

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460414

研究課題名(和文) 前立腺がん幹細胞でのインテグリン 4/ErbB2/c-Metシグナリングの解明

研究課題名(英文) Study about the beta4 Integrin/ErbB2/c-Met signaling of prostate cancer stem cells

研究代表者

吉岡 年明 (Yoshioka, Toshiaki)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80302264

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)：マウス前立腺がん幹細胞における、インテグリン 4(以下 4)/ErbB2/c-Metシグナリングによる自己複製能の増強が、ヒトでも同様なのかなどの解明のため、がん幹細胞の性質を示すヒト前立腺癌細胞を用いて検討した。4-KO細胞において、また、EGFR/ErbB2阻害剤やMet阻害剤によりsphere形成が抑制された。また、4-ControlやKO細胞のErbB2/c-Metシグナリングを活性化させDNAマイクロアレイを施行し、4存在下でのc-Metの活性化が、幹細胞の多能性に関する遺伝子の発現上昇を導いた。以上よりヒトでも4が前立腺がん幹細胞に影響を与えていた。

研究成果の概要(英文)：To clarify whether Integrin 4(4)/ErbB2/c-Met signaling work to increase the self renewal of human prostate cancer stem cells as same as the mechanism of the signaling of mouse, we performed sphere formation assay with human prostate cancer cell which shows some abilities as stem cells. 4 knock out (KO), inhibitors of EGFR/ErbB2 or Met signaling induced a decrease of sphere formation in dose dependent manner. DNA microarray of 4-Control and 4-KO cells with activation of ErbB2/c-Met signaling by each ligand revealed that Met activation induced the increased expression of the signaling pathway regulating pluripotency of stem cells and 4 is necessary for this increase. These results indicate that 4 influences on human prostate stem cells as same as on those of mouse.

研究分野：人体病理学，実験病理学

キーワード：前立腺がん幹細胞 インテグリン 4 ErbB2 c-Met シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

インテグリン $\beta 4$ (以下 $\beta 4$)は、前立腺正常腺管では基底膜に接する基底細胞に発現しており、基底膜の成分のひとつであるラミニン5をリガンドとし、接着に働くと共に、ラミニン5との結合により、 $\beta 4$ のC末側に存在するシグナルドメインはSrc family kinaseにより活性化され、アダプター蛋白のShcが結合して、RasやPI3-Kを活性化して下流にシグナルを伝えていく(Mainiero et al., EMBO J. 1997; 16: 2365-75). $\beta 4$ は、前立腺上皮細胞の腫瘍化に従い、PIN (prostatic intraepithelial neoplasia)から浸潤癌、また転移巣においてその発現の上昇が認められ、特に浸潤癌では、Gleasonスコアの高い癌細胞や除癌抵抗性癌細胞など、悪性度の高い癌細胞に発現が認められる。

研究代表者は、2008-2010年まで、科学研究費・基盤C(一般)のサポートのもと、研究代表者として「ヒト前立腺癌におけるインテグリン $\beta 4$ ($\beta 4$)の発現とその意義」を検討し、ヒト前立腺癌細胞DU145の $\beta 4$ をsh-RNAでノックダウンさせた $\beta 4$ -KO細胞は、Control細胞に比べて、1) *in vitro*での増殖能の有意な低下やアポトーシスの有意な上昇、また *in vivo*でのヌードマウスへの腫瘍形成能の有意な低下が認められたこと。2) Neuregulin (NRG)やHepatocyte growth factor (HGF)で刺激した際に、ErbB2やc-Metのチロシンリン酸化が抑制され、*in vitro*での増殖能や浸潤能の有意な低下がみられたこと。3) また、ErbB2やc-Metは、ヒト前立腺組織では、正常腺管の基底細胞に発現し、腫瘍細胞で発現が上昇するなど、発現の局在や強度において $\beta 4$ と相関し、統計学的に有意差が認められたことを報告した。

その後、前立腺癌発症マウス(PB-TAgマウス)に、 $\beta 4$ のシグナルドメインを欠損させた $\beta 4$ -1355Tマウスを掛け合わせて、PB-TAg- $\beta 4$ -1355Tマウスを作製して検討を加え、最終的に、1) $\beta 4$ はマウス前立腺がん幹細胞に発現し、がん幹細胞の自己複製能や二次腫瘍形成能を増強させて、前立腺の腫瘍発生を促進させること。2) これらマウス前立腺がん幹細胞の形質の増強は、 $\beta 4$ が、がん幹細胞に同様に発現する受容体型チロシンキナーゼであるErbB2やc-Metの活性化を促進し、下流のAKTやExtracellular Signal-regulated Kinase (ERK)に繋がるシグナルを活性化することで導かれていることなどを確認し報告した(Yoshioka et al., J. Clin. Invest, 2013)。

2. 研究の目的

がん幹細胞は、自己複製能や二次腫瘍形成能により特徴づけられ、化学療法などの治療

に抵抗性であることから、再発癌の多くが、がん幹細胞に由来する可能性が指摘されている(Sawyers CL. Nature. 2004; 432: 294-297). 研究代表者らは、インテグリン $\beta 4$ (以下 $\beta 4$)が、前立腺がん幹細胞に発現し、ErbB2やc-Metの活性化を促進して、がん幹細胞の自己複製能を増強させることで腫瘍発生を促進することを、腫瘍発生マウスを用いた実験系で証明し報告した。

本研究では、ヒトにおいてもマウスと同様の機序が働いているのかを、この $\beta 4$ /ErbB2/c-Metシグナリングに着目し、1) ヒトの前立腺がん幹細胞における、 $\beta 4$ /ErbB2/c-Metシグナリングの役割の解明とそのメカニズムについての検討を行なう。

前立腺幹細胞に発現するマーカーとしては、マウスで発現するSca1や $\alpha 6$ インテグリン($\alpha 6$)が、またヒトではCD44やCD133などが報告されている。 $\alpha 6$ は $\beta 4$ とヘテロダイマーを形成し $\alpha 6\beta 4$ として働く。我々は $\beta 4$ が、がん幹細胞マーカーとしてのみならず、これらに機能的に働くことを報告したが、 $\beta 4$ と他のがん幹細胞マーカーとの関係については検討していない。

C-MetとErbB2を発現するヒト前立腺癌細胞DU145は、HGFで刺激して活性化すると、幹細胞のマーカーの $\alpha 6$ 、CD44やSOX9などの発現上昇が認められ、幹細胞様の形質を示すとの報告がある(Van Leenders et al., PLoS ONE 2011; 6: e26753)。DU145細胞の $\beta 4$ をsh-RNAでノックダウンすると、HGFで刺激してもc-Metの活性化が抑制され、増殖、浸潤また腫瘍形成能が抑制されることから、 $\beta 4$ の抑制により、他のがん幹細胞のマーカーの発現や形質発現が抑制される可能性がある。そこで、2) 前立腺がん幹細胞マーカーである $\beta 4$ が、他のがん幹細胞マーカーに影響を及ぼしている可能性の有無についても検討を行なう。

3. 研究の方法

本研究では目的を達成するために、以下の方法で検討を加える。

1) 前立腺がん幹細胞における、 $\beta 4$ /ErbB2/c-Metシグナリングの解明とそのメカニズムについての検討

我々は前述のように、 $\beta 4$ が、がん幹細胞に発現するErbB2やc-Metの活性化を促進し、その下流のAKTやERKに繋がるシグナルを活性化することを示したが、最終的にどのようなシグナルを介して、またどのようなメカニズムでがん幹細胞の自己複製能や二次腫瘍形成能を増強させるのか明らかにしていない。この点を明らかにするために、ヒト前立腺癌細胞DU145の $\beta 4$ をsh-RNAでノックダウンさせた $\beta 4$ -KO細胞やControl細胞を、ErbB2やc-Metの活性化を促進するNRGやHGFで刺激して、DNAマイクロアレイを用いて検討を加えるとともに、これらの細胞に自己複製能をみるsphere formation assayを行い、シ

グナルの阻害剤を用いた実験を行なうなどして、検討を進める。

2) $\beta 4$ と関連するがん幹細胞のマーカーの検索とその相互関係の検討

上述の DU145 の $\beta 4$ を sh-RNA でノックダウンさせた $\beta 4$ -KO 細胞や Control 細胞を、ErbB2 や c-Met の活性化を促進する NRG や HGF で刺激して、DNA マイクロアレイを用いた検索を行なうことから、検討を進めていく。

4. 研究成果

研究に用いたアンドロゲン非依存性のヒト前立腺癌細胞 DU145 は、図 1 に示すように、いくつかの前立腺癌培養細胞の中では、 $\beta 4$ また ErbB2, ErbB3, EGF-R および c-Met を全て発現している。また、DU145 は、がん幹細胞としての性質を持っている点の報告も多いことから、この DU145 をがん幹細胞として、以下の実験に用いた。

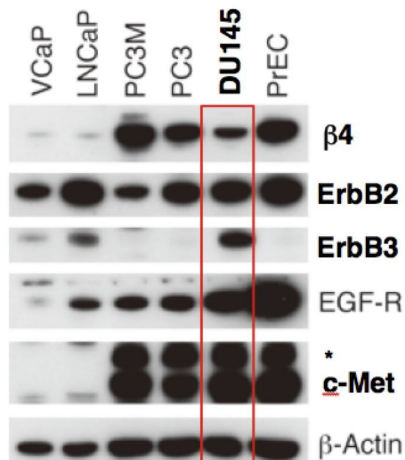


図 1. DU145 および他の前立腺癌細胞における $\beta 4$ や EGF-R ファミリーおよび c-Met の発現の比較。DU145 は ErbB2 や ErbB3 および c-Met を強く発現している。

(1) $\beta 4$ /ErbB2/c-Met シグナリングは、ヒトがん幹細胞の自己複製能に影響している。

DU145 の $\beta 4$ を sh-RNA でノックダウンさせた $\beta 4$ -KO 細胞や Control 細胞を、sphere formation assay を行い、がん幹細胞としての自己複製能への影響を検討したところ、Control 細胞では多くの成熟した sphere を形成したが、 $\beta 4$ -KO 細胞 (sh- $\beta 4$, No.1, No.2) では、sphere を形成できなかった (図 2)。

以上より、 $\beta 4$ はヒトがん幹細胞の自己複製能に影響していることが示された。

次に、 $\beta 4$ を発現している DU145 細胞を、EGFR/ErbB2 inhibitor の Lapatinib (DMSO, 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M) を用いて sphere formation assay を行なったところ、濃度依存性に sphere の形成が、大きさおよび数において抑制された (図 3)。

この結果から、ErbB2 シグナリングはヒト前立腺がん幹細胞の自己複製能に影響していることが示された。

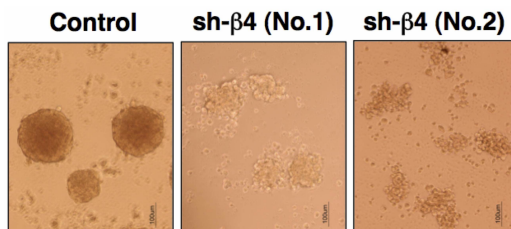


図 2. $\beta 4$ の Control-shRNA (Control) 及び 2 種類の $\beta 4$ -shRNA (sh- $\beta 4$; No.1, No. 2) における Sphere formation assay. Control は多くの成熟した sphere を形成できるが、sh- $\beta 4$ は形成できない。

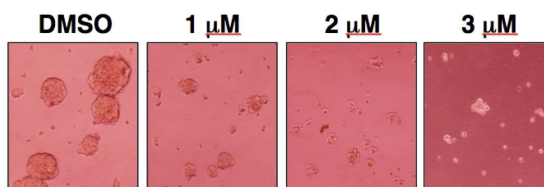


図 3. Lapatinib (EGFR/ErbB2 inhibitor) による、DU145 の sphere 形成能の濃度依存性の低下。大きさや数の減少が認められた。

次に、DU145 細胞に対して、Met inhibitor の Crizotinib (DMSO, 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M) を用いて sphere formation assay を行なったところ、sphere の形成が濃度依存性に大きさおよび数において抑制が認められた。

以上から、Met シグナリングもヒト前立腺がん幹細胞の自己複製能に影響していることが示された。

これらの sphere formation assay の結果と、我々が既に報告している、 $\beta 4$ が、がん幹細胞に発現する ErbB2 や c-Met の活性化を促進し、その下流の AKT や ERK に繋がるシグナルを活性化する点も考慮し、 $\beta 4$ /ErbB2/c-Met シグナリングが、ヒトがん幹細胞の自己複製能に影響していることが確認された。

次に、DU145 の $\beta 4$ を sh-RNA でノックダウンさせた $\beta 4$ -KO 細胞や Control 細胞において、未刺激群と NRG 刺激群や HGF 刺激群を作製し、DNA マイクロアレイを行い検討した。ヒト乳癌においては、ErbB2 は AKT を介して Wnt シグナリングを活性化し、がん幹細胞の自己複製能に影響するとの報告がある (Korkaya et al., PLoS Biol. 2009; 7: e1000121)。また c-Met は、肝細胞癌や大腸癌において、同様に Wnt シグナリングを活性化してがん幹細胞に影響するとの報告がある (Vermeulen et al., Nat Cell Biol. 2010; 12: 468-76)。

上述の DNA マイクロアレイにおいて、パスウェイ解析したところ、Control 細胞 ($\beta 4$ 正

常)では、未刺激群において、 β 4-KO 細胞に比較して、Cytokine-Cytokine interaction, Cell adhesion molecule, JAK-STAT, PI3K-Akt, Ras シグナリングなどのパスウェイの有意な上昇が認められた。また、NRG 刺激群では、上述に加えて、Focal adhesion や ECM-receptor interaction の上昇を、HGF 刺激群では、Toll-like receptor interaction, TGF- β シグナリング及び signaling pathway regulating pluripotency of stem cells (幹細胞の多能性を制御するシグナリング)などのパスウェイの有意な上昇が認められた(表1)。

Pathway	Score	P-value
Cytokine-cytokine receptor interaction	11.136	6.66E-16
Cell adhesion molecules	8.371	2.66E-15
JAK-STAT signaling pathway	4.328	1.51E-05
ECM-receptor interaction	3.972	7.12E-05
PI3-k-Akt signaling pathway	3.539	4.02E-04
Toll-like receptor signaling pathway	3.452	5.56E-04
Ras signaling pathway	3.112	0.002
TGF- β signaling pathway	2.921	0.003
Signaling pathway regulating Pluripotency of stem cells	2.002	0.045

今回の検討では、Akt の上昇は認められたが、いずれの群でも Wnt シグナリングの上昇は認められなかった。

これらの DNA マイクロアレイの結果から、インテグリン β 4 の影響により多数のシグナリングパスウェイが動いているのが確認されたが、これらのシグナリングのどれが、 β 4/ErbB2/c-Met シグナリングから最も影響を受けている最終シグナリングかの結論には至らなかった。

(2) Met 活性化下において、 β 4 はがん幹細胞に關与するいくつかの因子の発現を上昇させる

上述の DNA マイクロアレイの結果からは、Control 細胞(β 4 正常)では、 β 4-KO 細胞に比較して、HGF 刺激群において、signaling pathway regulating pluripotency of stem cells (幹細胞の多能性を制御するシグナリング)のパスウェイの有意な上昇が認められた(表1)。

これらの結果から、インテグリン β 4 存在下において、HGF 刺激により Met が活性化された状態では、がん幹細胞の多能性に關与するいくつかのパスウェイが動いていることが確認された。以上から、DU145 における、Met の活性化に伴うがん幹細胞に關与するいくつかの因子の発現には、 β 4 が必要であり、前立腺がん幹細胞に影響を与えているいくつかのシグナリングやパスウェイに、 β 4 が影響を与えていることが確認された。

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 8 件)

- 1) Nara T, Narita S, Mingguo H, Yoshioka T, Koizumi A, Numakura K, Tsuruta H, Maeno A, Saito M, Inoue T, Tsuchiya N, Satoh S, Habuchi T. Altered miRNA expression in high-fat diet-induced prostate cancer progression. *Carcinogenesis*, 査読あり, 37(12): 1129-1137, 2016
- 2) Tanino M, Sasajima T, Nanjo H, Akesaka S, Kagaya M, Kimura T, Ishida Y, Oda M, Takahashi M, Sugawara T, Yoshioka T, Nishihara H, Akagami Y, Goto A, Minamiya Y, Tanaka S. Rapid immunohistochemistry based on alternating current electric field for intraoperative diagnosis of brain tumors. *Brain Tumor Pathol.* 査読あり, 32: 12-19, 2015.
- 3) Yoshioka M, Shibata S, Uchinami H, Watanabe G, Miyazawa H, Iida M, Yoshida M, Yoshioka T, Nanjo H, Yamamoto Y. The Transformation of a nonfunctioning islet cell tumor of the pancreas into a proinsulinoma under conditions of lung metastasis., *Internal Med.* 査読あり, 54: 785-790, 2015.
- 4) Yoshioka M, Watanabe G, Uchinami H, Kudoh K, Hroshima Y, Yoshioka T, Nanjo H, Funaoka M and Yamamoto Y. Hepatic angiomyolipoma, differential diagnosis from other liver tumors in a special reference to vascular imaging-importance of early drainage vein. *Surg. Case Rep.* 査読あり, 1:11, 2015
- 5) Iikawa N, Yamamoto Y, Kawasaki Y, Yoshioka T, Nishijima A, Enomoto K, Ishikawa K, Omori Y. Intra-Golgi connexin26 behaves in a pro-oncogenic manner in head and neck cancer cells. *Akita J Med.* 査読あり, 42, 87-94. 2015.
- 6) Horoshima Y, Nanjo H, Sasajima T, Shimizu H, Minamiya Y, Yoshioka T, Oda M, kudo-Asabe Y, Tsuda M, Tanino M, Tanaka S, Akagami Y, Goto A. Rapid immunohistochemistry of IDH-1 for the intraoperative diagnosis of gliomas. *Akita J Med.* 査読あり, 42, 147-156, 2015.
- 7) Chen M, Zhang Y, Yu VC, Chong YS, Yoshioka T, Ge R. Isthmin targets cell-surface GRP78 and

triggers apoptosis via induction of mitochondrial dysfunction. Cell Death Differ. 査読あり, 21, 797-810, 2014.

- 8) 南條 博, 吉岡年明, 南谷佳弘, 赤上陽一. 迅速免疫染色. 免疫組織化学診断と治療選択の指針. 病理と臨床臨時増刊号, 査読なし, 32, 54-58, 2014.

〔学会発表〕(全国学会 計 11 件)

- 1) 吉岡年明, 南條 博, 大森泰文 (2017) Beta4 インテグリンのヒト前立腺癌幹細胞での働き. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 3 月, 長崎.
- 2) Yoshioka T, Yamamoto Y, Suzuki M, Nishijima A, Nanjo H, Enomoto K, Omori Y. (2015) A role of Integrin $\beta 4$ in the prostate cancer stem cells. 第 74 回日本病理学会総会, 4 月, 名古屋.
- 3) 南條 博, 吉岡年明, 廣嶋優子, 南谷佳弘, 笹島寿郎, 吉田 誠, 後藤明輝, 大森泰文, 中村竜太, 赤上陽一. (2015) 迅速免疫染色技術(R-IHC)を用いた術中迅速診断-当院における 180 症例の検討. 第 74 回日本病理学会総会, 4 月, 名古屋.
- 4) 鈴木麻弥, 吉岡年明, 山本洋平, 西島亜紀, 佐藤 朗, 大森泰文. (2015) 頭蓋骨の完全欠損を含む多発奇形を伴った羊膜索症候群の一部検例. 第 74 回日本病理学会総会, 4 月, 名古屋.
- 5) 山本洋平, 西島亜紀, 吉岡年明, 榎本克彦, 大森泰文. (2015) ヒト胆嚢癌産生 exosome 中の miRNA が血管新生に与える影響の検討. 第 74 回日本病理学会総会, 4 月, 名古屋.
- 6) Yoshioka T, Yamamoto Y, Nanjo H, Omori Y. (2014) $\beta 4$ integrin promotes tumorigenesis of human prostate cancer by amplifying ErbB2 and c-Met signaling. 第 73 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月.
- 7) Okita K, Abe S, Ueda S, Yagi H, Inoue M, Yoshioka T, Omori Y, Ogura D, Niwa S, Masuko T. (2014) Anti-tumor effect of novel anti-HER3 rat monoclonal antibodies. 第 73 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月.
- 8) Ueda S, Tokiwa, R, Okazaki K, Yagi H, Yoshioka T, Omori Y, Masuko T. (2014) Specificity of novel monoclonal antibodies recognizing CD44v6, v9 and v10 of CD44R1 in human epithelial cancers. 第 73 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月.

- 9) 吉岡年明, 南條 博, 伊藤智夫, 蛇口 琢, 矢野道広, 新井浩和, 吉野裕顕, 後藤明輝, 大森泰文. (2014) 新生児に発生した Fetal lung interstitial Tumor (FLIT) の一例. 第 103 回日本病理学会総会, 広島, 4 月.
- 10) 南條 博, 吉岡年明, 南谷佳弘, 笹嶋寿郎, 廣嶋優子, 吉田 誠, 後藤明輝, 赤上陽一. (2014) 電界非接触攪拌迅速免疫染色技術を用いた術中迅速病理診断. 第 103 回日本病理学会総会, 広島, 4 月.
- 11) 山本洋平, 吉岡年明, 鈴木麻弥, 大森泰文. 右血胸から出血性 shock に陥った心臓原発血管肉腫の 1 剖検例. 第 103 回日本病理学会総会, 広島, 4 月.

〔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

吉岡 年明 (YOSHIOKA TOSHIAKI)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 80302264

(2) 研究分担者

大森 泰文 (OMORI YASUFUMI)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 90323138
山本 洋平 (YAMAMOTO YOHEI)
秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 70400512

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()