

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462473

研究課題名(和文) 前立腺癌の再燃およびドセタキセル耐性獲得メカニズムにおける微小環境の影響

研究課題名(英文) Effect of microenvironment on progression of CRPC and on docetaxel-resistance

研究代表者

角野 佳史 (KADONO, Yoshifumi)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：10397218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性となった前立腺癌に対して、ドセタキセルを中心とした抗腫瘍化学療法が施行され、有効性を示すが、この治療にもやがて前立腺癌は耐性を示す。耐性化の機序として微小環境が関与している可能性を考え、前立腺癌細胞PC-3と癌由来間質細胞を共培養し、ドセタキセルに対する感受性の変化を観察した。しかし、明らかな影響は確認されなかった。

次にアンドロゲン感受性前立腺癌と去勢抵抗性前立腺癌において間質細胞の遺伝子発現の違いがある可能性があったため、cDNA microarrayを用いて間質細胞間で遺伝子発現プロファイルを作成し、いくつかの遺伝子が、去勢抵抗性前立腺癌由来間質細胞で発現が変化していた。

研究成果の概要(英文)：Although chemotherapy using docetaxel is conducted for castration-resistant prostate cancer (CRPC) after androgen-deprivation therapy, CRPC become resistant for docetaxel again. We hypothesized that the mechanism is related with tumor microenvironment. Then we co-cultured androgen-independent prostate cancer PC-3 with cancer-associated fibroblast (CAF) and investigated whether CAF affect docetaxel-sensitivity. However, CAF did not affect DOC-sensitivity. Next, we hypothesized that CAF derived from CRPC is different from CAF from androgen-naive prostate cancer. Then we made gene expression profiles from CAF derived from CRPC and CAF from androgen-naive prostate cancer. We identified several differentially expressed genes. Now we are confirming whether these genes are related with CRPC progression.

研究分野：腫瘍学

キーワード：前立腺癌 カバジタキセル耐性株 間質細胞 微小環境

### 1. 研究開始当初の背景

進行前立腺癌の治療はアンドロゲン除去療法 (ADT) が主流で、約 90% 以上の症例で ADT が奏功する。しかし、多くの症例でやがて去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) へと進行する。CRPC となった前立腺癌に対しては世界的にはドセタキセルを中心とした抗癌化学療法が施行されている。この治療法でも約 70% の症例で PSA が低下し、症状も改善し、延命が期待できる。しかし、この治療にもやがて前立腺癌は耐性を示すか、副作用のために中止を余儀なくされる。ドセタキセル使用後の治療には難渋しているのが現状である。つまり抗癌剤耐性の克服は患者の延命や QOL 向上を図るための重要なテーマである。

これまで、当該教室では前立腺癌の抗癌剤耐性化の機序を明らかにするために、アンドロゲン非依存性前立腺癌 PC-3 と DU145 を用いてパクリタキセル耐性細胞株を樹立した。これらの細胞株は同じタキサン系であるドセタキセルにも耐性を示すことがわかっている。この耐性化の機序として、多剤耐性遺伝子 MDR1 プロモータ領域に結合する YB-1 核内移行の亢進に伴う MDR の発現の亢進と、MDR1 プロモータ領域のメチレーションの低下による MDR1 の発現亢進により、MDR1 からコードされる p-glycoprotein の発現が亢進することが一因ということを示してきた (Takeda et al. Prostate 2007, 67: 955-67)。さらに耐性化の別の機序として、C-terminal tensin like protein (CTEN, tensin 4) の発現低下が細胞骨格形成に重要な F-actin と上皮細胞増殖因子受容体 EGFR の発現を亢進させ、耐性化を誘導することも明らかにした (Li et al. Prostate 2010, 70: 48-60)。つまり、前立腺癌周囲からの EGF により抗癌剤耐性が誘導される可能性が示唆された。最近、当該教室で、初代培養の正常前立腺、前立腺癌由来間質細胞、骨由来間質細胞を樹立した。これらの間質細胞を用いて、去勢後でも間質細胞が前立腺癌細胞と協調して副腎性アンドロゲン DHEA から DHT へ効率良く生合成し、前立腺癌の再増殖を促進させる可能性があるということを示した。このように当該教室では、副腎性アンドロゲンと間質細胞を含めた前立腺癌再燃の研究、ならびに前立腺癌の抗癌剤耐性の研究を精力的に進めてきた。近年の研究では、癌の浸潤や転移、抗癌剤耐性の獲得に癌細胞周囲の微小環境がもたらす Epithelial-Mesenchymal Transition (上皮間葉形質転換: EMT) が関与しているという報告もある。特に膀胱癌では抗癌剤耐性獲得に EMT が重要な役割を果たすことが示されている。前立腺癌においても同様に微小環境が癌の進行や抗癌剤耐性化に影響を及ぼしている可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでの当該教室の研究成果も踏まえ、まず前立腺癌の再燃、ドセタキセル

耐性には間質細胞が影響を及ぼしているという仮説を立てた。この仮説のもとに、これまでに樹立された正常前立腺、前立腺癌、および骨由来の間質細胞、あるいは新たに初代培養する間質細胞を用い、前立腺癌細胞と共培養し、増殖、浸潤、血管新生などの違いを明らかにするとともに、各種間質細胞において発現の異なる遺伝子を同定する。同定された遺伝子の発現パターンと前立腺癌の悪性度や予後との関連を調査する。また、それらの遺伝子がどのように前立腺癌細胞の増殖や癌細胞の遊走、浸潤、血管新生、EMT に影響を及ぼしているかを調べる予定である。さらに、ドセタキセルに対する感受性に前述の EGF がどれだけ関与しているのかを明らかにするために、前立腺癌細胞に EGF を投与し、ドセタキセルの感受性の変化を観察する。EGF 以外にこれらの間質細胞がどのように影響を及ぼして耐性を獲得するのか、また影響を及ぼしている他のサイトカインやシグナルがどのようなものかを明らかにする予定である。当該教室では、in vitro でアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞 PC-3、DU145 から Taxane 系抗癌剤耐性細胞株を既に樹立し、耐性の機序の一部を明らかにしているが、さらにドセタキセル抵抗性となるのに前立腺癌由来間質細胞がどのように影響するかも調査し、間質細胞による抵抗性獲得の機序を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

間質細胞は癌細胞周囲の微小環境として重要な働きをしていると考えられるため、これまでに当該教室で初代培養された前立腺癌大症患者から得られた間質細胞、癌由来間質細胞、あるいは骨由来間質細胞を、アンドロゲン依存性・非依存性前立腺癌細胞と共培養を行うことにより、増殖がどのように変化するかを観察する。

さらに wound-healing assay、マトリゲルチャンバーを用いて間質細胞による癌細胞の遊走能、浸潤能の違いも観察する。また、癌細胞と間質細胞が血管新生に及ぼす影響も血管内皮細胞との 3 種類の共培養により観察する。

各種間質細胞から分泌される cytokine や growth factor を明らかにするため、medium 中のタンパク質の cytokine array を行い、分泌の異なる因子を同定する。この結果をもとに、発現の高い cytokine を投与することによる前立腺癌細胞の増殖、浸潤などの変化を観察する。

前立腺癌細胞を様々な間質細胞と共培養 (2 層での培養や 1 層での共培養) を行いながら、ドセタキセルで処理することで、ドセタキセルに対する感受性の変化を観察する。

間質細胞から分泌されるどの成分がドセタキセル耐性化獲得に関与しているかを明らかにするために、medium 中のタンパク質に関しての cytokine array にて得られたデー

タをもとに中和抗体、siRNA を使用して機能を抑制してドセタキセル感受性の変化を観察する。その結果にてドセタキセル耐性化獲得の原因タンパク質を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) 間質細胞の初代培養は長期培養ができないことから、前立腺癌組織針生検から樹立された間質細胞のうちホルモン療法後に再燃した患者から得られた間質細胞を用いてSV40-Tantigen を導入し強制発現させ不死化を試みた。ところが、SV40-Tantigen を用いても不死化する細胞が出現せず、長期間継代培養することができず、間質細胞の不死化は断念せざるを得なかった。

このため、すでにある正常前立腺由来間質細胞と前立腺癌由来間質細胞とをアンドロゲン非依存性細胞株 PC-3、DU145 と共培養して、ドセタキセル (DTX) に対する感受性の変化を調査した。その結果、間質細胞の有無にかかわらず、ドセタキセルに対する感受性に変化は認められなかった (Fig. 1)。

またパクリタキセル耐性細胞株 PC-3-TxR、DU145-TxR と共培養させ、ドセタキセルに対する感受性の変化を観察した。この実験においても間質細胞の有無で感受性の変化は観察されなかった。

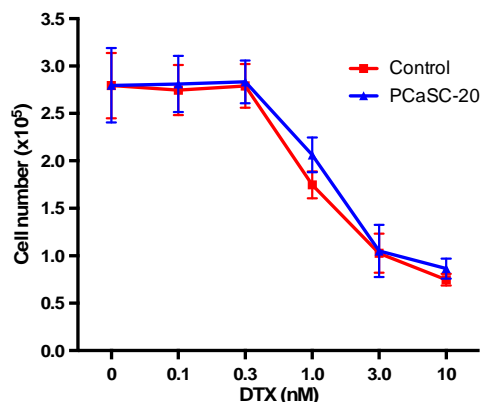


Fig. 1 Effect of stromal cells (PCaSC-20) on docetaxel sensitivity in PC-3 cells

(2) このため、間質細胞の種類 (異なる患者由来の間質細胞) や、間質細胞の数などを調整して検討するため、正常間質細胞、前立腺癌由来間質細胞、去勢抵抗性前立腺癌間質細胞の初代培養を行い、これらの間質細胞から RNA を抽出した後、cDNA microarray analysis をを行い、間質細胞の遺伝子発現プロファイルを作成した (Table 1 Table 2)。

A群 (前立腺癌由来間質細胞)			B群 (CRPC由来間質細胞)				C群 (前立腺癌大症由来間質細胞)		
PCaSc-5	PCaSc-8	PCaSc-11	PCaSc-13	PCaSc-14	PCaSc-20	BPH-1	BPH-4	BPH-8	

Table 1 各種間質細胞の名称

Name	RefSeq_id	PCaSc-5	PCaSc-8	PCaSc-11	PCaSc-13	PCaSc-14	PCaSc-20	BPH-1	BPH-4	BPH-8
DOK5	NM_018431	15	11	56	111	145	226	18	13	26
RHOJ	NM_020663	9	5	5	21	24	47	2	4	5
AC097534.3	NM_007281	18	58	19	44	277	122	31	17	16
SULF1	NM_015170	147	165	121	566	559	399	107	78	178

Table 2 CRPC由来間質細胞で発現の高い遺伝子群

間質細胞がドセタキセル耐性に関与する可能性が示唆されたときに、間質細胞このプロファイルから CRPC のときに発現の変化する遺伝子があることが示唆された。

(3) ドセタキセル耐性前立腺癌に対して、カバジタキセルが使用できるようになった。しかし、カバジタキセルでも耐性となり、最終的に患者は死に至る。

そこで、我々は、カバジタキセルに対する耐性株を樹立する目的で、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 PC-3 と DU145 を用いて、カバジタキセルの濃度を徐々に上昇させることでカバジタキセル耐性株の樹立を試みた。

しかし、何度行っても、耐性株を樹立することができなかった。このため、パクリタキセル耐性株 PC-3-TxR と DU145-TxR を用いて徐々にカバジタキセルの濃度を上昇させることでカバジタキセル耐性株の樹立を試みた。そして、両細胞において耐性株 PC-3-TxR/Cab と DU145-TxR/Cab の樹立に成功した。

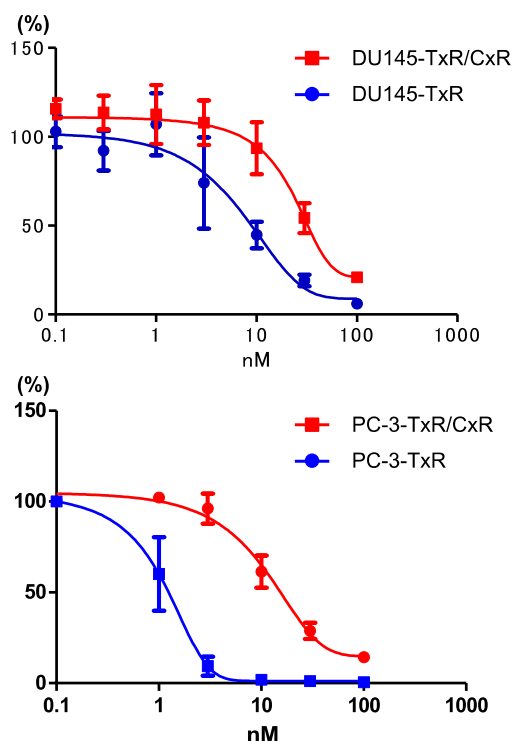


Fig. 2 Cabazitaxel耐性株の樹立

#### 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)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: Cabazitaxel 耐性前立腺癌細胞株の樹立

発明者：角野 佳史、溝上 敦  
権利者：金沢大学  
種類：特許権  
番号：特 2015-0001  
出願年月日：2014 年 4 月 15 日  
国内外の別： 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

角野 佳史 (KADONO, Yoshifumi)  
金沢大学・大学病院・助教  
研究者番号：10397218

(2)研究分担者

溝上 敦 (MIZOKAMI, Atsushi)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号：50248580

北川 育秀 (KITAGAWA, Yasuhide)  
金沢大学・大学病院・講師  
研究者番号：00452102