

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11638

研究課題名(和文)NK細胞と前立腺がん幹細胞の相互作用に着目した新たな前立腺がん予防法の構築

研究課題名(英文) Establishment of a new preventive strategy based on the interaction of NK cells and prostate cancer stem cells

研究代表者

矢野 友啓 (Yano, Tomohiro)

東洋大学・健康スポーツ科学部・教授

研究者番号：50239828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：NK細胞が選択的にがん幹細胞を排除するという形質に着目し、前立腺がんの予防及び治療法構築の可能性を検討した。前立腺がんの予防法に関する検討ではホルモン依存性前立腺がん幹細胞に対して、NK細胞はTRAIL/DR5経路を特異的に活性化することにより、また、治療法に関する検討では、ホルモン非依存性前立腺がん幹細胞に対して、NK細胞は活性化受容体経路の1つであるNKG2D/MICA/MICB経路を特異的に活性化することで、各々前立腺がん幹細胞を除去できる可能性が示された。ただ、悪性度がより高いCRPC細胞では免疫チェックポイントが活性化され、NK細胞の殺細胞効果が脆弱化されていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在罹患患者数が増加している前立腺がんはその予防法と並び、治療再発後のホルモン非依存性(CRPC)の前立腺がんの治療法の開発が急務である。本研究では前立腺がん幹細胞を標的としてNK細胞が特異的にホルモン依存性及びホルモン非依存性前立腺がん幹細胞を除去する可能性を示し、NK細胞が前立腺がん幹細胞を特異的に除去できるという性質に基づいた、新たな前立腺がん予防・治療法の可能性が示され、今後NK細胞のこの性質を強化する方法論を構築することが、新たな前立腺がん予防治療法の構築につながると推測される。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the phenotype that NK cells selectively recognize and eliminate cancer stem cells, we investigated the possibility of developing prevention and treatment methods for prostate cancer, based on this phenotype in NK cells. In study on prostate cancer prevention approach, NK cells specifically activated the TRAIL/DR5 pathway against hormone-dependent prostate cancer stem-like cells, and in study on treatment approach, hormone-independent prostate cancer stem-like cells NK cells specifically activated the NKG2D/MICA/MICB pathway, which is one of the activation receptor pathways, for prostate cancer stem-like cells (CRPC), respectively. These results strongly suggested that NK cells could specifically eliminated hormone-dependent and independent prostate cancer stem-like cells. However, it was shown that immune checkpoints are activated in CRPC cells, which are more malignant, and the cell-killing effect of NK cells is weakened.

研究分野：癌病態制御学

キーワード：前立腺がん幹細胞 NK細胞 殺細胞効果 TRAIL/DR5 NKG2D MICA/MICB 免疫チェックポイント

## 1. 研究開始当初の背景

近年の日本において、食事の欧米化(高脂肪及び高たんぱく食化)に伴い、食事からのコレステロールの摂取量が増加し、コレステロールを素材に合成される男性ホルモンの血中レベルが増加傾向にあり、この増加が一因となって、男性ホルモンが発がん促進因子として作用する前立腺がんの発生率が爆発的に増加している。したがって、現代日本において、この増加の一途をたどる前立腺がんの有効な予防及び治療法を構築することは急務といえる。

原発性前立腺がんの治療予後は非常に高く、5年生存率は100%に近いが、その理由として、原発性前立腺がんは悪性度が低く、抗男性ホルモン療法が非常に有効なため、前立腺がん細胞の増殖制御がほぼ完璧に実施できるため、がん細胞の浸潤、転移を抑制できる。しかし、原発性前立腺がんを治療後に再発した多くの症例では、男性ホルモンに非依存的に増加する、いわゆる去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)に形質が変化し、抗男性ホルモン療法に抵抗性を示すと同時に、既存の化学療法等にも耐性を示し、治療が困難になり、死亡リスクが増大する。さらに、CRPCが進行し、最終段階では前立腺上皮とは全く形質が異なる神経内分泌型の形質を持つ非常に悪性度の高いがんに移行し、より治療が困難になることが報告されている。したがって、前立腺がんの発生制御には、前立腺がんの発生リスクを抑制すると同時に、CRPCに有効な新規治療法を構築することが、前立腺がんの完全治療には必要不可欠といえる。

## 2. 研究の目的

本研究では、NK細胞ががん幹細胞を比較的選択的に認識し、排除する性質を利用して、前立腺がん幹細胞を標的とした新規前立腺がん予防及び治療法を構築できる可能性を検証することを目的とした。そのために、ヒト由来のNK活性を持つNK様細胞株を用いて、ホルモン依存性前立腺がん細胞株とホルモン非依存性前立腺がん細胞株から三次元培養法を用いて形成させたtumorsphereから分離した未分化な形質を有する前立腺がん幹細胞と共培養し、その殺細胞効果とその殺細胞効果に關与するシグナル系を解析し、その殺細胞効果に關与するシグナル分子を特定し、最終的に前立腺がん幹細胞を標的としたNK細胞を用いた前立腺がん予防及び治療法構築の可能性を探った。

## 3. 研究方法

NK細胞としてヒトNK様細胞株KHYG-1、前立腺がん細胞としてアンドロゲン依存性ヒト前立腺がん細胞株LNCaP及びアンドロゲン非依存性前立腺がん細胞株PC3を使用した。すでに当研究室で使用実績があるがん幹細胞分離用培地を用いて、1週間3次元培養後に形成されたtumorspheroidを分離し、がん幹細胞性評価として、がん幹細胞性マーカー(CD24、CD44、CD133、SOX2、Oct3/4)の遺伝子発現レベルをqRT-realtime PCR法で測定し、FACS解析でCD44の細胞表面での発現を定量し、幹細胞性を確認後、実験に供した。また、各がん細胞ないしはがん幹細胞をそれぞれNK細胞と共培養した後の細胞生存活性をWST-8で、生細胞の確認をCVでそれぞれ評価した。

脱顆粒経路とはNK細胞の活性化受容体とがん細胞の活性化リガンドが結合することで開始される傷害経路である。そこで、各がん細胞におけるNK細胞の脱顆粒経路の開始に必須であるNK細胞活性化リガンドの発現をFACS、qRT-real time PCRで解析した。また、NK細胞のがん幹細胞傷害がどれだけNK細胞活性化受容体NKG2Dに依存しているか評価するために、中和抗体を用いてNKG2Dをブロックした条件下で細胞生存活性の評価と生細胞数の確認を実施した。また、脱顆粒経路による細胞死誘導を確認するために、LDHアッセイを行った。

デスレセプター経路とはNK細胞の殺細胞因子TRAILとがん細胞のデスレセプター( TRAIL受容体)が結合して開始される傷害経路である。本研究では、がん細胞ないしはがん幹細胞のデスレセプター発現をFACS、qRT-real time PCRで解析した。また、各細胞にTRAILを処理し、細胞生存活性の評価と生細胞の確認を実施し、TRAIL経路の活性を評価した。

## 4. 研究成果

前立腺がん予防モデルとして、ホルモン依存性前立腺がん細胞(LNCaP)を用い、前立腺がん治療モデルとして、ホルモン非依存性前立腺がん細胞(PC3)をそれぞれ用い、3次元培養法で濃縮した2種類の前立腺がん幹細胞を用いて、NK細胞の前立腺がん幹細胞傷害効果を評価した。また、NK細胞の前立腺がん幹細胞傷害効果に、NK細胞2大細胞傷害経路である脱顆粒経路とデスレセプター経路(TRAIL依存性)のどちらが関わるのかを解析した。

まず、前立腺がん予防に関する研究では、NK様細胞株KHYG-1がLNCaP幹細胞を傷害するかを評価すると同時に、その経路の解明を行った。LNCaP親細胞(LN)およびLNCaP幹細胞(LN-stem)それぞれをKHYG-1と24・48・72時間共培養後に細胞生存活性を測定したところ、LNと比較してLN-stemの方が細胞生存活性は有意に低下していた。また、CV染色にてKHYG-1と24時間共培養後のLNおよびLN-stemの様子を観察した所、LNは細胞が残存していたのに対しLN-stemはほとんど細胞が残存していなかった。この2つの結果から、

LNCaP 幹様細胞は LNCaP 親細胞細胞よりも NK 細胞の傷害を受けやすいことがわかった。なぜ NK 細胞が LNCaP 幹様細胞を優先的に傷害するのかを明らかにするため、脱顆粒経路の開始に重要な NKG2D-NKG2DL の発現を評価した。NKG2D は、感染またはがんなどのゲノムストレスの結果として細胞ストレス中に NKG2DL (MICA/B、ULBP-1/2/3/4/5/6) が誘導されるため、形質転換細胞および感染細胞を検出・排除するための主要な認識受容体である。LNCaP における NKG2DL の mRNA 発現は、LN よりも LN-stem の方が高く、MICA/B、ULBP-1/2 も有意に高発現していた。また、FACS による NKG2DL 細胞表面発現を評価した所、MICA/B は LN-stem に高発現していたが、ULBP-1、ULBP-2/5/6 に差は見られなかった。したがって、NKG2D と MICA/B が NK 細胞の前立腺がん幹様細胞標的に関連すると推測された。次に、LN および LN-stem それぞれと共培養後の KHYG-1 の活性化受容体の mRNA 発現を解析した。興味深いことに、LN-stem と共培養した KHYG-1 の NKG2D の mRNA 発現が、単独培養した KHYG-1 と比較して有意に上昇していた。NK 細胞は活性化するとサイトカインを分泌し、そのサイトカインが他の NK 細胞や免疫細胞の機能を向上させることが知られているので、それにより、今回も LN-stem との共培養によって産生されたサイトカインを NK 細胞が受け取り、さらに活性化された NKG2D の発現上昇が促された可能性が示された。また、LN および LN-stem との共培養後の KHYG-1 の NKp30、NKp44 発現に変化はなかったので、NK 細胞の脱顆粒による細胞傷害は NKG2D-MICA/B が NK 細胞のがん幹様細胞標的に関わると予測できた。そこで、NKG2D の中和抗体を KHYG-1 に施し、LN および LN-stem それぞれと共培養後の細胞生存活性を評価したが、KHYG-1 を NKG2D 中和抗体処理しても、LN および LN-stem 両細胞の細胞生存活性の低下に影響せず、MICA/B の細胞表面発現および mRNA とは相反する結果となった。次に、NK 細胞の LNCaP 幹様細胞傷害機構におけるデスレセプター経路 (TRAIL 依存性) の関与を検討した。LN および LN-stem に TRAIL を各濃度で処理し、細胞生存活性測定を行なった結果、TRAIL は濃度および時間依存的に LN および LN-stem の細胞生存活性を低下させ、また、TRAIL 処理により LN よりも LN-stem の生存活性が有意に抑制された。この TRAIL 処理により LN および LN-stem の細胞生存活性低下はアポトーシス誘導によると推測された。これらの結果から、TRAIL 処理による LN および LN-stem の細胞生存活性の低下はアポトーシスによるものであり、LN よりも LN-stem の方が TRAIL によるアポトーシスが誘導されやすいことが判明した。この TRAIL によるがん細胞間の細胞死の違いの主因は、TRAIL が結合するレセプターの違いに依存していることが知られている。TRAIL はデスレセプター DR4 および DR5 に結合し、デスドメイン相互作用を介して、Fas 関連タンパク質デスドメイン (FADD) が動員され、その下流のカスパーゼカスケードの活性化を引き起こし、アポトーシス細胞死を引き起こす。本研究で使用した LNCaP 幹様細胞では、デスレセプターである DR5 の mRNA 発現と細胞表面発現が高くなっていった。以上のことから、LNCaP 幹様細胞が NK 細胞によって優先的に傷害され、その傷害は TRAIL-DR5 を起点とするデスレセプター経路に依存することが示された。LNCaP はこれまで、TRAIL 耐性の細胞であると報告されてきたが、LNCaP 幹様細胞は NK 細胞の TRAIL 感受性であるという非常に興味深い結果が得られた。

続いて、前立腺がん治療に関する研究では、NK 様細胞株 KHYG-1 がホルモン非依存性前立腺がん細胞 (PC-3) 幹様細胞を傷害するか、また、その傷害経路の解明を行なった。NK 様細胞株 KHYG-1 が PC-3 幹様細胞を傷害するかを評価するため、PC-3 親細胞 (PC) および PC-3 幹様細胞 (PC-stem) を、それぞれ KHYG-1 と 12 時間共培養後に細胞生存活性を測定したところ、PC と比較して PC-stem の方が細胞生存活性は有意に低下していた。また、CV 染色にて KHYG-1 と 24 時間共培養後の PC および PC-stem の様子を観察した所、PC は細胞が残存していたのに対し、PC-stem はほとんど細胞が残存していなかった。この 2 つの結果から、PC-3 幹様細胞は PC-3 親細胞よりも NK 細胞の傷害を受けやすいことがわかった。では、なぜ NK 細胞が PC-3 幹様細胞を優先的に傷害するのかを明らかにするため、脱顆粒経路の開始に重要な NKG2D-NKG2DL の発現とその脱顆粒の実行について評価を行なった。その結果、PC よりも PC-stem において、MICA/B および ULBP-2 の mRNA 発現が有意に高くなっていった。また、FACS による細胞表面発現解析でも、PC-stem において MICA/B が高発現していることを確認した。しかし、PC と PC-stem 上の ULBP-1 または 2/5/6 発現に差は見られなかった。したがって、NKG2D と結合親和性が高い NKG2DL は MICA/B であり、MICA/B の発現上昇は NK 細胞による傷害への過重性に直結する可能性が示された。一方、NK 細胞はパーフォリンを用いて、標的細胞の細胞膜に孔を形成し、そこからグランザイムを注入し細胞死を誘導することが知られているので、この経路の関与を検討するために、LDH アッセイによって、PC-3 細胞に対する NK 細胞の細胞毒性を評価した。その結果、PC と PC-stem をそれぞれ KHYG-1 と共培養すると、PC-stem の LDH 産出量が増加した。この結果から、NK 細胞は、PC-stem に対して脱顆粒 (パーフォリン/グランザイム) 経路によって細胞死誘導を引き起こす可能性が高まった。NK 細胞の脱顆粒による細胞傷害は NKG2D が NKG2DL を受容することでスタートする。そのため NKG2D-NKG2DL が NK 細胞のがん幹様細胞標的に関わるとすれば、NKG2D 中和抗体によって NK 細胞の細胞傷害活性は弱まるはずである。そこで、NKG2D の中和抗体を KHYG-1 に施し、PC および PC-stem それぞれと共培養後の細胞生存活性を測定した (NK 細胞と共培養しないがん細胞を control、control 抗体群と共培養したがん細胞を con 抗体 NK、NKG2D 抗体群と共培養したがん細胞を NKG2D 抗体 NK と表現する)。PC では control と比較して、con 抗体 NK 群と NKG2D 抗体 NK 群の両方で細胞生存活性の有意な低下が確認された。また、con 抗体

NK と NKG2D 抗体 NK の細胞生存活性に有意な差は見られなかった。一方、PC-stem では、control と比較して、con 抗体 NK のみで生存活性の有意な低下が確認された。また、control と NKG2D 抗体 NK の間に有意な差は無く、NKG2D 抗体 NK と比較しても、con 抗体 NK の細胞生存活性は有意に低下していた。NK 細胞が PC-stem に対して脱顆粒による傷害を実行するか確かめるために、NK 細胞を PC および PC-stem それぞれと共培養後の上清中のパーフォリン濃度を測定した。その結果、PC と NK 細胞を共培養したときよりも、PC-stem と NK 細胞を共培養したときの培養上清の方がパーフォリンの濃度は高くなっていた。一方、TRAIL 経路の関与は認められなかった。これらの結果から、NK 細胞は PC よりも PC-stem に対して脱顆粒を行なう機会が多いと考えられた。以上の結果から、PC-3 幹様細胞は MICA/B を高発現するため NK 細胞に認識されやすく、NKG2D-MICA/B を介した脱顆粒経路による傷害を受けやすいと考えられた。

以上の成果をまとめると、NK 細胞の前立腺がん幹様細胞を標的とした新規前立腺がん予防及び治療法構築の可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Endoh D, Ishii K, Kohno K, Virgona N, Miyakoshi Y, Yano T, Ishida T.	4. 巻 44
2. 論文標題 CHEMORESISTANCE RELATED TO HYPOXIA ADAPTATION IN MESOTHELIOMA CELLS FROM TUMOR SPHEROIDS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Exp Oncol	6. 最初と最後の頁 121-125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-2.18045.	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 Seki T, Shimizu Y, Ishii K, Takahama Y, Kato K, Yano T.	4. 巻 11
2. 論文標題 NK Cells Can Preferentially Target Prostate Cancer Stem-like Cells via the TRAIL/DR5 Signaling Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom11111702	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 Sato A, da Fonseca IIM, Nagamine MK, de Toledo GF, Olio R, Hernandez-Blazquez FJ, Yano T, Yeh ES, Dagli MLZ.	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of Alpha-Connexin Carboxyl-Terminal Peptide (αCT1) and Bowman-Birk Protease Inhibitor (BBI) on Canine Oral Mucosal Melanoma (OMM) Cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Vet Sci.	6. 最初と最後の頁 670451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fvets.2021.670451.	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
1. 著者名 Ishii K, Hido K, Sakamura M, Virgona N, Yano T	4. 巻 24
2. 論文標題 -Tocotrienol and Redox-Silent Analogs of Vitamin E Enhances Bortezomib Sensitivity in Solid Cancer Cells through Modulation of NFE2L1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 9382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24119382	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Seki T, Yano T
2. 発表標題 NK Cells Preferentially Target Prostate Cancer Stem-like Cells
3. 学会等名 Sydney Cancer Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関大河、矢野友啓
2. 発表標題 Death receptor pathway in NK cells regulate prostate cancer stem cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関大河、矢野友啓
2. 発表標題 ナチュラルキラー（NK）細胞は去勢抵抗性前立腺がん幹細胞を優先的に傷害する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井亨太、矢野友啓
2. 発表標題 去勢抵抗性前立腺癌、すい臓がんにおけるトコトリエノールのNRF3阻害効果と補完代替成分としての可能性
3. 学会等名 第21回日本機能性食品医用学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田内優乃、石井亨太、河野翔、矢野友啓
2. 発表標題 ヒト前立腺がん細胞におけるオートコトリエノールによるHIF阻害効果の検討
3. 学会等名 第21回日本機能的食品医用学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://www.toyo.ac.jp/academics/faculty/hcs/professor1/nutrition/yanou/">https://www.toyo.ac.jp/academics/faculty/hcs/professor1/nutrition/yanou/</a>
---

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	加藤 和則  (Kato Kazunori)  (60233780)	東洋大学・健康スポーツ科学部・教授    (32663)	

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
---------	---------