

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2008～ 2009  
課題番号：20791126  
研究課題名 (和文) 前立腺癌における癌幹細胞同定と解明  
研究課題名 (英文) Investigation of prostate cancer stem cells  
研究代表者 三木 淳 (Miki Jun)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00328361

## 研究成果の概要 (和文)：

近年の癌研究において、癌組織が正常の幹細胞システムに似た階層構造によって成り立っている“癌幹細胞 (cancer stem cell)”という概念が注目されている。

In vitro 実験として、初代培養細胞に hTERT 遺伝子導入を行い、継代培養可能な細胞株樹立、その細胞学的特性について検討した。また、アンドロゲン依存性前立腺癌のマウスモデル JDCaP を用いて、heterogenous な癌組織から癌幹細胞様細胞群を分離、これら細胞の幹細胞様性質について検討した。今後、より詳細な研究、考察が必要なのは言うまでもないが、我々の癌幹細胞の実験モデルが、癌幹細胞研究において重要な役割を果たすものと確信している。

## 研究成果の概要 (英文)：

Recent evidence supports the cancer stem cell theory, that is, that tumors arise from cells termed cancer stem cells (CSC) or tumor-initiating cells that have the ability of self-renewal and are responsible for maintaining the tumor. We established primary culture cell lines with Lentivirus vector from the specimen of prostatectomy.

We analyzed the characterization of cells from JDCaP which is a novel PCa xenograft model. These cells consisted of heterogeneous population, and they may contain the stemness as CSC. These novel *in vitro* and *in vivo* models may offer useful tools for the study of the biological features and functional integration of normal and cancer stem cells in prostate.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床学・泌尿器科学

キーワード：①前立腺癌、②癌幹細胞

## 1. 研究の背景

近年の癌研究において、癌組織が正常の幹細胞システムに似た階層構造によって成り立っている癌幹細胞 (cancer stem cell) という概念が注目されている。癌組織の中からこの癌幹細胞に相当する細胞を探し出すことは、癌化、再発、転移のメカニズムを知ることにより大きく貢献する。特に、進行性の前立腺癌に対する現行のホルモン療法には耐性があり、癌幹細胞研究はこうしたホルモン療法に対する再燃癌のメカニズム解明はもちろん、新たな癌治療開発にも役立つ重要な研究である。

## 2. 研究の目的

1. 本研究では、第一に前立腺癌細胞株から CD133 陽性細胞を遊離し、免疫不全マウスに移植、CD133 陽性細胞が *in vivo* で高い腫瘍形成能を持つかどうかを検討する。さらに、CXCR4 陽性細胞と転移の係わりを *in vivo* で検討。そして、前立腺癌転移部位での免疫組織学染色や担癌患者血液内の癌細胞をフローサイトメトリー解析により、実際の前立腺癌患者でこれらマーカーの発現、働きを考察する。これらの実験により、新しい癌化のメカニズム解明はもちろん、癌幹細胞をターゲットにした新しい癌治療法を臨床応用できる可能性がある。

前立腺癌において AR 陰性細胞がホルモン耐性の機序に係わっているという概念は古くからあるが、実際にこれら細胞が同定され癌幹細胞の存在が報告されたのはここ数年であり、現在癌研究で最も注目されている分野の一つである。この癌幹細胞の概念は、癌化のメカニズムはもちろん、現在の主流であるホルモン治療を根本的に見直す、癌治療に極めて重要なブレイクスルーをもたらす可能性を秘めている。

## 3. 研究の方法

(1) hTERT (human telomerase catalytic subunit) 組み込みレンチウイルスベクターの作成

前立腺癌原発組織からの自然不死化細胞株樹立報告はこれまでない。そこで、hTERT を用いて癌細胞株を樹立することを試みた。

(2) 前立腺癌由来細胞株の樹立

東京慈恵会医科大学附属病院で得られた前立腺手術摘除検体から、前立腺癌組織を一部摘出。

初代培養にて前立腺癌細胞を培養、上記 hTERT 遺伝子導入法により不死化を図り、前立腺癌細胞株を樹立する。

(3) 樹立前立腺細胞株の特徴精査

樹立した細胞株の増殖能、コロニー形成能、前立腺上皮の分化マーカーなどを解析することで、樹立細胞株固有の特徴や細胞株が前立腺上皮由来であることを把握する。

- 細胞増殖曲線 (倍化時間)
- アガロースゲル内コロニー生成能
- マトリゲル内 3 次元培養
- Migration invasion assay

各種分化マーカーの発現 (CK5、18、CD44、34βE12、AR、PSA、PAP など) を、ウェスタンブロット、RT-PCR、フローサイトメトリー前立腺癌細胞株から癌幹細胞と非癌幹細胞を同定、分離。

今回の研究では、血液腫瘍、脳腫瘍、大腸癌、前立腺癌などの複数の癌において癌幹細胞マーカーとして報告された CD133 に注目した。モノクローナルな CD133 抗体を用いて細胞を標識し、フローサイトメトリー法にて同定、分離する。

(4) In vivo モデルにおける癌幹細胞同定の試み

我々が皮膚転移前立腺癌患者から樹立した動物モデルである JCaP (The Prostate, Kimura T. 2009 July, 69:1660-1667) を用いて、その構成される細胞群の幹細胞様性質について、コロニー形成能、分裂速度、表現型などを検討した。

4. 研究成果

(1) レンチウイルスベクター作成

遺伝子導入方法としてのレンチウイルスベクターを作成した。レンチウイルスは非分裂細胞への感染が可能であり、プロウイルスゲノムが宿主染色体に取り込まれるために、外来遺伝子が安定に持続発現することが確認できた。

(2) 初代培養細胞株の樹立

当施設で前立腺癌患者に対して施行された前立腺全摘標本より、初代培養細胞を獲得。上記レンチウイルスベクターを用いて、hTERT 遺伝子を導入。通常 2、3 継代で死滅する前立腺初代細胞であるが、約 15 代まで継代可能な細胞株を樹立した。

(3) 樹立細胞株の特徴精査

増殖曲線評価において、倍加時間は約 28 時間。アガロースゲル内でのコロニー形成能を認め、腫瘍形成能が示唆された (図 1)。Matrigel invasion assay では、コントロールである正常上皮由来細胞に比べ、有意に浸潤率が高く、悪性細胞の浸潤能所見が示唆された (図 2、3)。また、分化能評価のためのマトリゲル内の 3 次元培養実験でも branch を伴った sphere を認め、分化能の保持を示唆する結果となった (図 4)。

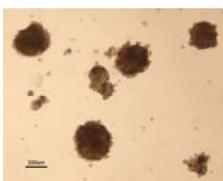


図 1

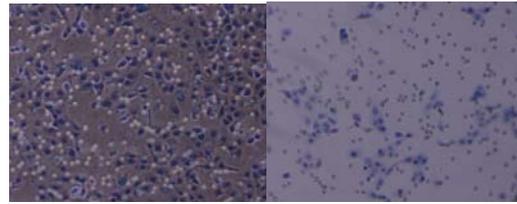


図 2 (左：正常上皮細胞、右癌由来細胞)

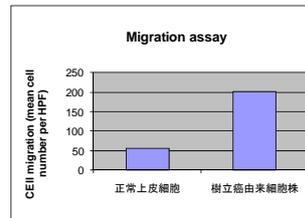


図 3



図 4

(4) In vivo モデルを用いた癌幹細胞実験  
JCaP の腫瘍組織を摘出、single cell preparation を行った後、幹細胞マーカーである CD133 の発現を調べた。フローサイトメトリー、蛍光免疫染色にて、非常に少ない割合 (0.5%以下) であるが、CD133 陽性細胞群が存在するのを確認することができた (図 5)。さらに、CD133 陽性細胞の表現型を調べた所、 $\alpha 2 \beta 1$  integrin+/34  $\beta$  E12+/CK18+/p63-/AR-/PSA-であった (図 6)。この表現型は、基底細胞の表現型と一致しており、過去の報告と同様であった。

これら細胞群を Sphere culture method で培養すると、sphere を形成、single cell からでも数代にわたって継代することができた。さらに、CD133 の発現率をみると、monolayer culture に比べ、Sphere culture での細胞群

の有意に高くなっており、sphere culture コンディションでの CD133 陽性細胞群が癌幹細胞様の性質を持っていることが示唆された。

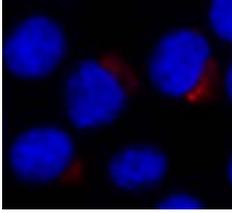


図 5 (red:CD133, blue:Hoechst)

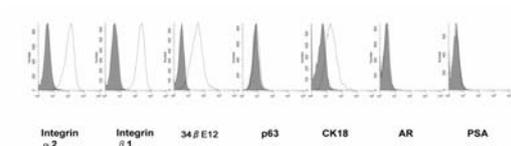


図 6

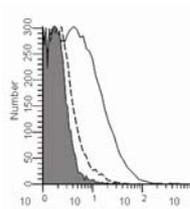


図 7 (グレー:isotype, 点線:monolayer, 実線:sphere culture)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Investigations of prostate epithelial stem cells and prostate cancer stem cells.

Jun Miki

Int J Urol. 17(2):139-47. Epub 2010

[学会発表] (計 1 件)

Identification of Putative Stem Cell Markers, CD133 and CXCR4, in Prostate Cancer. Jun Miki

1<sup>st</sup> World Congress on Controversies in Urology (CURy) in Barcelona, Spain, January 31-February 3, 2008

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 淳 (Miki Jun)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 00328361