

令和 3 年 8 月 20 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16706

研究課題名（和文）前立腺癌治療抵抗性におけるCYP19遺伝子多型と前立腺間質エストロゲン受容体発現

研究課題名（英文）Association between CYP19 gene polymorphism and prostate stromal estrogen receptor expression in prostate cancer treatment resistance

研究代表者

神田 壮平（Kanda, Sohei）

秋田大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：40810966

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：Tissue Microarrayを用いた検討にて、前立腺間質エストロゲン受容体発現と進行前立腺癌化学内分泌療法抵抗性の関連は軽度であることが示唆された。正常前立腺間質細胞は前立腺癌細胞のMIC-1上昇を介し、IL-6およびIL-8などのサイトカイン分泌が制御されている可能性が示唆された。前立腺間質細胞は前立腺周囲脂肪および前立腺癌との交互作用でサイトカイン分泌が上昇し、さらに本機序は前立腺癌内のMIC-1の発現に制御されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年日本人において前立腺癌は著しい増加を示している。進行性前立腺癌には内分泌治療が有効であるが、いずれ内分泌抵抗性前立腺癌となり死に至る。我々はpilot研究で、術前無治療や術前内分泌療法に比べ化学内分泌療法施行後の前立腺癌組織では間質エストロゲン受容体が高発現していることを見出している。前立腺間質エストロゲン受容体およびその下流シグナルであるサイトカインの関連を調べることにより化学内分泌抵抗性前立腺癌の発生機序解明および治療法発明につながる。

研究成果の概要（英文）：A study using Tissue Microarray suggested that the association between prostatic stromal estrogen receptor expression and advanced prostate cancer chemoendocrine resistance was mild. It was suggested that normal prostate stromal cells may regulate the secretion of cytokines such as IL-6 and IL-8 through the elevation of MIC-1 in prostate cancer cells. It was suggested that cytokine secretion was increased in prostate stromal cells by interaction with periprostate fat and prostate cancer, and that this mechanism may be regulated by the expression of MIC-1 in prostate cancer.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 化学内分泌抵抗性 前立腺間質エストロゲン受容体 前立腺周囲脂肪 サイトカイン分泌

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年日本人において前立腺癌の増加が著しい。2016年の癌部位別罹患率予測では前立腺癌が男性において罹患率1位の癌となった。進行前立腺癌には内分泌治療が有効であるが、いずれ去勢(内分泌)抵抗性前立腺癌となり死に至る。近年新規抗癌剤や内分泌療法が複数保険承認となり進行前立腺癌治療は多様化した。しかし、各治療薬には交叉耐性が存在し、治療反応や副作用出現には個体差が大きい。よって適切な逐次療法選択や治療反応、副作用、予後予測のためのバイオマーカー同定は進行前立腺癌治療の重要な課題である。また同時に、複数の治療薬が登場しているにもかかわらず化学内分泌療法抵抗性前立腺癌は根治が不能で有効な治療手段がないのも現状である。我々の教室ではこれまでも進行前立腺癌のバイオマーカー同定や新規治療標的探索を目的に基礎研究を重ね、特に構築した血液バイオバンクを用いた関連遺伝子多型を数多く報告してきた(Tsuchiya, J Clin Oncol, 2006, Olama A, Hum Mol Genet, 2013, Jarai Z, Nat Genet, 2011)。最近、アンドロゲン合成関連酵素であるアロマターゼをコードするCYP19の生殖細胞系列遺伝子多型

(rs10459592, rs4775936, rs2470152)が前立腺癌発症・進展と関連深いことを見出し(Kanda, Int J Cancer, 2015)、更に invitro で、rs4775936 と rs10459592 の2つのリスクアレルはCYP19転写活性に影響することを報告した(図1)。以上よりCYP19プロモーター領域の機能的な遺伝子多型(SNPs)が前立腺癌発症・進展に強く関連していると考えている。更にCYP19はテストステロンをエストロゲンに変換する酵素であり、エストロゲン受容体(ER)活性と強い関連がある(Kumar, Mol Endocrinol, 2009)。我々はpilot研究で、術前無治療や術前内分泌療法に比べ化学内分泌療法施行後の前立腺癌組織では間質のERが高発現していることを見出している(図2)。この結果は間質におけるER発現が前立腺癌化学内分泌抵抗性に関連する可能性を示唆している。上記よりCYP19と前立腺間質ER、または両分子の相互作用が前立腺癌化学内分泌療法抵抗性に強く関連している可能性がある。特に、CYP19遺伝子多型を有する患者ではCYP19活性変化に伴い血中または前立腺組織内でのエストロゲンバランスが変化し、前立腺間質ERおよびその下流シグナルを制御し、前立腺癌化学内分泌抵抗性に関連すると仮説を立てた。

図1 PC-3前立腺癌細胞株におけるCYP19遺伝子多型とCYP19活性

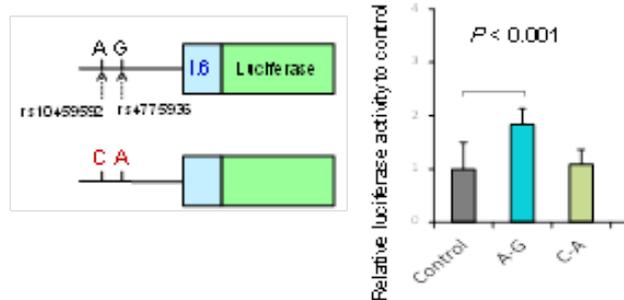
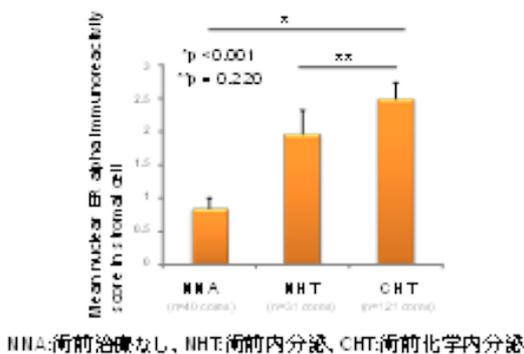


図2 前立腺全摘患者における術前治療とERα発現の関連



2. 研究の目的

以上より本研究の目的は進行前立腺癌治療反応・予後へのER発現及びCYP19 SNPsの影響の再検証、および化学内分泌療法抵抗性前立腺癌に関する前立腺間質の影響と新規の関連分子同定である。

3. 研究の方法

1) 前立腺癌全摘組織における術前治療と分子マーカー発現の検討: 当院で2006年から2016年までに前立腺全摘を行ったハイリスク限局性前立腺癌症例のうち、「泌尿器腫瘍の治療反応と進展余地を目的とした遺伝子解析研究: 受付番号607-2」「脂肪組織由来Adipokineと泌尿器癌増殖・進展の関連検討: 受付番号757」に同意された症例、および術前化学内分泌療法に関しては「ハイリスク限局性前立腺がんに対する前立腺全摘術における抗がん剤を用いた術前補助療法: 受付番号1341」に同意され、ドセタキセル、エストラムスチン、内分泌併用の術前化学内分泌療法の後前立腺全摘を施行された前立腺癌症例、の前立腺全摘標本を用いて、1症例3コア、計70例203コアのTissue Microarray (TMA) Slideを作成した。上記臨床研究の詳細に関しては過去にすでに報告している(Narita, World J Sur Oncol, 2012, Narita, Clin Genitourin Cancer, 2019)。術前治療なし(NNA)が15例、術前内分泌療法(NHT)が11例、術前化学内分泌療法(CHT)が44例を含むTMAとなる。術前化学内分泌療法の詳細なプロトコルは12週間のLHRHagonist投与の後、ドセタキセルを30mg/m²週1回6回をエストラサート560mg/日と併用投与し、術後約1カ月に前立腺全摘を行った。上記TMAに関して化学内分泌療法抵抗性に関連すると考えられるステロイド受容体(アンドロゲン受容体, グルココルチコイド受容体, プログステロン受容体, ER)の免疫染色をおこなった。アンドロゲン受容体に関してはc末およびN末を標的とした抗体と新規アンドロゲン受容体シグナル阻害薬耐性に関連するスプライズバリエーションとされているARV7の染色も行った。免疫染色のスコアリングは染色強度を4段階[negative (0), weak (1), moderate (2), and strong (3)], 範囲を5段階[0% (0), <25% (1), <50% (2), <75% (3), and 100% (4)]で評価し, immunoreactivityは強度×範囲でスコア化した。各染色スコアと前治療の関連を群

間比較で、また術前化学内分泌療法群に関して、生化学的再発との関連を統計学的に検討した。

- 2) 前立腺癌細胞と前立腺間質細胞の相互作用を検討するため、細胞株の共培養後のサイトカイン産生能を *in vitro* で検討した。前立腺癌細胞株は PC-3 と DU145 を用いた。また前立腺由来正常間質細胞として PrSC を用いた。Cytometric bead array を用いて共培養培養上清の IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL12p70 を測定した。また前立腺から分泌される前立腺癌増悪関連分子である MIC-1 を siRNA で阻害し、サイトカイン分泌との関連を同時に検討した。また間質細胞同士の相互影響を検討するためマウス脂肪組織由来脂肪前駆細胞との共培養系でもサイトカイン放出能、遊離脂肪酸放出能、MIC-1 発現を解析した。

4. 研究成果

1) TMA 全症例の臨床成績を示す。年齢中央値 66 歳 (53-75 才)、治療前血清 PSA 値は 28.15ng/ml (5.3-90.0) であった。19 (43.2%) 例は cT3 以上で、cN1 が 3 (6.8%) 例であった。治療前 Gleason score は 31 例 (70.4%) が 8 以上で、高リスク因子 (治療前 15 以上、Gleason score primary もしくは secondary に 5 を含む、cT3 のいずれかを含む) の数は 1 個が 20 例、2 個が 14 例、3 個が 10 例であった。病理学的評価は RM1 が 2 (4.5%) 例、pT3 以上が 12 (27.3%) 例、pN1 が 8 (18.2%) 例であった。上記症例と同時期に施行した同等の治療前危険因子を有する症例を含む NNA 群、NHT 群症例を含めた TMA を作成し下記のバイオマーカー発現を免疫染色で評価した。

2) ステロイド受容体関連の 4 組織バイオマーカーの発現と術前治療との関連に関して TMA を用いて検討した (文献 1)。アンドロゲン受容体およびグルココルチコイド受容体は残存癌細胞および間質細胞に発現し、各癌細胞内では核および細胞質に発現した。一方 ER とプロゲステロン受容体は主に間質に発現した (図 3)。ER に関しては間質細胞の核の染色強度を Immunoreactivity score, Intensity, Area をそれぞれ比較した。CHT 群の間質 PR immunoreactivity score は NNA 群 (2.50 ± 0.24 vs. 0.85 ± 0.15 , $p < 0.001$) と有意に高かったが、NHT 群 (2.50 ± 0.24 vs. 1.97 ± 0.36 , $p = 0.220$) と差を認めなかった (表 1)。続いて CHT 群における ER 発現と生化学的再発の関連を検討したが、単変量解析において、ER immunoreactivity score を 2 群に分け、生化学的再発との関連を検討したが、差を認めなかった ($HR = 2.37$, 95% CI 0.84-6.64, $p = 0.101$)。また ARc 末端、ARn 末端の発現比や ARV7 の術前治療による発現強度の違いや術前化学内分泌療法群における生化学的再発との関連は認められなかった。以上の結果より当初考えていた ER 発現と進行前立腺癌化学内分泌療法抵抗生徒の関連は軽度であることが示唆され、前立腺間質と癌増悪の関連を検討するために新たな分子探索の必要性が示唆された。

図3. 前立腺全摘TMAにおけるER α 発現

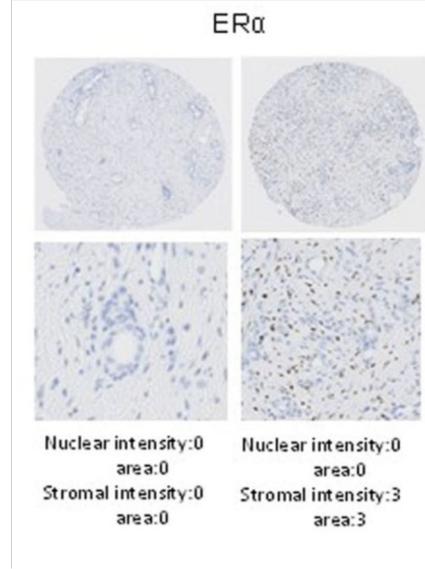


表1. 前立腺全摘TMAにおけるER α 発現と術前治療の関連

				NNT	NHT	CHT	p-value	p value (NNT vs. CHT)	p value (NHT vs. CHT)
ER α	Stromal cells	Nuclear	Area	0.73 \pm 0.12	1.13 \pm 0.16	1.23 \pm 0.09	0.014	0.004	0.606
			Intensity	0.65 \pm 0.11	1.19 \pm 0.18	1.32 \pm 0.10	0.001	<0.001	0.546
			Immunoreactivity score	0.85 \pm 0.15	1.97 \pm 0.36	2.50 \pm 0.24	<0.001	<0.001	0.220

- 3) 上記より前立腺間質と前立腺癌細胞の相互作用を調べるために *in vitro* で細胞株を直接共培養し、6 種類のサイトカイン分泌能を評価した。またすでに我々のこれまでの検討から前立腺癌増悪進展に関連する可能性のある分泌タンパクである MIC-1 が高脂肪食摂取下の前立腺癌増悪・進展に関与する可能性が示されていたため、本分子の癌細胞と間質相互作用への関連も siRNA による阻害により評価した。正常前立腺間質細胞である PrSC を前立腺癌細胞株 PC3 と直接共培養すると培養上清の IL-6 および IL-8 が有意に上昇した。さらに PrSC に recombinant MIC-1 を投与すると IL-6 および IL-8 が同様に有意に上昇した。さらに PrSC と siMIC-1 を導入した PC-3 で直接共培養を行うと、IL-6, IL-8 が PrSC と siCtrl を導入した PC-3 の共培養に比較し有意に低下した。以上より PrSC は PC-3 の MIC-1 上昇を介し、IL-6 および IL-8 などのサイトカイン分泌が制御されている可能性が示唆された (図 4)。

4) さらに前立腺癌による前立腺間質細胞サイトカイン分泌能に対する前立腺周囲脂肪の影響を検討するために13例の前立腺全摘患者から倫理委員会承認のもと、前立腺周囲脂肪(PrAC)を採取し、PC-3、PrSCとの共培養を行った。その結果PrACとの共培養では有意に遊離脂肪酸放出が増加し、PC-3+PrSC+PrAC群で最もIL-8分泌が増加し、PC-3のMIC-1発現依存性であった。以上より、前立腺間質細胞は前立腺周囲脂肪および前立腺癌との交互作用でサイトカイン分泌が上昇し、さらに本機序は前立腺癌内のMIC-1の発現に制御されている可能性が示唆された(図5)。今後間質細胞、脂肪細胞の癌細胞株の機能への影響、関連分子同定を進める予定である。

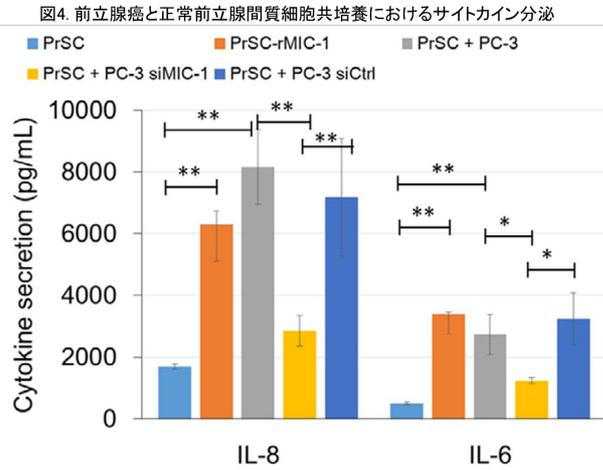
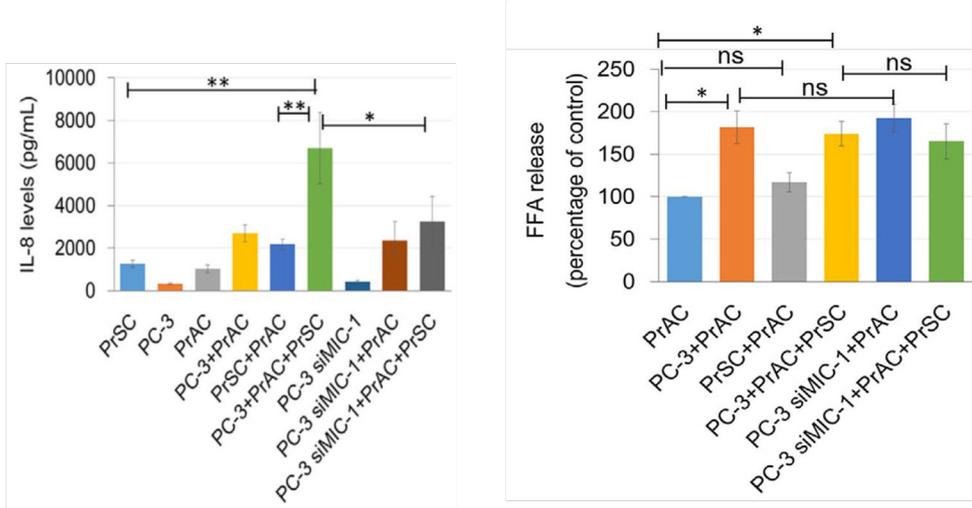


図5. 前立腺癌、培養脂肪細胞と正常前立腺間質細胞共培養における遊離脂肪酸・サイトカイン分泌



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshinori Matsuda, Shintaro Narita, Taketoshi Nara, Huang Mingguo, Hiromi Sato, Atsushi Koizumi, Sohei Kanda, Kazuyuki Numakura, Mitsuru Saito, Takamitsu Inoue, Yuko Hiroshima, Hiroshi Nanji, Shigeru Satoh, Norihiko Tsuchiya, Tomonori Habuchi	4. 巻 20
2. 論文標題 Impact of Nuclear YAP1 Expression in Residual Cancer After Neoadjuvant Chemohormonal Therapy With Docetaxel for High-Risk Localized Prostate Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 20 34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-020-06844-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小泉 淳, 成田伸太郎, 中西広樹, 千葉修治, 神田壮平, 沼倉一幸, 黄 明国, 齋藤 満, 井上高光, 佐藤 滋, 吉岡年明, 羽瀨友則, 佐々木雄彦
2. 発表標題 ホスホイノシタイド(PIPs)プロファイルと前立腺癌の関連検討
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉修治, 成田伸太郎, 佐藤博美, 奈良健平, 神田壮平, 沼倉一幸, 齋藤 満, 井上高光, 佐藤 滋, 羽瀨友則
2. 発表標題 限局性前立腺癌全摘患者における血清LH、FSH、テストステロン値と臨床因子・予後との関連
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------