

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：17201

研究種目：基礎研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591770

研究課題名（和文） 前立腺癌細胞の生存・増殖・浸潤における放射線被曝間質細胞の役割とその制御機構

研究課題名（英文） Roles of irradiated stromal cells in the survival, growth, invasion of prostate carcinoma and its mechanisms

研究代表者

魚住 二郎 (UOZUMI JIRO)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：30223514

研究成果の概要（和文）：

前立腺癌細胞(PC3株)は、脂肪組織片、成熟脂肪細胞、脂肪組織由来間質線維芽細胞(ATSC)により浸潤を促進されたが、放射線照射の有無では浸潤傾向に高度の差はなかった。一方、LNcap株では放射線照射ATSCにより増殖が促進されたが、統計学的有意差はえられなかった。膀胱癌細胞株(RT4,EJ)についても検討を加えた。表在性膀胱癌株(RT4)は、放射線照射ATSCにより増殖抑制、アポトーシス促進された。一方、浸潤性膀胱癌株(EJ)は、放射線照射ATSCにより増殖促進、アポトーシス抑制された。

また、放射線照射ATSCは、尿路癌のMAP kinase pathwayの発現を促進した。放射線被曝間質細胞の影響は、前立腺癌と膀胱尿路上皮癌とでは異なり、癌細胞の種類に依存していることが示唆される。被曝間質細胞の影響をより詳細に検討するためには、さらなる研究が必要である。

研究成果の概要（英文）：

Adipocytes and adipose tissues, adipose tissue stromal cells (ATSC) promote the invasion of prostate cancer cell line (PC3), but the irradiated stromal cell types do not significantly affect the invasion of PC3. Irradiated ATSC tends to promote the growth of prostate cancer cell line (LNcap). To evaluate effects of irradiated stromal cells on tumor cells other than prostate tumor cells, we used bladder tumor cells in this research project. Irradiated ATSC inhibits the growth of superficial bladder cancer cell line (RT4), and promotes the apoptosis. In contrast, irradiated ATSC promotes the growth of invasive bladder cancer cell line (EJ) and inhibits the apoptosis. Irradiated ATSC promotes the expression of MAP kinase pathway in these cancer cell types. These results suggest that irradiated stromal cell types may affect tumor growth and invasion in a tumor cell type-dependent way at least in prostatic adenocarcinoma and bladder urinary carcinoma. To estimate effects of irradiated stromal cell types on prostate and bladder cancers in more detail, further studies are needed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
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：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌、放射線被曝間質、癌間質相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の放射線療法では、癌組織に存在する癌細胞だけではなく、線維芽細胞や脂肪細胞などの間質細胞も、放射線に被曝する。近年、放射線被曝細胞が、近傍の細胞に活発な影響を与えることが示唆されており、この放射線被曝細胞の誘導する影響は、“Radiation-induced bystander effects”と呼ばれている (Mothersill C and Seymour C. *Curr Cancer Drug Targets* 6: 447-454, 2006)。我々も、口腔扁平上皮癌細胞の増殖・浸潤が、放射線被曝線維芽細胞により、著明に促進されることを見出した (Kamochi N, Toda S et al. *Cancer Science* in press, 2008 年 12 月号出版予定)。しかし、放射線に被曝した線維芽細胞や脂肪細胞などの間質細胞が、前立腺癌細胞に与える影響は、不明である。

一方、癌-間質細胞相互作用は、癌生物学の中心課題の 1 つである。即ち、間質細胞が癌細胞の増殖・浸潤・転移を調節し、さらに、上皮細胞に腫瘍化シグナルを誘導し、発癌にも関与する (Ilsty TD, et al. *Curr Opin Genet Dev* 11: 54-59, 2001)。我々は、前立腺組織の周囲や間質内に存在する脂肪細胞が、前立腺癌細胞の増殖やサイトカイン (血管内皮細胞増殖因子: VEGF、血小板由来増殖因子: PDGF) 産生を促進し、癌細胞の細胞異型度を増加させることを見出した (Tokuda Y, Toda S, et al. *BJU International* 91: 716-720, 2003)。それ故に、前立腺癌の放射線療法により被曝した間質細胞である線維芽細胞や脂肪細胞が、前立腺癌細胞の生存・増殖・浸潤・遊走・転移巣形成に、活発に影響を与えていると推測されるが、前立腺癌細胞と放射線被曝間質細胞との相互作用の研究は、国内外に報告はなく、その詳細は不明である。

以上の背景に基づいて、前立腺癌細胞の生存・増殖・浸潤・遊走・転移巣形成における放射線被曝線維芽細胞や脂肪細胞の役割とその制御機構を解明する本研究を着想した。本研究により、前立腺癌の間質細胞標的放射線療法の開発や放射線療法後の 2 次発癌の発病機構の解明が期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、前立腺癌細胞と放射線被曝間質細胞の混合培養系と移植実験系を用いて、以下の点を明らかにする。放射線被曝線維芽細胞や脂肪細胞 (図 1 参照) が、

- 1) 前立腺癌細胞のアポトーシス、増殖、浸潤・遊走・転移巣形成に与える影響を解明する。さらに、これらの影響が、不可逆性か否かを明らかにする。
- 2) 上記 1) の前立腺癌細胞-放射線被曝間質細胞相互作用の仲介因子を同定し、その制御機構を解明する。また、放射線被曝線維芽細胞と脂肪細胞の癌細胞に与える影響の違いを明らかにする。

図 1-1: 前立腺癌の組織像

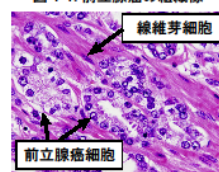
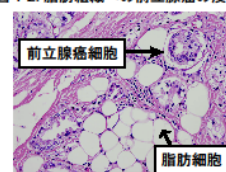


図 1-2: 脂肪組織への前立腺癌の浸潤



本研究により以下のことが期待される。

1) 前立腺癌の間質細胞標的放射線療法を開発することにより、より効率的な治療戦略が樹立できる。また、上述の仲介因子の同定により、前立腺癌の分子標的療法の開発も可能となる。さらに、前立腺癌以外の多くの癌治療に応用可能である。

2) 本研究は、癌生物学に、癌細胞-放射線被曝間質細胞相互作用という新たな視点を提供するものであり、多くの癌組織の

解析に有用と思われる。さらに、放射線療法後の2次発癌の発病機構の解明が期待できる。

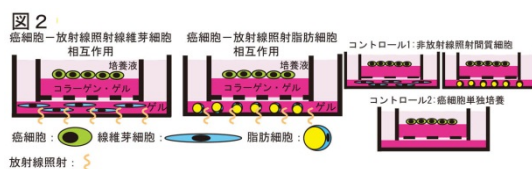
### 3. 研究の方法

#### 平成22年度の研究計画・方法

1) 材料（前立腺癌手術材料の採取は、徳田、魚住が担当、細胞の単離と維持は徳田、戸田が担当）：① 癌細胞：癌組織から単離した癌細胞（学内倫理委員会の許可症例のみ）、前立腺癌細胞株（LNCap、PC-3、DU-145）を用いる。② 間質細胞：a) 線維芽細胞：前立腺癌組織から単離した線維芽細胞と線維芽細胞株（NIH3T3、WI-38）を用いる。b) 脂肪細胞：前立腺癌組織や前立腺周囲脂肪組織から単離した脂肪細胞を用いる（Tokuda Y, Toda S, et al. BJU International 91: 716-720, 2003）。

2) 培養システム（徳田、戸田が担当）：Collagen gel invasion assay systemを用いる（図2）。まず、外皿 [1] に、間質細胞である線維芽細胞や脂肪細胞（100万個）をI型コラーゲンゲル内に包埋し、1日培養後、1、6、12、24 Gy（グレイ）の放射線を照射する（文献7参照）。その後、底面がニトロセルロース膜から成る内皿 [2] に、コラーゲンゲル層を作製し、そのゲル上に、癌細胞（100万個）を播種し、この内皿 [2] を、外皿 [1] に入れて、培養する。コントロールは、放射線を照射しない間質細胞と癌細胞の混合培養（コントロール1）や間質細胞のない癌細胞単独の培養系（コントロール2）である。また、外皿 [1] に、放射線を照射した線維芽細胞と脂肪細胞を混合した培養系で、癌細胞に対する、両者の相乗あるいは相反効果も検討する。また、癌細胞に放射

線を照射した系でも、同様の実験を行う。これまでの我々の研究では、本培養系で、放射線を照射した線維芽細胞は、遺伝子不安定性マーカーである53BP1の核内フォーカス形成とTGF $\beta$ 1の産生が著明に誘導される。さらに、放射線被曝線維芽細胞と混合培養した扁平上皮癌細胞にも、53BP1の発現が誘導され、癌細胞の増殖・浸潤が促進される（Cancer Science 99: 2417-2427, 2008）。それ故に、本培養系は、前立腺癌-放射線被曝間質細胞相互作用を解析する方法として、適切と考えられる。



4) 細胞の生存・増殖・浸潤・遊走の解析（徳田、魚住、戸田が担当）：培養1, 2, 3週毎で、癌細胞のアポトーシスをTUNEL法で、増殖をBrdU（ウリジン）の免疫染色で検討する。癌細胞のゲル内浸潤をヘマトキシリン・エオジン染色切片で（文献7, 28）、癌細胞の遊走能をボイデンチャンバーで検討する。さらに、細胞浸潤・遊走関連分枝であるHGF/C-Met pathway、MMP-1, 9、ラミニン $\gamma$ 2、filamin Aの発現を免疫染色、Western blot、Real time-PCRで解析する（文献7, 28）。さらに、癌細胞及び間質細胞における、遺伝子不安定性マーカーである53BP1の発現を免疫染色で比較検討する（文献7）。以上の実験により、放射線被曝線維芽細胞と脂肪細胞の癌細胞の生存・増殖・浸潤・遊走能及び遺伝子不安定性に与える影響とその相違を解明する。

5) 放射線被曝間質細胞の癌細胞に与える影響の可逆性、不可逆性の検討（戸田が担

当) : 放射線被曝あるいは非被爆間質細胞と癌細胞を上記培養系で1週間培養後に、トリプシン処理で、被爆間質細胞由来癌細胞と非被爆間質細胞由来癌細胞を単離する。それぞれの癌細胞を、間質細胞を含まないコラーゲン層上に播種後、1~4週間培養し、癌細胞の生存・増殖・浸潤・遊走能、53BP1発現を上記と同様に比較検討する。被爆間質細胞由来癌細胞が、非被爆間質細胞由来癌細胞より、生存、増殖、浸潤能または53BP1発現が促進されれば、被爆間質細胞の癌細胞に与える影響は不可逆性と判定される。以上により、放射線被曝線維芽細胞や脂肪細胞の前立腺癌細胞の生存・増殖・浸潤能に与える影響とその相違を解明するとともに、被爆間質細胞誘導性の影響が不可逆性か否かを解明する。線維芽細胞や脂肪細胞で影響が見られない場合は、血管内皮細胞やマクロファージを使用することや、今回の培養系は、癌細胞と間質細胞の細胞接触のない条件で解析しているため、細胞接触のある混合培養系を用いることを考慮する。

## 2. 平成 23 年度以降の研究計画・方法 (徳田、戸田、魚住が共同で担当)

平成 23 年度は、混合培養系で cDNA microarray による網羅的遺伝子解析と候補遺伝子の蛋白やその阻害因子 (抗体、siRNA) の投与実験により、上記の放射線被曝間質細胞誘導性の癌細胞の細胞動態の仲介因子を同定する。我々の研究では (Cancer Science 99: 2417-2427, 2008)、扁平上皮癌では、放射線被曝線維芽細胞誘導性の癌細胞増殖・浸潤仲介因子の1つは、TGFβ1 であるため、本研究でも、TGFβ1 を検討する。平成 24 年度は、癌細胞と放射線被曝あるいは非被爆間質細胞

の組み合わせによるスキッドマウス (SCID mouse) への皮下移植実験により、造腫瘍能・転移形成における放射線被曝間質細胞の役割を解明する (移植した癌細胞や間質細胞とレシピエントの細胞との区別は、GFP マウスを使用するので、識別できる)。余裕があれば、仲介因子阻害剤の治療薬としての可能性を検討する。

## 4. 研究成果

- 1) 脂肪組織片、成熟脂肪細胞、脂肪組織由来間質線維芽細胞 (ATSC) は、前立腺癌細胞 (PC3 株) の浸潤を促進する傾向がみられた。
- 2) 放射線被曝 ATSC も、前立腺癌細胞 (PC3 株) の浸潤を促進する傾向がみられた。
- 3) ATSC への放射線照射の有無では、前立腺癌細胞 (PC3 株) の浸潤傾向に差はみられなかった。
- 4) 前立腺癌細胞 (LNCap 株) では、放射線被曝 ATSC により増殖が促進されたが、統計学的有意差は得られなかった。これらの結果から、放射線治療後、残存した間質には、癌増殖、浸潤能を惹起するポテンシャルがあることが示唆された。
- 5) 表在性膀胱癌株 (RT4) は、放射線照射 ATSC により増殖が抑制され、アポトーシスは促進された。
- 6) 一方、浸潤性膀胱癌株 (EJ) は、放射線照射 ATSC により増殖は促進され、アポトーシスは抑制された。
- 7) 放射線照射 ATSC は、尿路癌の MAP kinase pathway の発現を促進した。表在型、浸潤型尿路上皮癌により、MAP kinase pathway の役割が異なることが示唆された。
- 8) 放射線照射 ATSC と前立腺癌細胞株、膀胱

癌細胞株との解析に実験が集中したため、当初予定していた cDNA microarray による網羅的遺伝子解析と候補遺伝子の蛋白やその阻害因子（抗体、siRNA）の投与実験、放射線被曝間質細胞誘導性の癌細胞の細胞動態の仲介因子の同定、放射線被曝線維芽細胞誘導性の癌細胞増殖・浸潤仲介因子 TGF  $\beta$  1 の検討、癌細胞と放射線被曝あるいは非被曝間質細胞の組み合わせによるスキッドマウス（SCID mouse）への皮下移植実験は遂行できなかった。今後も上記課題を、検討する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

南里麻己，松延亜紀，内橋和芳，青木茂久，有働和馬，佐藤勇司，徳田雄治，野口満，戸田修二，魚住二郎 脂肪組織間質細胞が膀胱癌組織の生存、増殖、浸潤におよぼす影響. 第 21 回泌尿器科分子・細胞研究会. 2012. 2. 10～11. 北海道大学

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

魚住 二郎 (UOZUMI JIRO)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：30223514

##### (2) 研究分担者

戸田 修二 (TODA SHUJI)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：80188755

##### (3) 連携研究者

徳田 雄治 (TOKUDA YUJI)  
佐賀大学・医学部・講師  
研究者番号：90315200

