

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860244

研究課題名(和文) Rho活性化を介した上皮間葉転換による癌の治療抵抗性獲得の機序

研究課題名(英文) Mechanisms of cancer therapeutic resistance via Rho-mediated epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

河田 浩敏 (Kawata, Hirotoshi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70406099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌や乳癌において、性ホルモン不応性の癌の再発が問題となっている。今回の研究で、内分泌治療の前立腺癌のみならず化学療法後の乳癌においても、Rho活性化を介した上皮間葉転換(EMT)様変化が見られることを確認した。一方で、性ホルモン除去下の前立腺癌細胞には細胞老化や抗酸化反応が誘導されていること、細胞老化は抗酸化剤やTGF- β シグナルにより抑制されることを見出した。治療後に生存する前立腺癌や乳癌細胞は、細胞老化の誘導とそれに伴う特異な分泌形質を示し、抗酸化反応などで細胞老化を回避する過程でRho活性化を介したEMT様変化を来して治療抵抗性を示していると推測される。

研究成果の概要(英文)：Recurrence of hormone-unresponsive cancer is a serious problem in prostate and breast cancer. In this study, we demonstrate that Rho-mediated epithelial-mesenchymal transition (EMT) is stimulated not only in endocrine therapy resistance of prostate cancer, but also in chemotherapy resistance of breast cancer. We also demonstrate that, in hormone-responsive cancer cells, cellular senescence and anti-oxidant response are stimulated by hormone ablation. Senescent phenotypes are reduced by treatment of either anti-oxidant reagent of N-Acetyl-L-cysteine or TGF- β . These results suggest that survived cancer cells may utilize various tools such as EMT, cellular senescence, senescence-associated secretory phenotype, and anti-oxidant response, resulting in therapy resistance.

研究分野：実験病理学

キーワード：前立腺癌 乳癌 治療抵抗性 上皮間葉転換 細胞老化 抗酸化反応

1. 研究開始当初の背景

本邦において前立腺癌や乳癌は年々増加傾向にあり、最新の統計解析では2020年には肺癌、胃癌に次いで前立腺癌が男性癌の3番目の罹患率に、乳癌は胃癌や大腸癌を超えて女性癌の1番の罹患率になると推計されている⁽¹⁾。前立腺癌や乳癌は性ホルモン反応性を示し、内分泌治療が有用な治療法として確立している。しかし、内分泌治療後に発生する性ホルモン不応性癌は、様々な治療に抵抗性を示し、治療成績の改善を阻んでいる。この内分泌治療抵抗性獲得の機序については、性ホルモンレセプターを中心として様々な研究が行われてきたが、未だに明確なことは分かっていない。

低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリー (Rho-GTPase) は細胞骨格の制御に関与しており、特に細胞遊走において Rho, Rac, cdc42 の三つのサブファミリーについての解析が進んでいる。一方、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) は初期胚発生や器官形成に際して見られる現象で、上皮細胞が間葉系細胞に形質転換することにより、細胞遊走能が増強して形態形成を生じるものである。Rho-GTPase は EMT に密接に関与しており、癌においてはこれまで浸潤や転移との関連性が主に言われてきた。

我々は、性ホルモン反応性および不応性のマウス乳癌細胞の比較解析やヒト前立腺癌を用いた免疫組織化学的検討から、性ホルモン除去下の性ホルモン反応性癌細胞には Rho 活性化を介した EMT 様変化が生じており、それにより癌細胞生存を図っている可能性があることを示した⁽²⁾。近年、EMT と癌の治療抵抗性との関連性については徐々に注目されつつある。しかし、その機序についてはまだ多くが未解明である。癌治療においては、治療後に起こる治療抵抗性癌の再発が予後に大きく影響する。EMT による治療抵抗性獲得の機序の解明により、治療後の癌細胞生存や治療抵抗性の再発癌の発生を抑えるような新たな治療戦略の開発へと繋がる事が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、前立腺癌や乳癌などの性ホルモン反応性癌における治療抵抗性と Rho 活性化を介した EMT 様変化との関係を明確にするとともに、それによる癌の治療抵抗性獲得の機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

臨床材料を用いた免疫組織化学的比較解析

自治医科大学倫理審査委員会の承認のもと、病理診断後に保管されているパラフィン包埋ブロックを用いて免疫組織化学的検討を実施した。内分泌治療後に摘出された前立腺癌症例 30 例と未治療で摘出された前立腺癌症例 30 例とで、遺伝子発現の差異を免疫

組織化学的に比較検討した。また、化学療法後に手術が行われた乳癌症例 50 例において、治療前の生検検体と治療後の手術検体とを同一症例における治療前後の遺伝子発現変化を免疫組織化学的に比較検討した。

培養細胞株を用いた in vitro の解析

性ホルモン反応性癌細胞株 (マウス乳癌細胞株 SC-3, ヒト乳癌細胞株 MCF7, ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP 等) および性ホルモン不応性癌細胞株 (マウス乳癌細胞株 SC-4, ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 等) を用いて、性ホルモン除去あるいは抗癌剤投与など様々な条件下における各種の遺伝子発現変化 (ウエスタンブロット, RT-PCR) や Rho 活性の変化 (Rho activation assay) を比較検討した。また、EMT 様変化の評価として、E-cadherin の発現低下や Actin stress fiber (ASF) 形成の増強について蛍光抗体法にて評価した。さらに、同様に種々の条件下における細胞老化について SA- β -Gal assay を、アポトーシスについて TUNEL assay を行い比較検討した。

去勢マウスモデルを用いた in vivo の解析

自治医科大学動物実験委員会の承認のもと、10 週齢の ICR マウスを用いて、性ホルモン除去下での各臓器における細胞老化 (SA- β -Gal assay) やアポトーシス (TUNEL assay)、細胞老化関連分子 (ウエスタンブロット) について、性腺摘出群とコントロール群とで比較検討した。

4. 研究成果

内分泌治療 (性ホルモン除去) に限らず抗癌剤投与下の乳癌細胞においても EMT 様変化が見られる

化学療法が実施された乳癌症例において、同一症例の治療前の生検検体と治療後の手術検体とで免疫染色による比較解析を行った結果、化学療法後に生存する癌細胞には E-cadherin の発現が減弱するとともに RhoC や fibronectin の発現増強が認められ、EMT 様変化を来していることが示唆された。MCF7 細胞を用いた検討でも、性ホルモン除去や抗癌剤 (VP-16) 投与により、RhoC 活性の増強や EMT 様変化 (E-cadherin の発現減弱, ASF 形成増強) が確認された。しかし、乳癌症例による免疫組織化学的検討では、SNAI1,2 や TWIST1 などの EMT 関連マーカーはむしろ減弱傾向を示した。また、活性型 RhoC を導入した MCF7 細胞では、性ホルモン除去時の VP16 投与による細胞死が抑えられる傾向が見られたものの、EMT 関連マーカーの発現変化は明らかではなかった。

これらのことから、内分泌治療のみならず化学療法に際しても、治療抵抗性を示し生存する癌細胞に EMT 様変化が見られるが、この変化は発生の段階で見られる EMT とは異なる経路が想定されるものであった。

性ホルモン反応性細胞には性ホルモン除去により細胞老化や抗酸化反応が誘導されている

これまで性ホルモン反応性癌細胞において性ホルモン除去によりアポトーシスが誘導されるとされていた。しかし、性ホルモン反応性癌細胞である SC-3 細胞や LNCaP 細胞の検討から、性ホルモン除去により細胞老化が誘導されることを確認した。それに対して、TUNEL assay 等でアポトーシスの誘導は見られなかった。また、細胞老化が誘導された細胞は特異的な分泌形質 (senescence associated secretory phenotype ; SASP) を来すことが知られている。性ホルモン除去下の SC-3 細胞や MCF7 細胞において、SASP マーカーである IL-6 や MMP9 等の発現を RT-PCR で確認した。さらに、内分泌治療後の前立腺癌症例を用いた免疫組織化学的検討でも、治療後に生存した癌細胞やその周囲の間質細胞において IL-6 等の発現増強が見られることを確認した。一方、去勢マウスモデルを用いた性ホルモン反応性臓器における細胞老化の検討では、去勢後一週間の前立腺や乳腺において、SA-β-Gal 活性の増強が認められた。ウエスタンブロットにて細胞老化の関連分子である p27, p53 の発現増強を確認した。性ホルモン反応性細胞には性ホルモン除去により細胞老化が誘導されることが示唆された。

加えて、SC-3 細胞や LNCaP 細胞、MCF7 細胞のいずれにおいても、性ホルモン除去による細胞老化の誘導が、抗酸化剤である N-Acetyl-L-cysteine (NAC) 投与によりある程度抑制できることを見出した。去勢マウスモデルの前立腺においても NQO1 といった抗酸化反応関連分子の発現が増強していることをウエスタンブロットで確認した。さらに、前立腺癌症例を用いた免疫組織化学的検討においても、NRF2 や NQO1 等の抗酸化反応関連分子の発現が、内分泌治療群に有意に高いことが確認された。

これらのことから、性ホルモン反応性細胞には、性ホルモン除去により細胞老化や抗酸化反応が誘導されることが確認された。また、内分泌治療後に生存する癌細胞においても同様に、細胞老化および抗酸化反応が誘導されていること、抗酸化反応は細胞老化を抑制する働きがあることが示唆された。

性ホルモン除去による細胞老化は TGF シグナルにより回避される

性ホルモン反応性の SC-3 細胞や LNCaP 細胞における性ホルモン除去による細胞老化は、TGF を添加することにより SA-β-Gal 活性が有意に低下し、TGF シグナルにより細胞老化が回避されうることを見出した。逆に、性ホルモン不応性の SC-4 細胞や PC-3 細胞では、TGF 阻害剤 (SB431592) の添加により SA-β-Gal 活性が有意に増強し、TGF シグナルの抑制により性ホルモン不能性癌細胞に細胞老化が誘導されることが確認され

た。それと同時に、SC-4 細胞や PC-3 細胞において SB431592 添加により Hippo 経路の重要分子である YAP/TAZ の発現や核内移行の低下、Rho 活性の減弱を来すことを見出した。また、前立腺癌症例を用いた免疫組織化学的検討でも、内分泌治療後に生存した癌細胞において、Activin A・B、YAP/TAZ、Smad4 の発現が、未治療群と比較して有意に増強していることを確認した。

これらのことから、性ホルモン除去や抗がん剤投与に際して性ホルモン反応性癌細胞に誘導される細胞老化の回避および Rho を介した EMT 様変化には、TGF シグナルが重要な役割を担っており、それに YAP/TAZ が関与している可能性が示唆された。

以上より、性ホルモン反応性癌細胞において、内分泌治療 (性ホルモン除去) や化学療法 (抗がん剤投与) に抵抗して生存する癌細胞には、細胞老化が誘導され癌細胞あるいは周囲の間質細胞も含めた分泌形質 (SASP) から IL-6 等の分泌が促進していること、抗酸化反応や TGF シグナルが増強されることで細胞老化が回避されること、それに伴って Rho 活性化を介した EMT 様変化を来していることが推測された。

< 引用文献 >

- (1) Utada M, Ohno Y, Soda M, Kamo K. Estimation of cancer incidence in Japan with an age-period-cohort model. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2010;11(5):1235-40.
- (2) Kawata H, Shimada N, Kamiakito T, Komatsu K, Morita T, Ota T, Obayashi M, Shitara K, Tanaka A. RhoC and guanine nucleotide exchange factor Net1 in androgen-unresponsive mouse mammary carcinoma SC-4 cells and human prostate cancer after short-term endocrine therapy. *Prostate.* 2012 Jul 1;72(10):1071-9.

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 2 件)

- Kawata H, Kamiakito T, Nakaya T, Komatsubara M, Komatsu K, Morita T, Nagao Y, Tanaka A. Stimulation of cellular senescent processes, including secretory phenotypes and anti-oxidant responses, after androgen deprivation therapy in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017 Jan;165:219-227. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.06.007.

Kawata H, Kamiakito T, Omoto Y, Miyazaki C, Hozumi Y, Tanaka A.
RhoC upregulation is correlated with reduced E-cadherin in human breast cancer specimens after chemotherapy and in human breast cancer MCF-7 cells.
Horm Cancer. 2014 Dec;5(6):414-23.
doi: 10.1007/s12672-014-0199-5.

[学会発表](計8件)

河田浩敏, 仲矢丈雄, 田中 亨
抗癌剤は様々な癌細胞にアポトーシスだけではなく細胞老化も誘導する
第106回日本病理学会総会(2017年4月27日~29日, 京王プラザホテル(東京都新宿区))

河田浩敏, 仲矢丈雄, 田中 亨
Escaping roles of TGF signals on cellular senescence induced by hormone ablation
第75回日本癌学会学術総会(2016年10月6日~8日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市))

河田浩敏, 仲矢丈雄, 田中 亨
TGF シグナルは性ホルモン除去による細胞老化を回避する
第105回日本病理学会総会(2016年5月12日~14日, 仙台国際センター(宮城県仙台市))

河田浩敏, 田中 亨
Anti-oxidant response is involved in premature cellular senescence after sex-hormone ablation
第74回日本癌学会学術総会(2015年10月8日~10日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市))

河田浩敏, 田中 亨
去勢マウスを用いた性ホルモン反応性臓器における細胞老化の誘導
第104回日本病理学会総会(2015年4月30日~5月2日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市))

河田浩敏, 田中 亨
Induction of premature cellular senescence and senescence-associated secretory phenotypes after hormone ablation in human prostate cancer, hormone-responsive cancer cells, and murine prostate and breast tissues
第97回米国内分泌会議(ENDO2015)(2015年3月5日~8日, San Diego Convention Center(San Diego, CA, US))

河田浩敏, 田中 亨

Induction of cellular senescence by hormone ablation in hormone-responsive cancer cells
第73回日本癌学会学術総会(2014年9月25日~24日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市))

河田浩敏, 田中 亨
性ホルモン反応性癌細胞における性ホルモン除去による細胞老化の誘導
第103回日本癌学会学術総会(2014年4月24日~26日, 広島国際会議場(広島県広島市))

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

[その他]
自治医科大学 病理学講座 人体病理学部門ホームページ
<http://www.jichi.ac.jp/usr/path/human/seika.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河田 浩敏 (KAWATA, Hirotoshi)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70406099