

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462412

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌における上皮間葉転換の制御機構の解明と標的治療への応用

研究課題名(英文) Molecular mechanism of epithelial-mesenchymal transition in castration resistant prostate cancer.

研究代表者

村蒔 基次 (Muramaki, Mototsugu)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10448178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は前立腺癌における上皮間葉移行の意義を検討し、その制御機構ならびに去勢抵抗性前立腺癌の標的治療の可能性について検討することである。去勢抵抗性前立腺癌の臨床組織検体に免疫組織染色を施したところN-cadherinの発現が有意に亢進していた。N-cadherin発現ベクターを培養細胞株に導入した。N-cadherin高発現株は親株に比べ、有意に増殖能が高く、また強い浸潤能を獲得していた。またドセタキセルに対する抗癌剤耐性を示した。同時にストレス蛋白の一種であるクラスタリンの高発現を認めた。クラスタリンに対するアンチセンスオリゴによる治療を行ない、抗癌剤体制獲得を阻害することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The Objective of this study was to investigate the significance of epithelial-mesenchymal transition in castration resistant prostate cancer. A study of immunohistochemical staining using clinical tissue samples revealed that N-cadherin was overexpressed in prostate cancer. N-cadherin overexpressed cells showed aggressive features in vitro. N-cadherin overexpressed cells acquired resistance against docetaxel. The acquired resistance was reversed by in vitro treatment using antisense oligonucleotide against clusterin, one of the stress-induced protein related with anti-apoptotic cell survival in many kinds of cancer cells.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 去勢抵抗性前立腺癌 上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌患者の多くは taxane 系抗癌剤による治療にもかかわらず転移・浸潤のために死に至るのが現状である。従って、前立腺癌の転移・浸潤の詳細な分子機構を解明する研究は、転移・浸潤を制御する治療薬の創薬に発展する可能性を有しており、現在多くの研究が進行中である。

上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) は 1980 年代にその概念が提唱されて以来、発生、創傷治癒、繊維化の過程で起こる現象として広く認められている。EMT の組織細胞学的定義は、(1) 細胞形態 (morphology) の変化、(2) E-cadherin などの上皮系タンパクの発現低下、Vimentin, N-cadherin, fibronectin などの間葉系タンパクの発現亢進、(3) 運動能 (motility) の獲得または亢進が挙げられる。近年、癌細胞にも高頻度に EMT が起こることが証明されている。さらにそれら EMT を起こした癌細胞において遊走能と浸潤能亢進することが示されており、EMT は癌の進展に非常に重要な役割を担っていると考えられている。E-cadherin は上皮細胞の代表的な接着分子であり、細胞間接着に寄与しており、前立腺癌を含む数多くの癌の悪性度とその発現が逆相関することが知られている (Mialhe A, et al, Invasion Metastasis, 1997)。

当教室でも従来から泌尿器癌における E-cadherin の発現と癌の悪性度および臨床経過との相関関係を研究してきた (Fujisawa M, et al, World J Urol, 1996)。しかしながら、おそらく E-cadherin タンパクの発現減少または機能低下は癌の悪性進展の比較的早期におこるため、既知の予後因子と比較して、より強力な予後予測因子となりにくいことは前立腺癌を含む種々の癌において明らかになりつつある。Cadherin は膜 1 回貫通型の糖タンパクであり、E-cadherin を含む数種のファミリーが存在することが知られている。N-cadherin は間葉系細胞に主に発現することから、EMT マーカーの一つとされる。N-cadherin は近年、膀胱癌を含む数種の固形癌で発現が亢進していることが示された (Rieger-Christ KM, et al, Oncogene, 2004)。我々の組織学的検討においても、筋層非浸潤性膀胱癌において N-cadherin の発現亢進症例において有意に高頻度に術後膀胱内再発が高く、独立した予後因子であること (Muramaki M, et al, Urol Oncol, 2010)、腎盂尿管癌において術後膀胱内および膀胱外再発のいずれについても N-cadherin 発現亢進は独立した予後因子であること (Muramaki M, et al; Urology, 2011) を確認している。さらに腎細胞癌において N-cadherin 発現亢進は早期例および進行例いずれにおいても術後再発または進行と相関し、多変量解析において病理学的

T 分類と遠隔転移の有無とともに独立した予後予測因子であることも確認している (投稿中)。しかしながら、限局性前立腺癌に対し根治的に全摘除術が施行された 200 例に対する同様の免疫組織学的検討においては、E-cadherin は独立した予後予測因子であったが、N-cadherin は予後予測因子とは認められなかった (投稿準備中)。以上の所見より、前立腺癌においても EMT が癌の進展に重要な役割を持つことが予測されるものの、限局性前立腺癌を対象とした研究モデルでは得られる知見に限界があると考察し、去勢抵抗性前立腺癌モデルにおいて EMT の果たす役割を検討することは極めて意義深いと確信し、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の期間内に前立腺癌における EMT の制御機構を明らかにする。特に前立腺遠隔転移モデルにおける前立腺癌細胞の EMT および MET ステータスを N-cadherin を中心に解析し明らかにする。さらに去勢抵抗性前立腺癌に対する標的分子としての可能性を明らかにする事である。

3. 研究の方法

去勢前立腺癌臨床検体を用いた免疫組織学的検討：通常前立腺癌に対する治療前には生検が実施されるが、局所治療または全身治療後に去勢抵抗性前立腺癌に至った症例に対し、前立腺または転移巣の病理学的評価を行うことは希である。当院では去勢抵抗性前立腺癌症例の内、臨床経過上必要と思われた症例に限り前立腺生検を 20 例程度に実施した経験がある。その内、本研究への使用を同意された症例について、パラフィン包埋された永久標本を用いて、EMT 関連マーカーである、ZEB1, ZEB2, slug, SNAIL1, SNAIL2, TWIST, E-cadherin, N-cadherin, β -catenin, fibronectin, MMP-2 および MMP-9 についての免疫組織染色を行う。Historical control の生検標本と発現レベルの比較を行い、CRPC に特徴的に発現が亢進する EMT 関連蛋白の同定を試みる。

N-cadherin 過剰発現株を用いた in vitro 実験：N-cadherin 強発現前立腺癌細胞株を同定し、N-cadherin 全長を増幅する PCR プライマーを用いて N-cadherin CDS をクローニングする。この PCR 産物を pcDNA3.1 発現ベクターに導入し、N-cadherin 発現ベクターを作成する。E-cadherin 発現陰性かつ N-cadherin 発現陰性の前立腺癌細胞株に N-cadherin 発現ベクターを導入する。G418 によるクローン選択を行い、N-cadherin 安定

過剰発現株を作成する。N-cadherin 過剰発現株と母細胞を比較した *in vitro* 実験を行う。検討項目としては、肉眼的形態の変化の有無に加え、Boyden チャンバーを用いた遊走能の比較、Wound healing アッセイを用いた移動能の比較、さらに matrigel をコーティングした Boyden チャンバーを用いた浸潤能の比較を行う。並行して母細胞と過剰発現細胞株のドセタキセルに対する感受性を cell survival assay にて評価する。N-cadherin 過剰発現によりドセタキセルに対する感受性は変化が認められない結果も想定されるが、*in vitro* 実験にて細胞の浸潤および遊走能が亢進していれば、*in vivo* 実験でドセタキセルと N-cadherin 発現抑制の併用療法により相加的な治療効果を期待して実験を進める。

また、前立腺癌細胞における TGF- β による EMT 誘導の有無を確認するために、細胞培養液に TGF- β を添加し、EMT が誘導されるか検討する。その際に E-cadherin および N-cadherin の発現の程度によって EMT の程度が異なるかを検討する。TGF- β による腫瘍細胞の増殖制御は複雑で、促進的あるいは抑制的に働く可能性がある。E- および N-cadherin 発現の変化が TGF- β による増殖制御に関連するか否かを、*in vitro* 細胞増殖アッセイにて検討する。

N-cadherin を標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドによる治療実験：N-cadherin の発現を高効率に阻害できる試薬があれば、EMT を抑制することにより転移・浸潤が抑制され、ドセタキセルによる治療効果を相加的に増強できると考えられる。現在 N-cadherin 発現を抑制する小分子化合物は開発されておらず、現時点では *in vivo* 投与も可能な N-cadherin に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの開発が適当である。本研究の主研究者はアンチセンスオリゴヌクレオチドの開発および治療実験に精通しており、実験遂行に至適な研究者であると考えられる。我々は N-cadherin の CDS 解析からアンチセンスオリゴのヌクレオチドの候補配列を数種同定している（非公開）。平成 28 年度実験計画としては、まず *in vitro* での実証実験を予定する。すなわち、N-cadherin アンチセンスオリゴ単剤およびドセタキセルとの併用実験を行い、相加的な抗腫瘍効果増強の有無を確認する。同時に浸潤能および遊走能の変化の変化をチェックする。

4．研究成果

限局性前立腺癌に対して根治目的に全摘除術を施行した 200 例について免疫組織学的染色を施行したところ E-Cadherin は独立した予後予測因子と認められた。しかし

N-Cadherin は予後予測因子とは認められなかった。当院で採取された去勢抵抗性前立腺癌組織 20 例に対して同様の免疫組織学染色を施行したところ N-cadherin は独立した予後予測因子であった。このことから N-cadherin は去勢抵抗性前立腺癌への進展に重要な役割を持つことが示唆された。

当科で樹立した N-cadherin 過剰発現前立腺癌細胞株を用いて *in vitro* 実験を行なった。N-cadherin 過剰発現前立腺癌細胞株は親株に比べ、有意に増殖能が高く、また浸潤能の亢進が認められた。N-cadherin 過剰発現前立腺癌細胞株はドセタキセルおよびカバジタキセルへの抵抗性を示した。このことから前立腺癌は去勢抵抗性前立腺癌への進展の過程で N-cadherin を高発現し、結果として EMT 能の獲得から患者に予後不良の経過をもたらすことが示唆された。

N-cadherin 過剰発現前立腺癌細胞株の抗癌剤抵抗性を検証する過程で、ストレス蛋白の一種であるクラスタリンが過剰に発現していることが認められた。クラスタリンをターゲットとしたアンチセンスオリゴによる治療にて抗癌剤耐性が克服できる可能性を考えた。N-cadherin 過剰発現前立腺癌細胞株をクラスタリンをターゲットとしたアンチセンスオリゴで治療を行ない、抗癌剤感受性を調べたところ有意に IC50 が低下していることを確認した。

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 1 件)

Muramaki M, et al. Antisense Oligonucleotide therapy for patients with castration-resistant prostate cancer. Nihon Rinsho. 20: 234-7, 2016.

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

村蒔 基次 (Muramaki, Mototsugu)
神戸大学大学院 医学研究科 泌尿器科
学分野 講師
研究者番号：10448178

(2) 研究分担者

三宅 秀明 (Miyake, Hideaki)
浜松医科大学・医学部 泌尿器科学 教授
研究者番号：60379435

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()