

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18551

研究課題名（和文）化学内分泌療法抵抗性前立腺癌における癌周囲微小環境によるHippo経路制御の役割

研究課題名（英文）Role of Hippo Pathway Regulation by the Peritumoral Microenvironment in Castration-resistant Prostate Cancer

研究代表者

奈良 健平（Nara, Taketoshi）

秋田大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00801888

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は前立腺癌増悪・進展に対する食事・腸内細菌・脂質代謝・免疫のクロストークに注目しマウスモデルでこの可能性を検証した。結果、飽和脂肪酸・単価不飽和脂肪酸を含む食事は2種類の前立腺癌マウスモデルで肥満を誘導するとともに前立腺癌進展を促進し、特に飽和脂肪酸・単価不飽和脂肪酸を多く含む食事では腸内細菌叢の多様性が増し、特にorders Clostridialesとorder Lactobacillalesの腸内細菌叢の著明な変化を引き起こした。また、これらの腸内細菌変化は腫瘍内のコレステロール、脂質代謝関連分子異常と関連し、前立腺癌進展に関連している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特定の脂質摂取の前立腺癌増悪・進展への分子生物学的関係性が明らかになると、これまで同定されていなかった新規の前立腺癌治療標的発見の足掛かりになるのみならず、食事や肥満といった生活因子や腸内細菌変動による癌治療や癌予防戦略につながる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：We assess the relationship among diet, gut microbiota, lipid metabolism and immune microenvironment during diet induced prostate cancer progression. We found that saturated and/or mono-unsaturated fatty acid promotes prostate cancer progression with alteration of orders Clostridiales and Lactobacillales and modulation of cholesterol/lipid metabolism in prostate tumors.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 癌周囲微小環境 Hippo経路

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、欧米諸国において罹患率の最も高い癌のひとつであり、近年、本邦においてその増加が著しい。1940年代に Huggins 博士がアンドロゲン除去による前立腺癌への治療効果を報告して以来、内分泌療法が前立腺癌治療の根幹であったが、再発・転移性前立腺癌の多くはいずれ内分泌療法抵抗性となり進行する(去勢抵抗性前立腺癌)。去勢抵抗性前立腺癌に対し、タキサン系抗癌剤であるドセタキセルが予後を改善する薬剤として登場し、さらに大規模臨床試験の結果を踏まえ、2010年から相次いで新規内分泌療法であるアピラテロンやエンザルタミド、新規抗癌剤であるカバジタキセルが登場し、本邦でも保険収載の元、使用されている。しかし、実施診療では去勢抵抗性前立腺癌治療薬には交叉耐性が存在し奏功期間も短く、副作用の存在するため、これらに代わる新規治療薬が待ち望まれる。

我々の教室では現在まで進行前立腺癌に対する臨床および基礎的研究を続けてきた (Tsuchiya, J Clin Oncol, 2006, Huang M, Carcinogenesis, 2011, Koizumi A, Nara T, Jpn J Clin Oncol, 2018)。特に進行前立腺癌に対する術前化学内分泌療法の臨床成績を最近報告 (Narita S, Nara T, Clin Genitourin Cancer, 2018) し、同時に化学内分泌療法抵抗性に関する標的分子を同定し報告した (Huang M, Oncogenesis, 2016)。さらに環境因子誘導下の前立腺癌増殖進展機序解明にも取り組んでおり、その中で高脂肪食摂取下前立腺癌増殖マウスモデルに関連する miRNA の網羅的解析を行い、miR-130a およびその下流の cMyc が関与することを見出した (Nara T, Carcinogenesis, 2016)。最近当科で術前化学内分泌療法後前立腺全摘を行う第 II 相前向き試験に登録された患者の全摘標本を用いて、化学内分泌療法抵抗性関連分子同定を試みている。同時にドセタキセル耐性細胞株を複数樹立に成功し、in vitro での関連分子同定を行っている。上記臨床検体や細胞モデルを用いた pilot 研究で、細胞接触や機械刺激を感知し、癌増悪進展や癌幹細胞に関連するとされる Hippo 経路の代表的転写共役因子である YAP の核内発現の重要性を見出している。近年 YAP は様々な癌で高発現することが知られている (Moroishi, Nat Rev Cancer, 2015)。一方、癌増悪進展における癌周囲微小環境の役割は疑う余地がないが (Karlou, Nat Rev Urol, 2010)、当教室でも高脂肪食摂取下前立腺癌増殖進展に脂肪組織、癌組織からの FABP4 や MIC-1 といった分泌タンパクが癌関連線維芽細胞を刺激し、それにより放出されるサイトカインにより癌増殖能、浸潤能、化学内分泌療法抵抗性が刺激されることを報告している (Huang, Oncotarget, 2017, Huang M, Nara T, AUA meeting, Chicago, 2018) 上記のように前立腺癌化学内分泌療法抵抗性には Hippo 経路、癌微小環境がそれぞれ重要な役割を果たすことが我々のこれまでの検討から考えられる。更に近年細胞内 Hippo 経路活性の分子生物学的機序解明が進んでおり、癌周囲微小環境特に細胞外マトリックス (ECM) が Hippo 経路を制御する可能性が複数報告されている (Xu Y, Cancer Res, 2010, Chakraborty, Cancers, 2018)。以上より我々は前立腺癌化学・内分泌療法両治療への抵抗性には癌微小環境に制御された癌細胞内 Hippo 経路活性や癌微小環境における細胞外マトリックスが強く関与していると仮説 (図 1) を立て研究を始めた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は未だ解明されていない前立腺癌化学内分泌療法抵抗性への癌微小環境と Hippo 経路活性の直接的な関連を細胞株、動物モデル、臨床検体を用いて検証することを目的とする。また癌微小環境および細胞外マトリックスと Hippo 経路はそれぞれ癌増悪進展の標的機序となる可能性が指摘されているが両者の直接的な関連を証明した報告は少ない。本研究では前臨床モデルと臨床検体を用いた解析から前立腺癌増悪進展における細胞外マトリックスと Hippo 経路の役割およびそのクロストークを検討することを当初目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は 2 つの研究で構成される。化学療法抵抗性前立腺癌における YAP1 の役割、前立腺癌進展におけるホスファジチルイノシトールの役割である。初めにこれまでの Pilot 研究で関連が示唆された YAP1 と化学療法抵抗性前立腺癌の関連検討である。前治療無し (NNA)、内分泌療法 (NHT)、化学内分泌療法 (CHT) の前治療の異なる 3 群の前立腺全摘組織 210 コア、70 例の tissue microarray を作成し、免疫組織学的染色を用いて、AR、GR、PR、ER、MOB4A、YAP1 の発現を比較した。結果として、YAP1 発現は薬物治療により発現増加する傾向にあり、癌上皮核内 YAP1 高発現は生化学的再発に有意関連した。本結果を発展させるため、前立腺全摘術後の生化学的再発に関連すると考えられ

る共役因子である年齢、術前化学内分泌療法の実施、術前 PSA 値、生検グリソンスコア、拡大リンパ節郭清の有無、pTN stage、病理学的断端陽性を含めた Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析で生化学的再発との関連を検討した。さらに我々が樹立したドセタキセル抵抗性前立腺癌細胞株 22Rv1-DR 細胞を用いて YAP1 阻害後の細胞増殖、アポトーシスおよび細胞周期解析を施行した。YAP1 阻害は siRNA ( siYAP1:SI02662954, Qiagen ) を用いて行い、Allstars Negative Control siRNA をコントロールとした。細胞周期解析は MTT アッセイを用いて行い、アポトーシスおよび細胞周期解析は FACS-Calibur flow cytometry system を用いて行った。続いて当初は細胞外マトリックスや癌周囲微小環境と前立腺癌進展及び Hippo 経路との関連検討を予定していたが、同時期に行われていた同研究室の研究結果より細胞膜成分で重要生理活性をもつイノシトールリン脂質の前立腺癌増悪進展への関連が示唆された ( Koizumi, Narita, Sci Rep, 2019 ) ため、イノシトールリン脂質の癌増悪への関連及び Hippo 経路との関連を検討することに変更した。6 週齢の BALB/c-nu/nu マウスに高脂肪食 ( 脂肪 59.9% ) とコントロール食 ( 脂肪 9.5% ) の食餌をあたえ、LNCaP 前立腺癌細胞株の皮下 xenograft モデルを作成した。14 週齢でと殺し、腫瘍を摘出し、脂質解析や免疫病理学的解析に用いた。同時に血液を採取し ELISA 法を用いて血中蛋白濃度解析に用いた。腫瘍内のイノシトールリン脂質解析に関しては三連四十極質量分析計を用いた選択反応モニタリング法を用いて LC-tandem MS により施行した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 化学内分泌療法後の前立腺全摘症例における生化学的再発の危険因子

単変量解析では年齢、治療前 PSA 値、病理学的 T stage、病理学的 N stage、残存癌上皮の核 AR 染色、核 YAP1 染色が有意に生化学的再発に関連した (  $p = 0.035$ ,  $p = 0.006$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.017$ ,  $p = 0.033$ , 図 1 )。

図 1. 術前化学内分泌療法後の生化学的再発に関する単変量及び多変量解析

Variables	Univariate			Multivariable		
	HR	95%CI	P value	HR	95%CI	P value
Age	0.92	0.85-1.00	0.035			
Completion of NAC (modify vs complete)	0.84	0.35-2.02	0.689			
Baseline PSA level (continuous)	1.02	1.01-1.04	0.006	1.03	1.01-1.05	0.010
Gleason score at diagnosis ( $\geq 8$ vs $\leq 7$ )	2.00	0.74-5.38	0.169			
Extended lymph node dissection (yes vs no)	1.51	0.60-3.81	0.382			
pT ( $\geq 3$ vs $\leq 2$ )	4.40	1.91-10.13	< 0.001	1.13	0.30-4.22	0.854
pN (+ or 0)	4.60	1.90-11.11	0.001	3.94	1.06-14.62	0.040
Resective margin (positive or negative)	2.00	0.46-8.67	0.355			
Nuclear expression of AR in epithelial cell (High vs low)	3.00	1.22-7.35	0.017	0.98	0.32-3.02	0.971
Nuclear expression of GR in epithelial cell (High vs low)	1.82	0.79-4.18	0.161			
Nuclear expression of ER $\alpha$ in stromal cell (High vs low)	2.37	0.84-6.64	0.101			
Nuclear expression of PR in stromal cell (High vs low)	0.45	0.20-1.02	0.054			
Nuclear expression of YAP in epithelial cell (High vs low)	2.44	1.08-5.55	0.033	3.32	1.32-8.37	0.011
Cytoplasmic expression of MOB4A in epithelial cell (High vs low)	1.73	0.77-3.91	0.190			

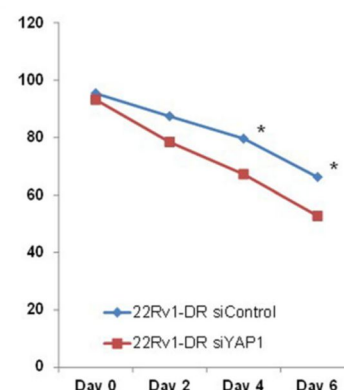
NAC neoadjuvant treatment, PSA prostate specific antigen, AR androgen receptor, GR glucocorticoid receptor, ER estrogen receptor, PR progesterone receptor

多変量解析では治療前 PSA 値、病理学的 N +、核 YAP1 高染色が生化学的再発の独立した危険因子であった ( HR = 1.03, 95% CI 1.01-1.05, HR = 3.49, 95% CI 1.06-14.62, HR = 3.32, 95% CI 1.32-8.37 )。以上より化学内分泌療法後前立腺全摘施行症例において摘出前立腺の残存癌上皮 YAP1 発現高は生化学的再発の独立した危険因子であることが示唆された。

##### 2) ドセタキセル抵抗性細胞株における YAP1 阻害による細胞機能評価

続いて当科で樹立したドセタキセル抵抗性細胞株を用いて YAP1 阻害の細胞増殖、アポトーシス、細胞周期に与える影響を検討した。control siRNA では siRNA 非導入細胞と比較し YAP1 発現が同等であるのに対し、YAP1 siRNA を導入すると経時的に YAP1 発現が低下し、24 時間から 48 時間で 60~70% の発現低下が得られることを確認した。MTT アッセイでは投与後 4 日および 6 日目に有意に YAP1 阻害群で細胞増殖が抑制されることが示された (  $p = 0.038$ ,  $p = 0.049$ , 図 2 )。細胞周期解析による subG0-G1 期率により 24 時間および 48 時間後のアポトーシスの有無を比較すると両群で差を認めなかった (  $p = 0.439$ ,  $p = 0.613$  )。さらに 24 時間および 48 時間後において G0/G1, S, G2 期率に 2 群で

図 2. YAP1 阻害によるドセタキセル抵抗性前立腺癌細胞株の増殖変化

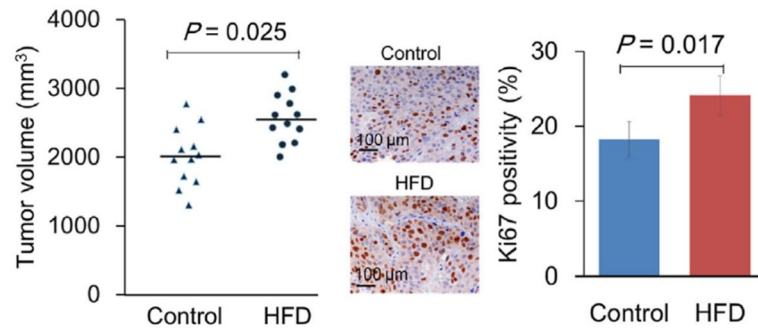


いずれも差を認めなかった。以上より YAP1 はアポトーシスや細胞周期によらず化学療法抵抗性前立腺癌の増殖に関連している可能性があり、さらなる検討が望まれる。

### 3) 高脂肪食摂取による前立腺癌 xenograft モデルの増殖促進

高脂肪食摂取群はコントロール群に比較し有意に細胞増殖が更新し、ki67 陽性細胞率が有意に高脂肪食摂取群で高かった (24.1% vs. 18.3%,  $p = 0.017$ , 図 3)。また摘出 xenograft 腫瘍のリン酸化 AKT (Ser473, Thr308) と FASN 発現が高脂肪食群で亢進していた。以上より高脂肪食は前立腺癌細胞株 xenograft の細胞増殖を促進し、PI3K-AKT 経路活性や FASN 発現が関与する可能性が示唆された。

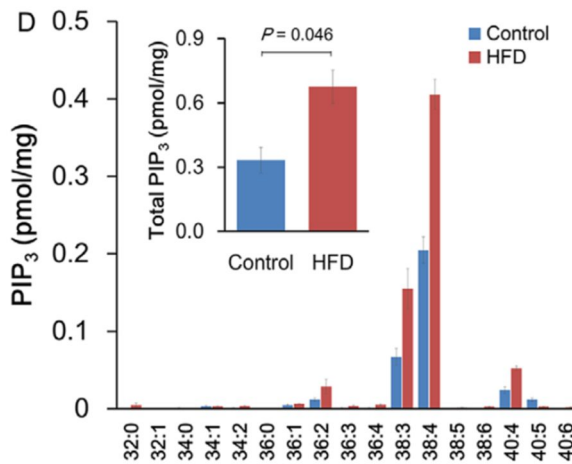
図3. 食事によるLNCaP xenograft腫瘍増殖の違い



### 4) 食事による腫瘍増殖と腫瘍内のホスファチジルイノシトール発現

高脂肪食摂取群およびコントロール群に関して、異なるアシル基を有するそれぞれ 17 種類の PI, PIP1, PIP2, PIP3 を測定した。総 PI, PIP1, PIP2 はいずれも 2 群間で差は認めなかった ( $28.2 \pm 4.48$  vs.  $34.8 \pm 9.35$  pmol/mg;  $0.81 \pm 0.07$  vs.  $0.88 \pm 0.05$  pmol/mg;  $3.18 \pm 0.17$  vs.  $3.31 \pm 0.25$  pmol/mg)。一方、総 PIP3 は有意に高脂肪食群で上昇 ( $0.33 \pm 0.06$  vs.  $0.69 \pm 0.14$  pmol/mg,  $p < 0.05$ ) し、特に C38:4, C38:3, C40:4 PIP3 で発現変化が著明であった (図 4)。以上より高脂肪食摂取は腫瘍内で特定のホスファチジルイノシトール発現変化を伴い腫瘍増殖が促進されていると考えられた。また Human Fatty Acid Metabolism PCR Array kit (Qiagen) を用いて 84 種類の脂肪酸代謝関連遺伝子発現を二群間で比較すると高脂肪食群で 2 倍以上上昇する 17 遺伝子と、2 倍以上低下する 20 遺伝子が同定された。特に長鎖脂肪酸合成に関与する FASN が高脂肪食群で有意に上昇し、FASN 特異的阻害薬である cerulenin を 2 種類の前立腺癌細胞株 (LNCaP, C4-2) に投与すると PI は変化せず、PIP1, PIP2, PIP3 が著明に減少した。以上より高脂肪食は前立腺癌細胞内の FASN、イノシトールリン脂質、PI3K/AKT 経路を介して細胞増殖に関与している可能性が示された。現在同腫瘍を用いて Hippo 経路関連遺伝子の変化を mRNA および蛋白レベルで検討している。

図4. 高脂肪食摂取下前立腺癌増殖における腫瘍内PIP3発現



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2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 Nanjo, 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 302
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 -

1. 著者名 Huang M, Koizumi A, Narita S, Nakanishi H, Sato H, Kashima S, Nara T, Kanda S, Numakura K, Saito M, Satoh S, Nanjo H, Sasaki T, Habuchi T.	4. 巻 2
2. 論文標題 Altering phosphoinositides in high-fat diet-associated prostate tumor xenograft growth.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 MedComm	6. 最初と最後の頁 756-764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mco2.89	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Huang, M., Narita, S., Koizumi, A., Nara, T., Numakura, K., Satoh, S., Nanjo, H., Habuchi, T.
2. 発表標題 HFD leads to metabolic modification of prostate cancer promoting stroma by the upregulation of MIC-1
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Narita, S., Fujiyama, N., Yamamoto, R., Koizumi, A., Kikuchi, A., Sagehashi, R., Kobayashi, M., Sato, H., Nara, T., Kanda, S., Numakura, K., Saito, M., Inoue, T., Sato, S., Habuchi
2. 発表標題 The impact of zygosity and supertypes of HLA genotypes on the clinical outcomes of patients with genitourinary cancers treated with anti-PD-1 drugs.
3. 学会等名 The 115th Annual Meeting of the American Urological Association（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Narita, S., Nara, T., Kanda, S., Numakura, K., Saito, M., Inoue, T., Tsuchiya, N., Satoh, S., Nanjyo, H., Mitsuzuka, K., Koie, T., Kawamura, S., Ohyama, C., Tochigi, T., Arai, Y., Habuchi, T.
2. 発表標題	Outcomes of neoadjuvant chemohormonal therapy with complete androgen blockade, followed by treatment with docetaxel and estramustine phosphate before radical prostatectomy in patients with high-risk localized prostate cancer: A propensity-score matching analysis.
3. 学会等名	The 115th Annual Meeting of the American Urological Association (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Koizumi, A., Narita, S., Nakanishi, H., Nara, T., Kanda, S., Numakura, K., Mingguo, H., Saito, M., Inoue, T., Satoh, S., Yoshioka, T., Habuchi, T., Sasaki, T.
2. 発表標題	Increased fatty acyl saturation of phosphatidylinositol phosphate in prostate cancer progression.
3. 学会等名	The 115th Annual Meeting of the American Urological Association (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Sato, H., Narita, S., Yamamoto, R., Koizumi, A., Nara, T., Kanda, S., Numakura, K., Saito, M., Inoue, T., Satoh, S., Yoshioka, T., Habuchi, T.
2. 発表標題	Fish -oil diet attenuates prostate cancer development with systematic inflammation protection and gut microbiota alteration in a Pten-deficient mouse model.
3. 学会等名	The 115th Annual Meeting of the American Urological Association (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	佐藤博美, 成田伸太郎, 山本竜平, 小泉 淳, 奈良健平, 神田壮平, 沼倉一幸, 齋藤 満, 井上高光, 佐藤 滋, 吉岡年明, 羽瀨友則
2. 発表標題	2種の免疫応答性マウスモデルにおける特定の脂肪食が前立腺癌発症・進展に及ぼす影響
3. 学会等名	第79回日本癌学会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名 Takahashi, S., Narita, S., Fujiyama, N., Kashima, S., Yamamoto, R., Koizumi, A., Nara, T., Kanda, S., Numakura, K., Saito, M., Inoue, T., Sato, S., Habuchi, T.
2. 発表標題 泌尿器癌に対する抗PD-1抗体の治療効果とgermline HLA statusの関連検討
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会
4. 発表年 2020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
---------	---------