

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06289

研究課題名(和文) 前立腺癌間質不均一性に隠れた秩序の探索-間質をターゲットとする治療戦略の開発

研究課題名(英文) The exploration of the order in the heterogeneity of prostate cancer-associated stroma environment

研究代表者

加藤 学 (KATO, Manabu)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60626117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：異なる患者から得られた癌関連繊維芽細胞が異なる細胞表面蛋白を発現しているということStro-1、CD117、CD105のFACS抗体を用いた実験において検証することができた。前立腺癌上皮細胞の一つである22RV1と癌関連線維芽細胞を混合移植した腫瘍形成試験によって、CD105の中和抗体によってマウスを処理することで腫瘍の縮小が観察された。22RV1は抗アンドロゲン剤処理により去勢抵抗性前立腺癌の挙動を示し、さらにCD105抗体はこの腫瘍形成モデルも増大を抑制することが観察された。線維芽細胞の細胞表面マーカーを操作することで癌線維芽細胞をターゲットとした治療法の基礎的基盤になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that each cancer-associated fibroblasts (CAFs) from different patients expressed diverse cell surface markers such as Stro-1, CD117, CD105 in different ratio. In in vivo, tumor formation assay using one of prostate epithelial cell, 22RV1 mixed with CAFs showed that CD105 neutralizing reagent suppress this tumor growth dynamically. In addition, 22RV1 had property to change in castration-resistant prostate cancer treated with anti-androgen drug, and made tumor once they cultured in vivo with CAFs. CD105 neutralizing reagent could suppress these tumor also. It seemed that manipulating cell surface markers on CAFs or epithelial cells might be basic strategy to treat cancer associated fibroblast, in tumor microenvironment, thus could be treatment for prostate cancer.

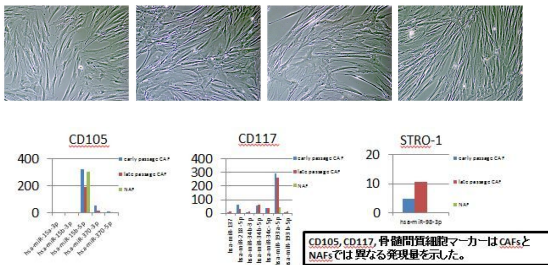
研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌関連線維芽細胞 不均一性 Heterogeneity 細胞表面マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

近年、前立腺癌の増加が医療社会的に注目されている。実際、将来の我が国における前立腺癌罹患数の増加に関しては、2020年には78,468人と肺癌に次いで男性癌の2番目になると予測されている。臨床においては、進行前立腺癌に対する治療の1つとしてアンドロゲン除去療法(去勢)が一般的に行われている。去勢療法開始後、一定期間は癌細胞の増殖が抑制され、PSA値の低下、症状の寛解を認めるが、長期間去勢療法を続けているといずれ去勢に抵抗性を示す去勢抵抗性前立腺癌となる。去勢抵抗性前立腺癌に対しては未だ有効な治療法が確立されておらず、予後が極めて悪いことが深刻な問題である。一般的に前立腺はアンドロゲンに依存して成長し、主に成熟した平滑筋細胞層に取り囲まれ、腺上皮細胞は、形態形成因子(morphogen)の支配下に分化・機能(PSA産生)が維持されている。しかし、癌周囲の間質では平滑筋細胞が退縮し、筋線維芽細胞や線維芽細胞が優位な状態になっており、両細胞は、増殖刺激に働く細胞増殖因子(EGF, FGFs, HGF, IGFs, NGF, TGF等)やサイトカイン(インターロイキンファミリー)を産生・分泌する。また、癌関連線維芽細胞においては特定の細胞表面マーカー(CD105, Endoglin等)が発現し、癌細胞との相互作用が調節されていることが示されている。

我々はこれら癌関連線維芽細胞からの増殖因子やサイトカインによる増殖刺激と、細胞表面マーカーによる癌細胞との相互作用の調節が合わさり、前立腺癌の去勢抵抗性獲得に関与していると考えている。これら細胞増殖因子やサイトカインの産生を抑制する、もしくは特定の細胞表面マーカーの発現を制御することが、前立腺癌の去勢抵抗性獲得を阻止し、しいては前立腺癌に対する新規治療法(分子標的剤)の開発につながると期待される。



## 2. 研究の目的

手術標本、生検標本であるヒト前立腺組織を初代培養し、得られたヒト前立腺線維芽細胞に関して、これらCAFとNAFに関してmicroRNA array解析を行い、2000以上のmicroRNAの中から特に血管内皮細胞、増殖因子、サイトカインレセプター、骨髄幹細胞に関する細胞表面マーカーに大きな発現差

が存在することを確認している。これらの内、増殖因子、サイトカインに関しては上皮と間質(線維芽細胞)の相互作用において、上皮の分化、増殖、癌化に関連し、そのメカニズムは完全には解明されていない。また、特に血管内皮細胞に関しては近年、血管内皮細胞間質細胞移行(Endothelial cells-Mesenchymal Transition; EMT)という新しい細胞微小環境における変化が提唱、証明されてきており、我々はこの現象がCAFとNAFの異なる生物学的機能を説明する上で重要であると考えている。マウス前立腺に腫瘍細胞と線維芽細胞を同所混合移植することにより、in vivoでの腫瘍形成試験、組織切片の作成、遺伝子の抽出、解析、薬剤の投与など詳細な生物学的検討を得意としていたため、これらの予備実験データ、研究代表者らの施設で施行可能な確立された実験手技に加えて、今回、特に線維芽細胞を特定の細胞表面マーカーを発現している細胞群をFACS装置を用いて振り分けること(sorting out)により、前立腺上皮細胞(癌細胞)と特定の生物学的特徴を持った線維芽細胞を混合移植するというdynamicでspecificな解析を可能とする実験方法を着想するに至った。

本研究課題では、前立腺癌の去勢抵抗性獲得を促進する特定の線維芽細胞の細胞群の同定、それらの細胞が産生する増殖因子の同定、またこのシグナル伝達系の阻害による去勢抵抗性の抑制を検証、実証する目的で、基礎実験的な検証を進めた。

## 3. 研究の方法

ヒト前立腺組織標本を用いた初代培養を施行し、ヒト前立腺線維芽細胞を樹立した。三重大学倫理委員会の承認を得、前立腺癌疑いの患者検体を直接用いることで得られる結果は、より臨床に直結したものとなることが予測された。さらに、これら樹立したヒト線維芽細胞と、ヒト前立腺上皮細胞をコラーゲンをうい混合した移植グラフトを作成、研究代表者らの施設で得意とするマウス人被膜下に移植し、腫瘍形成試験を行った。得られる腫瘍組織の形態(肉眼所見、サイズ)、組織所見(H&E, Ki67, AR, NSE, ChromograninA, Vimentin染色等)の結果から、前立腺上皮細胞の腫瘍形成、増殖、去勢抵抗性、また神経内分泌前立腺癌細胞への変化を促進する線維芽細胞、つまりCAFを同定し、促進しない線維芽細胞をNAFと決定した。研究代表者らはすでに確立された免疫染色法を備えており、再現性の高い実験が可能と思われた。CAF、NAFの細胞群を培養し、conditioned mediumを得たのち(48hr, 72hr)、前立腺上皮細胞(BPH1, LNCaP, 22RV1)に対する分子生物学的影響に関してMTT assay(細胞増殖)試験を行った。これにより、癌微小環境における間質細胞の重要な成分の一つである線維芽細胞が上皮細胞に及ぼす影響を観察することが可能であった。

#### 4. 研究成果

異なる患者から得られた癌関連線維芽細胞が異なる細胞表面蛋白を発現しているということ Stro-1, CD117, CD105 の FACS 抗体を用いた実験において検証することができた。前立腺癌上皮細胞の一つである 22RV1 と癌関連線維芽細胞を混合移植した腫瘍形成試験によって、CD105 の中和抗体によってマウスを処理することで腫瘍の縮小が観察された。22RV1 は抗アンドロゲン剤処理により去勢抵抗性前立腺癌の挙動を示し、さらに CD105 抗体はこの腫瘍形成モデルも増大を抑制することが観察された。線維芽細胞の細胞表面マーカーを操作することで癌線維芽細胞をターゲットとした治療法の基礎的基盤になると考えられた。

図 1

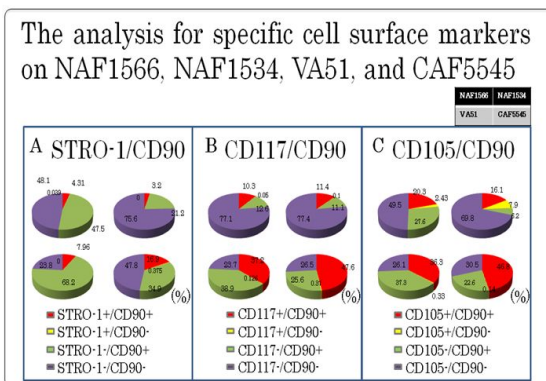


図 1 は線維芽細胞による細胞表面マーカー発現の違いを表している。

このように線維芽細胞間において、その細胞表面蛋白の発現は大きく異なることが確認された。

図 2

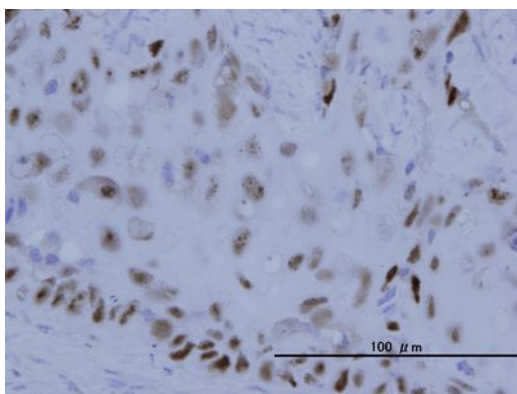


図 2 は正常前立腺上皮細胞の細胞株である BPH1 と癌関連線維芽細胞である M5 (当教室にて樹立) を混合し作成した腫瘍の SV40 染色である。SV40 は BPH1 細胞に特異的であり、図に示すように移植後も BPH1 特有の性質を保持している。

図 3

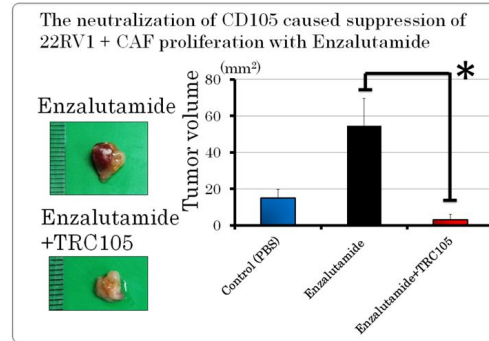


図 3 は前立腺癌細胞株の一つである 22RV1 と癌関連線維芽細胞を腎被膜下に混合移植したマウスを抗アンドロゲン剤の一つであるエンザルタミドで処理し、さらに CD105 の中和抗体にて処理 (尾静脈投与) した結果である。

図のように CD105 により腫瘍の増殖が著明に抑制されている。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

加藤 学、細胞表面タンパクによる前立腺癌間質細胞の不均一性の検討、第 104 回日本泌尿器科学会総会、2016 年 4 月 23 日～4 月 25 日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

Manabu Kato, The exploration of the order in the heterogeneity of prostate cancer-associated stroma environment, 111st American Urological Association Annual meeting, 2016 年 5 月 6 日～2016 年 5 月 10 日、サンディエゴ(アメリカ合衆国)

加藤 学、前立腺の基礎研究を通して得られた泌尿器科臨床における新たな視点、第 66 回日本泌尿器科学会中部総会、2016 年 10 月 27 日～2016 年 10 月 30 日、四日市文化会館、四日市都ホテル(三重県・四日市市)

[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

加藤 学 (KATO Manabu)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60626117

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )