

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293079

研究課題名(和文) ヒト前立腺癌始原細胞を用いた腫瘍進展メカニズムの解析と新規分子標的治療への応用

研究課題名(英文) Study on human prostate carcinogenesis by using cancer progenitor cells and application for the new molecular target

研究代表者

小西 登 (Konishi, Noboru)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20145832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：Syndecan-1が前立腺癌の癌始原細胞に不可欠な分子として、癌の増殖や浸潤、転移に関わることを見出した。Syndecan-1の活性化酵素heparanaseが前立腺癌に及ぼす影響を解析した。heparanaseノックダウンで、IL-6発現が低下し、STAT3が脱リン酸化されオートファジーが誘導され、免疫組織化学的にも同様の結果を得た。前立腺癌発生モデル動物TRAMPマウスにheparanase阻害剤を投与すると、管内増殖性病変の抑制があり、発癌抑制効果を認めた。Syndecan-1(CD138)中和抗体については、特異性の高い抗体を得ることができたものの、細胞毒性効果は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：Heparanase-an enzyme that activates syndecan-is overexpressed in PIA lesions and contributes to the differentiation of basal cells to intermediate cells. Heparanase also suppressed the induction of autophagy by enhancing STAT3 phosphorylation in human prostatic epithelial cells at different passages by which carcinogenetic process could be executed in human prostate. Immunohistochemistry data for autophagy-related molecules, such as LC3, support the in vitro data. In the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) mouse model of prostate cancer, early intervention with a syndecan-1 inhibitor reduced the incidence of adenocarcinoma. Antibody for syndecan-1 produced in this study was immunoreactive, but not cytotoxic. Heparanase may play important roles in the neoplastic transformation of intermediate cells in response to regulation of autophagy, and thus indicate that heparanase may be a molecular target for prostate cancer therapy and chemoprevention.

研究分野：人体病理学

キーワード：前立腺癌 癌始原細胞 cancer progenitor cells Syndecan-1 heparanase autophagy TRAMPマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌始原細胞は癌細胞中にごく少数占めるのみで、通常状態では重要な生物学的役割を担っていないが、ホルモン療法、放射線、抗癌剤など癌細胞の生存にとって危機的な外的ストレスが加わると、quiescence となって抵抗性を示し、残存した癌幹細胞から悪性度の高い新たな癌細胞(娘細胞)が次々と生み出され、その結果、前立腺癌においては治療抵抗性や生化学的再発(PSA failure)をもたらすと考えられる。我々は最近、癌始原細胞が豊富に含まれる前立腺癌細胞クローンを樹立することに成功した。ヒト前立腺癌細胞株 PC3 細胞から3種の holoclone, meroclone, paraclone が形成されるが、holoclone だけは生存しつづける。興味深いことに、holoclone は stem cell マーカーである CD44, 2-1 integrin を発現し、自己再生能や spheroid 形成能を有する。さらに、holoclone は heparan sulfate proteoglycan である syndecan-1 を強く発現し、これが細胞内活性酸素種(ROS)の産生や cell cycle arrest 関連分子の誘導を抑え、holoclone の細胞増殖活性を維持することを見出した。

(2) 前立腺癌モデル動物である TRAMP マウスに、syndecan-1 siRNA や syndecan-1 活性化に必要な heparanase を阻害する薬剤(OGT)を投与すると腫瘍発生と腫瘍細胞に占める CD133/c-kit 陽性の癌始原細胞が有意に低下した。以上から、syndecan-1 は ROS 産生を阻害することで生存と安定供給をもたらす、前立腺癌の発癌と進展に関与すると考えられ、syndecan-1 が前立腺癌における新たな標的分子となることが示唆された。

2. 研究の目的

(1) 前立腺癌の発生、進展やホルモン抵抗性には癌始原細胞 cancer progenitor cells が重要な役割を担うことが知られる。我々は最近、前立腺癌細胞から自己再生能や少数でも腫瘍を再現できる cancer stem cells に類似した生物学的性状を有する前立腺癌始原細胞を樹立し、その生存と安定供給には syndecan-1(CD138)とその関連シグナルが不可欠であること、syndecan-1 をノックダウンすることによって実験モデル動物における前立腺癌の発生を抑制できることを明らかにし、syndecan-1 が前立腺癌の発生、進展に不可欠な役割を担うこ

とから、本研究では前立腺癌における syndecan-1 を標的分子とした抗腫瘍効果の検討、アンドロゲン非依存性前立腺癌における syndecan-1 の機能解析を追究する。

(2) syndecan-1 の細胞生物学的、臨床病理学的意義を解明し、癌始原細胞を標的とする新しい前立腺癌治療の確立に向けたトランスレーショナルな研究を目指す。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌細胞、正常細胞における syndecan-1 陽性細胞の局在や分布、陽性率の検討: ヒト前立腺全摘出症例ならびに術前生検標本を用い、syndecan-1 と各種 stem cell マーカー(CD133, CD44, 2-1 integrin)の免疫多重染色を行い、陽性細胞の染色強度や陽性率を算出する。また、予後、治療感受性予測因子としての有用性に関する検討として、syndecan-1/stem cell マーカー陽性率と Gleason スコア、脈管浸潤、TNM stage などの臨床病理学的パラメーターとの相関性、さらに、生化学的再発や overall survival、放射線・化学療法・ホルモン療法後の再発、進展との相関性を統計的に解析する。

(2) 抗 syndecan-1 抗体を用いた抗腫瘍性実験

当研究室で樹立した癌始原細胞(holoclone)に抗体を添加して、MTT アッセイ、apoptosis アッセイ、x-gal 染色や電顕による形態解析にて細胞毒性のスクリーニングを行う。

また、抗 syndecan-1 抗体添加により、細胞内活性酸素種(ROS)やその責任酵素である NADPH

oxidase(NOX) 発現がどのような影響を受けるか観察する。必要により、抗syndecan-1抗体処理、未処理TICを用いた網羅的解析(microarray)を施行し、CD138関連分子を特定する。

(3) *In vivo* 実験系として TRAMP マウスを用い、抗syndecan-1 精製抗体を静脈内投与(12.5 mg/kg)あるいは経口投与(100 mg/kg)し、前立腺癌の発癌や増殖(腫瘍体積)、浸潤、転移にどのような影響を受けるか観察する。腫瘍組織からその分子シグナルを免疫組織化学的解析、western blot や real time PCR にて解析する。

(4) DNA 免疫法による抗体作製と解析

和光純薬工業(株)との共同研究により、syndecan-1の細胞外ドメインを標的としたモノクローナル抗体をDNA免疫法にて作製する。発現ベクターに組み込んだ目的タンパク質の遺伝子を動物(ラット、マウス)に導入し、体内で発現させ、その目的タンパク質を抗原として抗体を作製、回収する。

4. 研究成果

我々はこれまでに、ヘパラン硫酸プロテオグリカンである syndecan-1 が前立腺癌における cancer progenitor cells の maintenance に不可欠な分子として機能し、この関連シグナルを遮断することで、癌の増殖や浸潤、転移が強く抑制されることを見出した(Shimada K and Konishi N et al. J Pathol 2013)。平成 26 年度の研究では、syndecan-1 を活性化する唯一の酵素、heparanase の前立腺癌発癌に及ぼす影響を臨床病理学的あるいは細胞生物学的に解析した。いわゆる cancer progenitor cell theory では、

intermediate cells に豊富に含まれる progenitor cells が癌化して前立腺発癌をもたらすと考えられている。Intermediate cells の生物学的性状(luminal cell および basal cell markers の両者を発現し、AR は陰性)を示す prostate epithelial cells(市販細胞)を用いた培養実験にて、heparanase の添加により basal cells から intermediate cells の誘導を認める一方、heparanase の gene silencing(ノックダウン)によって intermediate cells から basal cells へと誘導されることが分かった。これは、heparanase が basal cells から intermediate cells を分化・誘導する上で重要な役割を担うこと、そして、heparanase の機能を遮断することで、癌発生母地である intermediate cells を可逆的に basal cells へ誘導する(いわゆる‘先祖がえり’)ことができることを意味する。さらに、intermediate cells に heparanase ノックダウンを行うと、IL-6 発現が低下し、IL-6 下流の STAT3 が脱リン酸化されること、そして autophagy が誘導されること(LC3 免疫細胞染色)を見出した。IL-6 や STAT3 の抑制によって autophagy が誘導されることから、heparanase は intermediate cells における IL-6 シグナルを促進することで(発癌抑制機構である) autophagy を阻害することが分かった。

以上の結果は、Heparanase が、progenitor cells を豊富に含む intermediate cells を誘導し、かつ腫瘍化抑制シグナルを阻害することで、前立腺発癌に深く関与する可能性を強く示唆する。

前立腺全摘出標本 50 症例を用いた免疫組織化学的検討の結果、heparanase は

intermediate cells(CK8+/CK5+,AR-)が多数含まれる萎縮腺管を中心に強く発現することが分かった。また、正常腺管に比して、autophagy 関連マーカーである LC3 発現が低下する一方、autophagy によって分解される p62 蛋白の発現が上昇し、さらに、リン酸化 STAT3 発現の上昇を認めた。この結果は、heparanase 発現の高い萎縮腺管は、IL-6 シグナルが機能し、autophagy が強く抑制された環境下にあることを意味する。なお、heparanase 発現の高い萎縮腺管では背景間質にリンパ球をはじめ炎症細胞浸潤を伴うことが多く、intermediate zone を中心に Ki-67 陽性細胞数が多い傾向を認めた。これは前立腺癌発生母地として注目された proliferative inflammatory atrophy に相当すると考えられ、炎症を基盤とした発癌を、heparanase という観点から説明できる要素を含む点でも興味深い。

前立腺癌発生モデル動物である TRAMP マウスに heparanase 阻害剤投与実験を行った結果、管内増殖性病変の抑制が認められ、発癌抑制効果を確認できた。同組織検体を用いた免疫組織化学的検討の結果、heparanase 投与マウスでは、前立腺上皮細胞における LC3 発現が高く autophagy の促進が示唆されるとともに、Ki-67 陽性率が低く増殖活性が抑制される傾向を認めた。

Heparanase は前立腺癌発生を阻害する重要な標的分子となる可能性があり、その阻害剤は新規分子標的治療薬としてその臨床応用が期待される。

なお、Syndecan-1(CD138)中和抗体については和光純薬と共同で作製した結果、免疫組織化学的検討に耐えうる特異性の高い抗体を得ることができたものの、前立腺癌や膀胱尿路上皮癌など CD138 発

現細胞に対する細胞毒性効果(*in vitro*)は確認できなかった。今後、syndecan-1 の臨床的有用性が判明したので、中和抗体や heparanase を標的とした治療薬の開発が期待される。

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 9 件)

1. Tanaka N, Asakawa I, Katayama E, Hirayama A, Hasegawa M, Konishi N, Fujimoto K. The biochemical recurrence-free rate in patients who underwent prostate low-dose-rate brachytherapy, using two different definitions. *Radiat Oncol* 9: 107, 2014
2. Fujii T, Ishida E, Shimada K, Hirao K, Tanaka N, Fujimoto K, Konishi N. Computer-assisted three-dimensional analysis of multifocal/multicentric prostate cancer. *Cancer Invest* 32: 303-310, 2014
3. Hori S, Tanaka N, Asakawa I, Morizawa Y, Hirayama A, Hasegawa M, Konishi N, Fujimoto K. Salvage brachytherapy for seminal vesicle recurrence after initial brachytherapy for prostate cancer: a case report. *BMC Res Notes* 7: 760, 2014
4. Tanaka N, Torimoto K, Asakawa I, Miyake M, Anai S, Hirayama A, Hasegawa M, Konishi N, Fujimoto K. Use of alpha-1 adrenoceptor antagonists in patients who underwent low-dose-rate brachytherapy for prostate cancer - a randomized controlled trial of silodosin versus naftopidil -. *Radiat Oncol* 9: 1163, 2014

5. 藤井智美, 島田啓司, 穴井 智, 田中宣道, 藤本清秀, 小西 登. CD138(syndecan-1)を介した前立腺癌進展に関する microRNA126, 149 の発現と機能解析. 泌尿器外科 27: 1207-1209, 2014
6. Fujii T, Shimada K, Tatsumi Y, Fujimoto K, Konishi N. Syndecan-1 responsive microRNA-126 and 149 regulate cell proliferation in prostate cancer. Biochem Biophys Res Commun 456: 183-189, 2015
7. Miyake M, Tanaka N, Asakawa I, Tatsumi Y, Nakai Y, Anai S, Torimoto K, Aoki K, Yoneda T, Hasegawa M, Konishi N, Fujimoto K. Changes in lower urinary tract symptoms and quality of life after salvage radiotherapy for biochemical recurrence of prostate cancer. Radiother Oncol 115: 321-326, 2015
8. Fujii T, Asano A, Shimada K, Tatsumi Y, Obayashi C, Konishi N. Evaluation of RNA and DNA extraction from liquid-based cytology specimens. Diagn Cytopathol 44: 833-840, 2016
9. 藤井智美, 島田啓司, 辰巳佳弘, 藤本清秀, 小西 登. 前立腺 PIA (proliferative inflammatory atrophy) における癌化メカニズム. 泌尿器外科 29: 1215-1217, 2016

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 藤井智美, 島田啓司, 小西 登. 前立腺癌における CD138 を介した microRNA126, 149 の役割. 第 103 回日本病理学会. 2014. 4 ;広島
2. 島田啓司, 藤井智美, 穴井 智, 辰巳佳弘, 藤本清秀, 小西 登. Syndecan-1 (CD138)を介する前立腺癌

- 進展メカニズムの解析. 第 4 回前立腺生物学シンポジウム 2014. 6 ;伊勢
3. 島田啓司, 藤井智美, 辰巳佳弘, 穴井智, 藤本清秀, 小西 登. 前立腺 PIA による癌化メカニズムの解析. 第 104 回日本病理学会. 2015. 4 ;名古屋
4. 藤井智美, 島田啓司, 辰巳佳弘, 小西登. 前立腺癌の上皮間葉移行を介した浸潤機構における microRNA-331-3p の役割. 第 104 回日本病理学会. 2015. 5 ;名古屋
5. 辰巳佳弘, 三宅牧人, 中井 靖, 穴井智, 鳥本一匡, 田中宣道, 小西 登, 藤本清秀. TRAMP マウスを用いた Equol の前立腺癌進行抑制の検討. 第 104 回日本泌尿器科学会. 2016. 4 ;仙台
6. Fujii T, Shimada K, Tatsumi Y, Tanaka N, Fujimoto K, Konishi N. Syndecan-1 up-regulates microRNA-331-3p and mediates epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer. ESMO2016. 2016. 10; Copenhagen

〔図書〕(計 3 件)

1. 小西 登, 島田啓司, 藤井智美. 16. 腎盂・尿管・膀胱癌: 病理と臨床 Vol.34 癌の分子病理学 病理診断から治療標的探索まで. 文光堂 168-174, 2016
2. 藤井智美, 島田啓司, 辰巳佳弘, 小西登. . 前立腺癌の検査・診断. 病理検査 分子病理学的アプローチにおける基礎的検討: 新前立腺癌学 -最新の基礎研究と診断・治療-. 日本臨床 402-406, 2016
3. 小西 登, 藤井智美, 辰巳佳弘. ヒト前立腺肥大症の病理: 特集 2 前立腺肥大症・前立腺炎の動物モデル Prostate Journal. 医学図書出版 3:205-209, 2016

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小西 登 (KONISHI, Noboru)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20145832

(2)研究分担者

藤本清秀 (FUJIMOTO, Kiyohide)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：50264867

藤井智美 (Fujii, Tomomi)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：50623477

島田啓司 (SHIMADA, Keiji)
奈良県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号：90336850