再生における骨髄由来細胞の役割」
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、2014/3/15 山形

2. 第23回 泌尿器分子・細胞研究会
「前立腺再生における骨髄由来細胞の役割」
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、

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 和利 (FUJITA Kazutoshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50636181