

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11014

研究課題名(和文) 前立腺癌骨転移において骨髄由来間葉系幹細胞が癌細胞の悪性形質獲得に与える影響

研究課題名(英文) Soluble cytokines derived from bone marrow-derived mesenchymal stem cells activated androgen receptor phosphorylation in human prostate cancer cells through ERK/MAP signaling pathways

研究代表者

野村 威雄(NOMURA, TAKEO)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40347034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：LNCaP細胞はBMSCs共培養下で有意に増殖し、浸潤・遊走能はそれぞれ2.13倍、2.75倍に増加した。共培養下ではLNCaP細胞におけるAR・Aktリン酸化亢進を認めたがERKリン酸化は変化を認めなかった。またSnail・Slugとも共培養下で発現亢進し、Snailの核内移行を認めた。Akt阻害剤によりLNCaP細胞の増殖、浸潤・遊走能はそれぞれ抑制され、ARリン酸化は抑制された。以上の結果からBMSCsと共培養下で生じるLNCaP細胞の細胞増殖能亢進はAkt-ARシグナル伝達系による制御を受けていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌骨転移モデルでは前立腺癌細胞と骨髄由来間葉系幹細胞(Bone marrow-derived mesenchymal stem cells; BMSCs)の相互作用により癌細胞の増殖・浸潤・遊走能が亢進することが証明された。分子学的解析によりBMSCsが産生・分泌するサイトカインが癌細胞細胞を刺激し、PI3K/AktおよびMAPKシグナル伝達系を介したAR活性化が悪性形質獲得に寄与することが判明した。今後中和抗体を使用したサイトカイン中和療法やPI3K/AktおよびMAPKシグナル伝達系阻害剤を使用した骨転移巣治療の可能性に期待がもたれる。

研究成果の概要(英文)：Accumulated evidence suggests stromal-epithelial interactions are critical to the progression of prostate cancer. In this study, we examined AR phosphorylation in LNCaP cells co-cultured with the conditioned medium (CM) from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs). LNCaP cells proliferated significantly in BMSCs co-culture, and their invasion and migration abilities increased 2.13 times and 2.75 times, respectively. AR-Akt phosphorylation was enhanced in LNCaP cells under co-culture, but ERK phosphorylation was unchanged. The expression of Snail and Slug was also enhanced in co-culture, and Snail was translocated into the nucleus. The Akt inhibitor suppressed proliferation, invasion and migration of LNCaP cells, and suppressed AR phosphorylation. From the above results, it was suggested that the cell proliferation enhancement of LNCaP cells produced by co-culture with BMSCs is controlled by the Akt-AR signal transduction system.

研究分野：前立腺癌治療

キーワード：前立腺癌 骨転移 骨髄由来間葉系幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は進行すると骨転移を来し骨痛、病的骨折、脊髄圧迫による痺れや麻痺、高カルシウム血症などの骨関連事象を発症する。骨転移は前立腺癌患者の生活の質を低下させるだけでなく予後不良因子であるため骨転移巣での癌細胞増殖を制御し、さらには骨代謝を正常に維持することが重要である。骨転移巣では前立腺癌細胞が分泌する種々のサイトカインが骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells; BMSCs) に作用し骨代謝のバランス制御機構が破綻することが報告されている (Prostate, 39: 246-61, 1999)。われわれの基礎実験の結果から、BMSCs 自体も複数のサイトカインを分泌し前立腺癌細胞を刺激して、アンドロゲン受容体 (AR) シグナル伝達系活性化を介して前立腺癌細胞の増殖を促進することが示唆された。本研究では BMSCs による前立腺癌細胞の悪性形質 (増殖・浸潤・遊走) 獲得に関与する分子生物学的機序を AR 活性化および上皮間葉系変化 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) を中心に解析し、併せて BMSCs の分化状態との関連性を研究する。以上の研究をとおして前立腺癌骨転移巣での癌細胞の増殖を制御するとともに骨代謝を正常に維持するために BMSCs が分泌するサイトカインを標的とした新たな治療法の開発を目指す。

### 2. 研究の目的

前立腺局所から血行性に骨に到達した前立腺癌細胞は骨髄に生着し増殖を始めるが、従来の研究では癌細胞が分泌する種々のサイトカインやシグナル伝達物質 (IL-6、CREB、VEGF 等) が骨芽細胞、破骨細胞、あるいは BMSCs を刺激することで前立腺癌骨転移巣の形成を促進することが報告されている。骨髄に生着した癌細胞により刺激された骨芽細胞や破骨細胞の増殖が亢進する (正常骨代謝機構の破綻) ことに加え、BMSCs は骨芽細胞あるいは破骨細胞への分化誘導が促進されるため骨代謝のバランスが破綻し造骨性変化や溶骨性変化を生じ骨破壊が進行する。近年癌細胞増殖と BMSCs の役割に関する研究が始まり、BMSCs は遊走・浸潤能および自己再生能を有し、癌細胞と共生すると骨芽細胞や破骨細胞だけでなく軟骨細胞、脂肪細胞、線維芽細胞、筋細胞などにも分化することが判明した (Leukemia, 16: 650-7, 2002)。さらに BMSCs は癌細胞が骨に生着した際に成熟幹細胞に変化し癌細胞のコロニー形成化および増殖促進に影響することが知られている。

われわれはこれまでに BMSCs が分泌する種々のサイトカインを同定した。さらに BMSCs とホルモン感受性前立腺癌細胞 (LNCaP) を共培養すると LNCaP 細胞の増殖が促進し AR シグナル伝達系の活性化が生じることを確認している (未発表データ)。これらの基礎研究の結果から前立腺癌細胞が BMSCs を刺激するだけでなく、BMSCs が前立腺癌細胞を刺激している可能性が示唆された。

本研究においては、LNCaP 細胞と BMSCs の共培養モデルを用いて骨微小環境における下記の項目について研究する。(1) BMSCs が LNCaP 細胞の悪性形質 (増殖・浸潤・遊走) 獲得に与える影響を AR 活性化に関する PI3K/Akt および MAPK シグナル伝達系に加え EMT 関連分子 (E-cadherin、B-catenin、N-cadherin、Vimentin) およびその転写因子 (Snail) を中心に分子細胞学的に解析する。(2) LNCaP と共培養することで生じる BMSCs の分化状態の変化について分子細胞学的に解析する。(3) BMSCs が分泌する種々のサイトカインのうち LNCaP 細胞の悪性形質獲得に最も影響を与えるサイトカインを特定し、特定されたサイトカインを標的とした治療法について検討する。

### 3. 研究の方法

本研究では BMSCs が産生・分泌するサイトカインが LNCaP 細胞を刺激し悪性形質 (増殖・浸

潤・遊走)獲得に関係することを明らかにするために、(1)AR活性化に關与するPI3K/AktおよびMAPKシグナル伝達系と關係する上皮間葉系变化(Epithelial-mesenchymal transition; EMT)の制御メカニズムについてEMT関連分子群に加えその転写因子であるSnailとの關係を分子細胞生物学的に解析する。さらに(2)PI3K/AktおよびMAPKによるEMT制御機構をSnail安定高発現LNCaP細胞、SnailノックダウンLNCaP細胞、Akt阻害剤、ERK阻害剤を使用して解明する。次に(3)BMSCsが前立腺癌細胞と共存することで生じるOsteoclastogenesisおよびOsteoblastogenesisについて分子細胞学的に解析する。最後に(4)BMSCsから分泌される上位6種類のサイトカインに焦点を絞り最も前立腺癌細胞の悪性形質獲得に影響するサイトカインを同定し、さらに特定したサイトカインに対するモノクローナル中和抗体を用いて癌細胞の増殖・浸潤・遊走能が抑制され得るかPI3K/Akt・ERK-AR-Snailシグナル伝達系を中心に分子細胞学的に解析する。

#### 4. 研究成果

BMSCs ( $5 \times 10^4$ 個)とLNCaP細胞 ( $5 \times 10^4$ 個)を共培養するとLNCaP細胞は共培養72時間以降有意に増殖速度が増加した(MTS assay)。また浸潤・遊走能は共培養24時間でそれぞれ2.13倍、2.75倍に増加した(Invasion/Migration assay)。次に細胞増殖に関して分子細胞生物学的に解析したところ、共培養下ではLNCaP細胞におけるARリン酸化(Ser 81)およびAktリン酸化の亢進を認めたがERKリン酸化には変化を認めなかった(免疫プロット法)。同様に共培養下ではPSA産生の亢進を認めた。浸潤・遊走能に関してはEMT関連分子の解析を施行した。転写因子SnailとSlugとも共培養下で発現亢進し、免疫染色による解析ではSnailの核内移行を認めたがEMT関連分子の発現に変化は認めなかった。一方MMP-7およびCyclin D1は共培養下で発現亢進を認めた。

Akt活性化によってLNCaP細胞は悪性形質を獲得しているため、Akt阻害剤(LY294002)によるARリン酸化状態の抑制によるLNCaP細胞の増殖、浸潤・遊走能について分子細胞学的に解析した。Akt阻害剤の処理時間・濃度依存性にLNCaP細胞の増殖、浸潤・遊走能はそれぞれ抑制され、またARリン酸化の抑制も観察された。以上の結果からBMSCsと共培養することで生じるLNCaP細胞におけるARリン酸化の亢進はAktシグナル伝達系による制御を受けていることが示唆された。

ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1)はサイトカインや物理化学的ストレスによって活性化されアポトーシスを誘導する細胞内シグナル伝達分子と言われているが、BMSCs ( $5 \times 10^4$ 個)とLNCaP細胞 ( $5 \times 10^4$ 個)を共培養するとLNCaP細胞におけるASK1の発現亢進(3.8倍)を認めた。つまり本実験系においてASK1はアポトーシス誘導ではなく癌細胞増殖を誘導している可能性が示唆された。ASK1シグナル伝達系の下流分子であるMKKおよびJNK1、JNK2、JNK3について各リン酸化抗体を使用してシグナル活性化を解析したところ、MKKおよびJNK1、JNK2のリン酸化亢進を認めたがJNK3リン酸化には変化を認めなかった。またMKKおよびJNK1、JNK2、JNK3発現量は共培養下においても変化を認めなかった。

共培養下ではBMSCsにおけるALP染色・TRAP染色陽性細胞の増可を認めた。以上の結果から骨転移巣ではBMSCsが破骨細胞あるいは骨芽細胞に分化し溶骨性および造骨性変化とも亢進する可能性が示唆された。

本研究ではBMSCsと前立腺癌細胞の相互作用による骨転移巣形成および癌細胞増殖・浸潤・遊走能が複数のシグナル伝達系によって制御される可能性が証明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三股 浩光  (MIMATA HIROMITSU)  (60219714)	大分大学・医学部・教授       (17501)	