

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：20101  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K11149  
研究課題名(和文) 前立腺がん微小環境制御による新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidating the tumor microenvironment in prostate cancer for therapy development based on interaction between cancer-associated fibroblasts, extracellular matrix and mast cells.

## 研究代表者

橋本 浩平 (Hashimoto, Kohei)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40404678

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)：前立腺がん微小環境を解明するために、癌関連線維芽細胞(CAF)、細胞外マトリックス(ECM)、および肥満細胞による微小環境が前立腺上皮に及ぼす影響を検討した。CAFからCXCL12が分泌され、肥満細胞を動員した。scaffoldsを用いた3次元培養では、CAFにより前立腺上皮細胞の形態が紡錘細胞様に変化した。これらは肥満細胞により増強し、トリプターゼによるECMの変化が、前立腺上皮の形態変化を誘導することが明らかとなった。前立腺がん微小環境において、前立腺上皮への影響は肥満細胞によるトリプターゼを介してECMリモデリングを介した間接的な作用も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

前立腺摘除術検体からCAFとNPFを分離樹立し、pairで使用することによりCAFとNPFの差として得られる結果の意義は大きいと考える。前立腺がん微小環境においてCAFと上皮細胞だけでなく肥満細胞を通じたECMのリモデリングの重要性が明らかとなった。CAFからCXCL12の分泌、肥満細胞の遊走促進、トリプターゼによる細胞外基質の変化が、より一層上皮細胞の形態変化を惹起し、浸潤能の亢進につながる可能性が示唆された。前立腺間質の一連のチェーンを制御することにより去勢抵抗性前立腺がんの革新的な治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the tumor microenvironment in prostate cancer for therapy development, we investigated the interaction between cancer-associated fibroblasts, the autogenous extracellular matrix (ECM) they deposit, and mast cells. Patient-derived CAFs induced by estrogen recruited mast cells via chemokine CXCL12 in a CXCR4-dependent manner. CAFs were cultured in three-dimensional melt electrowritten scaffolds where they deposited extensive ECM and promoted significant changes in prostate epithelial morphology, when compared to matched normal prostatic fibroblasts (NPFs).

We demonstrated that mast cell-derived tryptase potentiates CAF-induced morphology changes in adjacent prostate epithelia indirectly via the stromal microenvironment and provides novel insight into the discrete stromal-epithelial interactions. These results suggest that tryptase as an important mediator of these effects, which may be a novel therapeutic target to show or halt prostate tumorigenesis.

研究分野：癌分子生物学

キーワード：前立腺癌 がん微小環境 間質細胞 癌関連線維芽細胞 肥満細胞 細胞外基質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺がんに対するアンドロゲン除去療法(去勢療法)において、経過中に発展する腫瘍の去勢抵抗性獲得が問題となる。現在、去勢抵抗性前立腺がんに対してアンドロゲン受容体を介するシグナルを阻害する治療が中心であるが、その予後は2-3年と限られており、去勢抵抗性獲得機序の解明は治療戦略の構築において急務である。近年、がん細胞の増殖・進展にこれを取りまく微小環境の重要性が注目されている。がん細胞周囲には、併存する他の上皮細胞や、間質においてはがん関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast: CAF)をはじめ、血管、炎症・免疫細胞が存在して特徴的な微小環境を構築している。それぞれの細胞はお互いに影響を及ぼしながら、多様な遺伝子変化を起こし、がん細胞の増殖・浸潤・転移、および治療抵抗性に密接に関わっていると考えられる。このようにがん制御においてがん細胞のみを標的としてとらえるのではなく、がん組織全体としてがん微小環境を理解し、その悪性変化を時空間的に捉えることによって、これらを標的とした全く新しい治療法の開発へと発展することが期待される。

### 2. 研究の目的

前立腺がん組織においてがん細胞に併存する神経内分泌細胞が去勢抵抗性獲得に寄与することを明らかにし、前立腺がんの去勢抵抗性獲得においてがん微小環境が深く関与することを明らかにした(Hashimoto K, et al. Lab Invest. 95(3):283-295. 2015)。本研究において、CAFを中心に免疫細胞、血管内皮細胞といった間質における細胞の相互作用を明らかにし、さらには細胞外基質を含めたがん微小環境変化の前立腺がん細胞去勢抵抗性獲得への関与を明らかにする。本研究により、革新的な前立腺がん制御機構の開発をするための研究基盤が確立されるものとする。

### 3. 研究の方法

前立腺がんに対して根治的前立腺摘除術を施行した摘出標本内のがん部、非がん部より組織を採取し、コラゲナーゼ・トリプシンで処理し、上皮成分と間質成分を分離した。Lawrence MGet al. Nat Protoc8(5):836-48, 2013に準じて、特異的マーカーを用いてセルソーター(FACS-Aria™)にてCAFおよび正常前立腺線維芽細胞(normal prostatic fibroblast: NPF)を採取した。細胞培養液(RPMI1640, 5%FBS, 1nMテストステロン、10ng/mlbFGF, 100U/mlペニシリン[P]/100mg/mlストレプトマイシン[S])で37℃, 5%CO<sub>2</sub>で培養し、2~10の継代細胞を使用した。前立腺上皮細胞BPH-1細胞はRPMI1640+5%FBS+P/Sで培養し、肥満細胞HMC-1細胞はIMDM+1.2mM thioglycerol+10%FBS+P/Sで培養した。Microarray法を用いて、CAFとNPFの遺伝子発現の違いを解析し、NPFで発現が弱く、CAFに発現が有意に亢進される遺伝子を網羅的に解析した。CAFで有意な遺伝子のうち、エストロゲンにより誘導される遺伝子を、K平均法クラスター解析を用いて同定した。Melt electrowritten poly caprolactone (PCL) scaffoldsを用いて、CAFおよびNPFを1.4x10<sup>4</sup>/ウェル(24ウェル)で培養し、アスコルビン酸を10nM加え、7日間細胞外基質を増生させた上でBPH-1細胞およびHMC-1細胞を共培養した。BPH-1はCellTrackerGreenを用いて染色したものを使用した。BPH-1細胞の形態変化はMetamorph®ソフトウェアを使用した。sphericity 0~1.0(1.0=球形)、volume/cell、length/cell、orientationを指標とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 前立腺がん微小環境のダイナミズムの検討

前立腺全摘除術検体から前立腺がん関連線維芽細胞(CAF)および正常線維芽細胞(NPF)の分離・同定

前立腺全摘除術検体から術前3Tesla-MRIにより局在が予測されたがん組織および正常組織を採取し、尖刃で細断した後コラゲナーゼ・トリプシンで処理し、上皮成分と間質成分を分離した。セルソーターにてCAFおよび正常前立腺線維芽細胞(normal prostatic fibroblast: NPF)を分離・同定した(図1)。

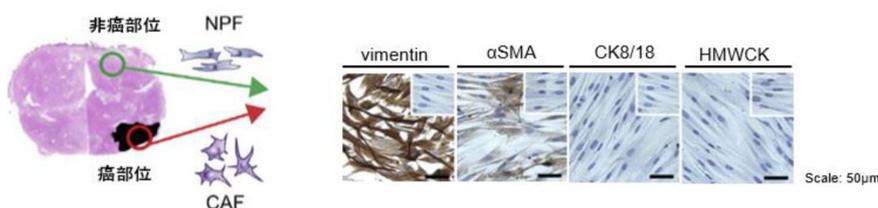


図1. 前立腺全摘除術組織の癌部位と非癌部位から組織を採取し、セルソーターを用いて前立腺がん関連線維芽細胞(CAF)および正常線維芽細胞(NPF)を分離・同定した。

## CAFとNPFの遺伝子発現の網羅的解析

microarray法を用いて、アンドロゲン存在下でCAFとNPFの遺伝子発現の違いを解析し、NPFで発現が弱く、CAFに発現が有意に亢進される以下遺伝子を同定した。CXCL12, SFRP4, PLA1A, PI16, PSG4, MFAP5, FGF5。エストロゲンにより誘導される発現シグナルの網羅的解析について、K平均法クラスター解析を行エストラジオールに誘導され、かつCAFで発現亢進している遺伝子CXCL12に注目した。CXCL12の発現は、NPF、良性線維芽細胞(BAF)と比較してCAFで亢進していることを確認した(図2ab)。

CXCL12はケモカインCXCL12をコードしている。受容体であるCXCR4は肥満細胞に発現があることが知られている。肥満細胞株HMC-1細胞を用いて、CXCR4の発現を確認した(図3a)。CXCL12でHMC-1の遊走能が亢進し、CAFの培養上清で再現された(図3b)。

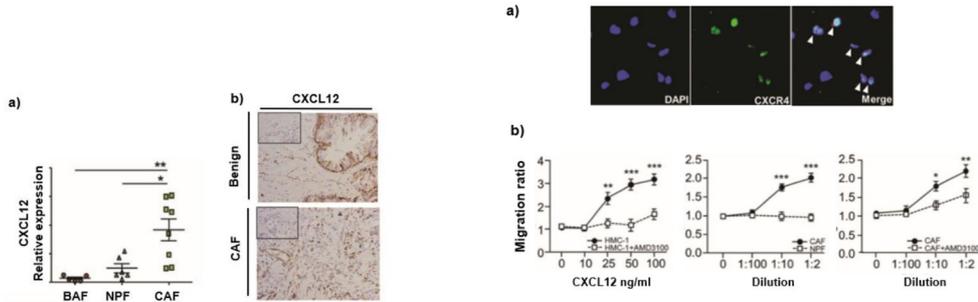


図2. a) 良性関連線維芽細胞(BAF)、NPF、CAFにおけるCXCL12の発現ではCAFで亢進していた。b) 前立腺全摘除術組織においてCAFにおけるCXCL12の発現を確認した。

図3. a) 肥満細胞株HMC-1細胞におけるCXCR4の発現 b) HMC-1細胞の遊走能はCXCL12濃度依存性で、CXCR4阻害薬AMD3100で阻害された。CAFの培養上清で亢進したHMC-1細胞の遊走はAMD3100で阻害された。

## (2) 前立腺がん微小環境の変化における免疫応答

### 3次元共培養モデルの作成

前立腺がん間質におけるエストロゲンの作用と肥満細胞の役割を明らかにするため、網羅的遺伝子解析で明らかとなったCXCL12のCAFと肥満細胞へ及ぼす影響について3次元共培養モデルを用いて明らかにする。

Melt electrowritten poly caprolactone (PCL) scaffoldにCAFまたはNPFを培養し、ascorbic acidを加えることで、細胞外基質の増生を促進させた3次元共培養モデルを用いた。CAFおよび肥満細胞による前立腺がん細胞への影響を確認する前に、肥満細胞による前立腺がん間質の影響を確認するため、上皮細胞として前立腺肥大症細胞株 BPH-1 を用い、上記3次元培養モデルで上皮細胞の変化についてMetamorpho解析ソフトを用いて検討した(図4)。

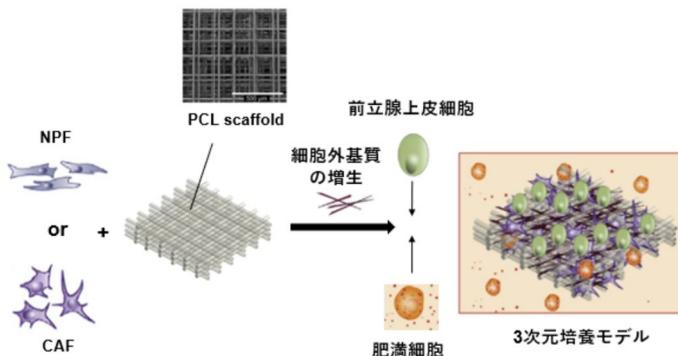


図4. 3次元共培養モデル:PCL scaffoldに前立腺間質細胞を培養し、細胞外基質の増生をascorbic acidで促進させた3次元共培養モデルを作成。肥満細胞、前立腺上皮細胞を共培養させ、前立腺がん間質の影響を確認した。上皮細胞の形態的変化の解析はMetamorpho<sup>®</sup>解析ソフトを用いた。

NPF、CAFともに3次元培養モデルでF-actin, fibronectin, collagen IVが増生した(図5a)。マツソントリクローム染色を用いて細胞外基質の線維増生を確認した。CAFでより密な間質線維増殖を確認(白く抜けているのはPCL scaffoldの線維)(図5b)。線維増生の方向性を検討した。CAFではより均一な線維増生の方向性を持った(図5c)。CAFによる3次元培養モデルにCellTrackerGreenで染めた上皮細胞を加えたモデルを作成した(図5d)。

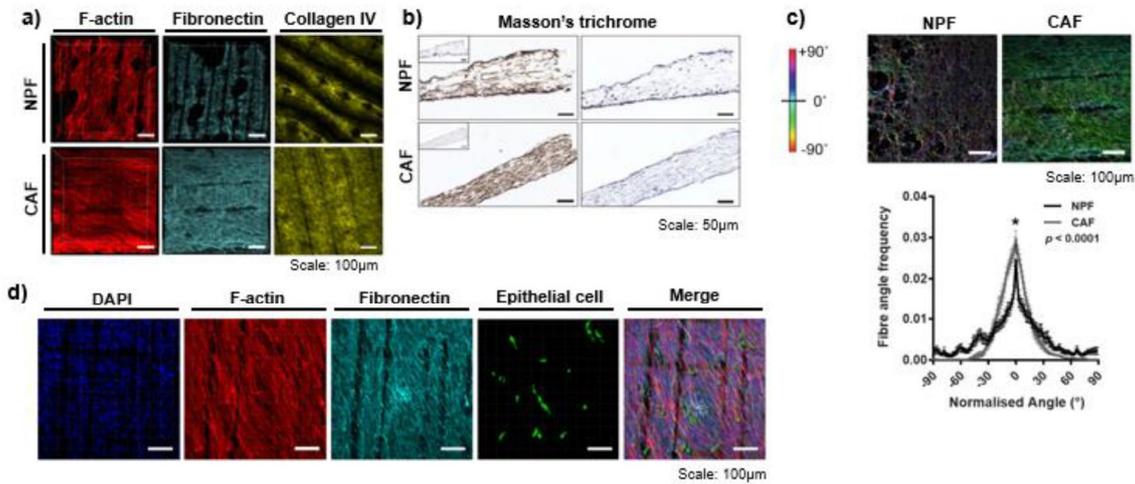


図5. a) NPF, CAFともに3次元培養モデルでF-actin, fibronectin, collagen IVが増生した。b) マッソントリクローム染色でCAFでより密な間質線維増殖を確認（白く抜けているのはPCL scaffoldの線維）。c) CAFではより均一な線維増殖の方向性を持った。d) CAFによる3次元培養モデルにcell tracker greenで染めた上皮細胞を加えたモデルを作成した。

### NPF, CAFにおける上皮細胞への影響

NPF, CAF共培養によるBPH-1細胞の形態を検討した。CAFとの共培養でBPH-1細胞の形態はより細長く一定方向の向く傾向を認めた(図6a)。BPH-1細胞は時間経過とともにCAF3次元培養モデルで紡錘形細胞様に形態変化した(図6b)。Metamorph解析でBPH-1細胞の形態変化を行った。sphericityはCAFにおいて低下し、cell volume、cell lengthは増加した。長軸の方向性はより均一化した。

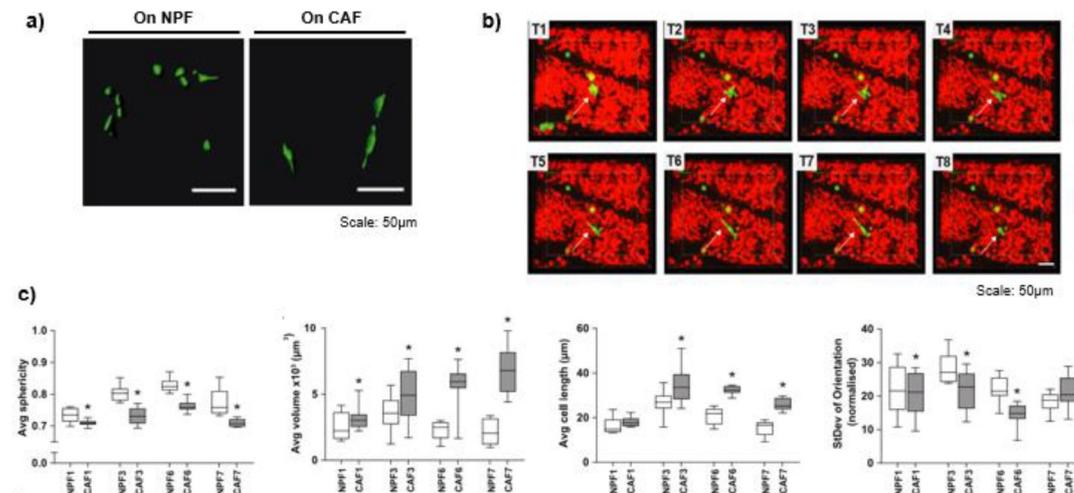


図6. a) 3次元培養モデルNPF, CAFにおけるBPH-1細胞の形態 b) 時間経過とともにCAF3次元培養モデルで紡錘形細胞様に形態変化するBPH-1。c) BPH-1細胞の形態変化解析結果：sphericityはCAFにおいて低下し、cell volume、cell lengthは増加した。長軸の方向性はより均一化した。

### 肥満細胞のがん微小環境に及ぼす影響

CAFの3次元培養に肥満細胞HMC-1細胞を加えることでBPH-1細胞の形態変化を検討した。BPH-1細胞のsphericityはHMC-1の濃度依存性に低下し、cell volume、cell lengthは増加した。長軸の方向性はHMC-1細胞濃度依存性により均一化する傾向だった(図7a)。肥満細胞の脱顆粒を誘発させるcompound4880でBPH-1の変化が亢進され、阻害剤cromolynで抑制されることを確認した。HMC-1細胞の培養上清または肥満細胞が分泌物の一つであるトリプターゼ(リコンビナント)を加えることで、肥満細胞を加えたCAF3次元培養におけるBPH-1細胞の形態変化が再現された。BPH-1細胞のsphericityはHMC-1培養上清およびトリプターゼで低下し、cell volume、cell lengthは増加した。長軸の方向性はHMC-1培養上清およびトリプターゼでより均一化する傾向だった(図7b)。

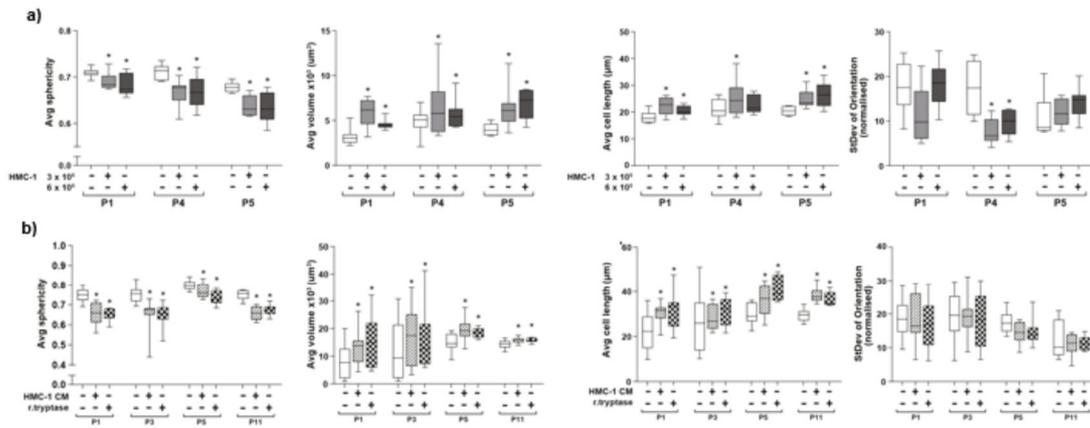


図7. CAF3次元培養におけるBPH-1細胞の肥満細胞HMC-1細胞による影響。a) BPH-1細胞のsphericityはHMC-1の濃度依存性に低下し、cell volume、cell lengthは増加した。長軸の方向性はHMC-1細胞濃度依存性により均一化する傾向だった。b) BPH-1細胞のsphericityはHMC-1培養上清およびトリプターゼで低下し、cell volume、cell lengthは増加した。長軸の方向性はHMC-1培養上清およびトリプターゼでより均一化する傾向だった。

CAF3 次元共培養における HMC-1 の共培養のタイミングを変えることで、BPH-1 への肥満細胞の影響が、直接的な作用か細胞外基質の変化を通じた間接的な作用かを検討した。CAF3 次元培養に BPH-1 細胞を共培養させ 1 日後に BPH-1 細胞の形態変化を確認した。これを control 群とした。BPH-1 細胞を加えるタイミングと同時に HMC-1 細胞を加えた simultaneous(sim.)群と BPH-1 細胞を加える 2 日前に HMC-1 細胞を加え、2 日後に wash out を行った後 BPH-1 細胞を加えた wash out(WO)群を設定した(図 8a)。BPH-1 細胞の sphericity は sim.群および WO 群で低下し、cell volume、cell length は sim.群および WO 群で増加した。長軸の方向性は sim.群および WO 群でより均一化する傾向だった(図 8b)。HMC-1 の代わりにリコンビナントのトリプターゼを使用して同様の検討を行った。BPH-1 細胞の sphericity は sim.群および WO 群で低下し、cell volume、cell length は sim.群および WO 群で増加した。長軸の方向性は sim.群および WO 群でより均一化する傾向だった(図 8c)。CAF 間質における上皮細胞の影響は、直接的な作用だけでなく間接的に肥満細胞を誘導しトリプターゼで細胞外基質を変化させることでより上皮細胞のアグレッシブな形態変化を促進することが明らかとなった。

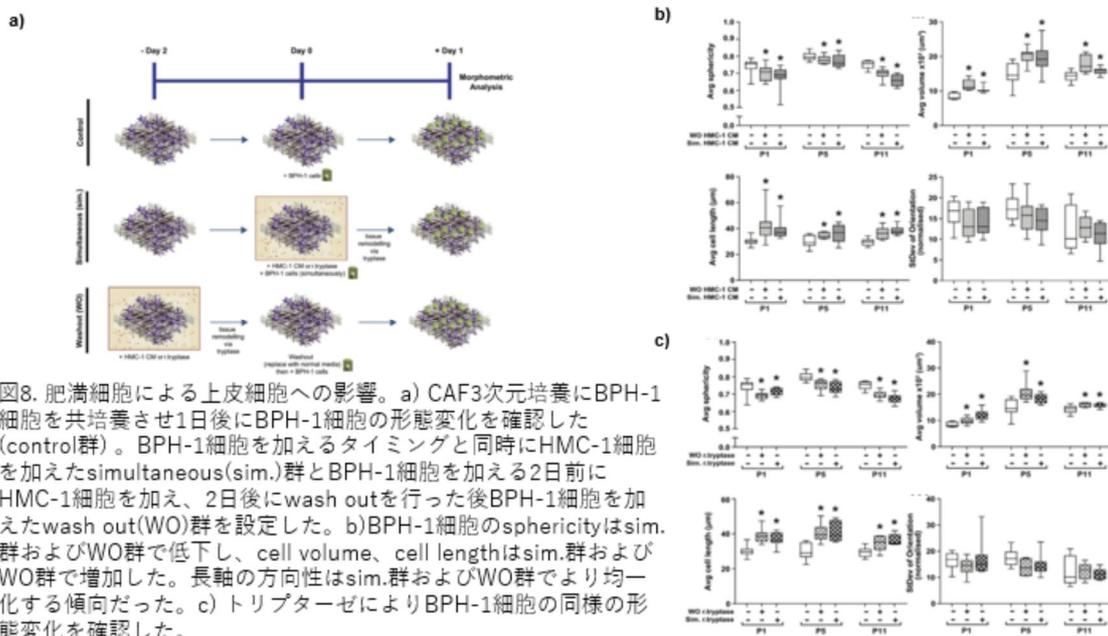


図8. 肥満細胞による上皮細胞への影響。a) CAF3次元培養にBPH-1細胞を共培養させ1日後にBPH-1細胞の形態変化を確認した(control群)。BPH-1細胞を加えるタイミングと同時にHMC-1細胞を加えたsimultaneous(sim.)群とBPH-1細胞を加える2日前にHMC-1細胞を加え、2日後にwash outを行った後BPH-1細胞を加えたwash out(WO)群を設定した。b)BPH-1細胞のsphericityはsim.群およびWO群で低下し、cell volume、cell lengthはsim.群およびWO群で増加した。長軸の方向性はsim.群およびWO群でより均一化する傾向だった。c) トリプターゼによりBPH-1細胞の同様の形態変化を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本 浩平
2. 発表標題 前立腺癌とエストロゲン
3. 学会等名 第20回UTPシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔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	舂森 直哉  (Masumori Naoya)  (20295356)	札幌医科大学・医学部・教授     (20101)	