

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861266

研究課題名(和文) 癌間質由来マルチバイオマーカー探索による早期去勢抵抗性前立腺癌予測システムの構築

研究課題名(英文) Identification of tumor stroma-derived multi-biomarkers for predicting castration-resistant prostate cancer

研究代表者

佐々木 豪 (Sasaki, Takeshi)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20644941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、アンドロゲン除去療法後の血中PSAは緩徐に低下したほうが予後良好であるという興味深い結果が報告されている。前立腺線維芽細胞由来の因子がアンドロゲン非依存性にアンドロゲン受容体(AR)を活性化することに着目し、ADT後の血中PSA動態に対する前立腺線維芽細胞の役割を検討した。アンドロゲン感受性株、正常ヒト前立腺間質細胞、初代培養したヒト前立腺癌由来線維芽細胞を用い、共培養および混合移植を行った。その結果、前立腺線維芽細胞がADT後の血中PSAを緩徐に低下させることを明らかにした。治療前の前立腺線維芽細胞からADT後の血中PSA動態を予測することができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In patients with prostate cancer (PCa), serum prostate-specific antigen (PSA) is a useful marker for evaluating the effects of androgen deprivation therapy (ADT). However, the mechanism remains unknown. Tumor stroma surrounding cancer cells is enriched in fibroblasts secreting AR-stimulating factor in the context of androgen deficiency. Therefore, we investigated the role of fibroblasts in serum PSA decline after ADT. We performed co-culture and co-inoculation experiments using androgen-sensitive, androgen receptor (AR)-positive prostate epithelial cell lines (LNCaP, 22Rv1, and RWPE-1 cells), commercially available prostate stromal cells (PrSC), and primary cultures of prostate fibroblasts (pcPrFs). Our results demonstrated that fibroblasts prolong serum PSA decline after ADT. We hypothesize that pre-therapeutic characteristic of fibroblasts may reflect in serum PSA kinetics after ADT, which could be a critical biomarker for predicting CRPC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：前立腺癌 癌関連線維芽細胞 PSA マルチバイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

近年、前立腺癌の増加が医療社会的に注目されている。実際、将来のわが国における前立腺癌罹患率の増加に関しては、2020年には78,000人以上となり、肺癌に次いで男性癌のうち、2番目の罹患数になると予測されている。また、前立腺癌の死亡者数は、2020年には2000年の約3倍になると予測される。

臨床において、進行性前立腺癌に対する第一選択治療は内分泌療法（完全アンドロゲン除去療法、去勢療法）である。進行性前立腺癌は、治療開始後1-2年は約80%の患者で制癌作用を示すが、3-5年後にその半数以上に再び癌の増殖がみられる去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）となり、癌死に至る。CRPCは未だ有効な治療法が確率しておらず、予後が極めて悪いことが深刻な問題である。

一般に、前立腺癌の診断・治療に血中PSA (prostate specific antigen; PSA)は、欠くことのできない有益な腫瘍マーカーである。PSAは、前立腺組織に特異的に発現しているタンパク質であり、前立腺の腺上皮細胞にアンドロゲンが作用し、アンドロゲン受容体（AR）の働きを介して産生・分泌される。腺上皮細胞に癌細胞が発生・増殖し、間質層へと浸潤すると癌細胞が産生・分泌するPSAが血管内に入り込むため、血中PSAが高くなる。ゆえに、血中PSAは前立腺癌の早期発見や治療効果判定（手術、放射線、内分泌、化学療法）の指標に用いられている。一般に、前立腺癌治療の効果判定は、血中PSAが急激に低下した症例ほど治療反応性はよく、PSA再発・PSA再燃を来しにくいと考えられている。しかし、申請者は、従来の考え方と異なり、進行性前立腺癌患者において内分泌療法後の血中PSAは急激に最低値に達するよりも、徐々に最低値に達したほうが生存予後がよく、PSA再燃を来しにくい、という結果を得た（Sasaki, et al. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2011, Sasaki, et al. *Endocrine-related cancer* 2012）。最近になり申請者と同様の報告が散見されている（Choueiri, et al. *Cancer* 2009, Huang, et al. *Aging Male* 2011）。これらの結果は、進行性前立腺癌患者において、内分泌療法後の血中PSA低下は必ずしも前立腺癌細胞死を意味していないことを示していると考えられた。Crawfordらは申請者の報告を含め、進行性前立腺癌患者におけるCRPC進展予測を血中PSA単独で行うことの限界を指摘した（Crawford, et al. *BJU International* 2013）。

現在、進行性前立腺癌に対する内分泌療法は非常に有効な治療法であるが、この治療法の効果を最大限に引き出し、さらに新たな治療戦略を開発するためにも、CRPC進

展予測が非常に重要であると考えられる。そのため、本研究課題を計画することで血中PSAに加え、複数のマーカーを組み合わせるマルチバイオマーカー診断システムを開発し、早期CRPC予測システムの構築することが期待された。

2. 研究の目的

本研究課題は、進行性前立腺癌において内分泌療法後のCRPC進展予測は、血中PSA単独のモニタリングでは限界があることから、去勢後に前立腺癌細胞の悪性・進展を規定する組織中因子として前立腺癌患者由来の線維芽細胞に着目し、線維芽細胞の産生する増殖因子やサイトカインの多様な表現型を解析することにより、CRPC予測マルチバイオマーカーを同定する。血中PSAに線維芽細胞由来マルチバイオマーカーを加えた早期CRPC予測システムの構築によるオーダーメイド医療の確立を目的とした。

3. 研究の方法

細胞株

本研究は三重大学医学部倫理委員会の承認を受け、対象となる患者には口頭ならびに書面で説明の上、本人の同意が得られた検体を使用した。前立腺手術標本または前立腺生検標本から前立腺線維芽細胞の初代培養を行った。組織を5mm³に細切し、1×PBSで洗浄、0.05% Trypsin-EDTAで酵素消化を行った後、間質細胞基本培地（SCBM™）にて培養した。正常ヒト前立腺ストローマ細胞PrSCはLonza社から購入し、アンドロゲン感受性前立腺癌細胞株（LNCaP, 22Rv1, RWPE-1）はATCC社から購入した。

in vitro 共培養試験

トランスウェルチャンバーを用い、低アンドロゲン環境下で前立腺癌細胞株（LNCaP, 22Rv1, RWPE-1）とPrSCまたは初代培養前立腺線維芽細胞との共培養を行い、LNCaP, 22Rv1, RWPE-1の細胞内PSA蛋白量を評価した。

in vivo ヒト前立腺線維芽細胞・ヒトLNCaP前立腺癌混合移植モデル

LNCaP単独あるいはLNCaPとPrSCまたは初代培養前立腺線維芽細胞を混合した移植片をヌードマウスの腎被膜下へ移植し、移植後14日目に去勢した。去勢後14, 21日目に組織を回収すると共に血中PSAを測定した。

4. 研究成果

平成26年度

本年度は、前立腺手術標本または前立腺生検標本から前立腺線維芽細胞の初代培養を行った。それら前立腺線維芽細胞の産生する

増殖因子・サイトカインを Real-time PCR 法、ELISA 法を用いて解析し、前立腺癌患者由来線維芽細胞に特異的な遺伝子を選定することで、ヒト前立腺癌細胞の増殖修飾作用を有する可能性のあるマルチバイオマーカー候補因子の同定を行った。

【検討 1】得られた組織の病理結果から、前立腺癌患者からは 12 例、正常前立腺からは 4 例の線維芽細胞の初代培養に成功した。

【検討 2】前立腺癌患者から得られた全ての線維芽細胞で、市販の正常ヒト前立腺ストロマ細胞 PrSC(Lonza 社)と比較し、mRNA (COL1A1, TNC, FGF2, FGF7, IGF1)と上清蛋白質 (TGF 1) の発現が有意に高かった。

初代培養で得られた前立腺癌患者由来線維芽細胞の性状解析から、mRNA (COL1A1, TNC, FGF2, FGF7, IGF1)および上清蛋白質 (TGF 1) がヒト前立腺癌細胞の増殖修飾作用を有する可能性のあるマルチバイオマーカー候補因子である可能性が示された。

平成 27 年度

本年度は、初代培養で得られた前立腺癌患者由来線維芽細胞のうち 3 検体を用い、アンドロゲン感受性前立腺癌細胞株 (LNCaP, 22Rv1, RWPE-1) との共培養および混合移植モデルを作製した。マウスモデルにおいて血中 PSA 動態を評価し、血中 PSA 動態を規定する線維芽細胞由来因子の同定を試みた。

【検討 1】線維芽細胞との共培養によって LNCaP, 22Rv1 で PSA 蛋白の発現が上昇したが、RWPE-1 では PSA 蛋白の発現に変化はみられなかった。

【検討 2】マウス混合移植モデルには LNCaP を用いた。血中 PSA および微小血管密度 (MVD) は LNCaP 単独群で去勢後 14 日目に有意に低下したものの、線維芽細胞混合群では去勢後 14 日目においても去勢前と同レベルに維持された。

前立腺癌患者由来の線維芽細胞が分泌するパラクライン因子のうち、血管新生因子 (VEGF, FGF2)、癌細胞分化制御因子 (EGF, IGF1, IL6) の複数のパラクライン因子が血中 PSA 動態と予後予測を結び付ける重要な役割を担っていることを見出した。

本研究から、前立腺癌間質の多様性に着目した、前立腺癌関連線維芽細胞由来マルチバイオマーカー (VEGF, FGF2, EGF, IGF1, IL6) 早期再発予測システムの構築の可能性が示唆された。

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 5 件)

- 1) Sasaki T, Ishii K, Iwamoto Y, Kato M, Miki M, Kanda H, Arima K, Shiraishi T, Sugimura Y. Fibroblasts prolong serum prostate-specific antigen decline after androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Laboratory Investigation*, 96; 338-349, 2016. doi: 10.1038/labinvest.2015.136. (査読あり)
- 2) Sasaki T, Onishi T. Pretherapeutic plasma fibrinogen level is an independent survival predictor in renal cell carcinoma. *Oncology treatment and research*, 38; 374-378, 2015. doi: 10.1159/000435896. (査読あり)
- 3) Hasegawa T, Yamakado K, Nakatsuka A, Uraki J, Yamanaka T, Fujimori M, Miki M, Sasaki T, Sakuma H, Sugimura Y. Unresectable Adrenal Metastases: Clinical Outcomes of Radiofrequency Ablation. *Radiology*, 277; 584-593. 2015. doi: 10.1148/radiol.2015142029. (査読あり)
- 4) Onishi T, Sasaki T. The Utility of Combination of Prostate Specific Antigen (Psa) Nadir Level and Time to Psa Nadir Following Androgen Deprivation Therapy as a Reliable Prognostic Factor in Advanced Prostate Cancer. *Journal of clinical oncology and research*. 2; 1014, 2014 <http://www.jscimedcentral.com/Oncology/vol2issue2.php>. (査読あり)
- 5) Sasaki T, Matsumoto T, Wada H, Ohishi K, Kanda H, Yamada Y, Arima K, Katayama N, Sugimura Y. Successful treatment of non-invasive bladder tumour in a haemophilia A patient with high-responding inhibitors: a case report. *Haemophilia* 20; e399-401, 2014. doi: 10.1111/hae.12486. (査読あり)

〔学会発表〕(計 15 件)

- 1) The 2015 Annual Fall Meeting of the Society for Basic Urologic Research (SBUR) (平成 27 年 11 月 13 日・フォートローダーデール・アメリカ) Fibroblasts prolong serum prostate-specific antigen decline after androgen deprivation therapy in prostate cancer. Takeshi Sasaki, Kenichiro Ishii, Miki Manabu, Hideki Kanda, Kiminobu Arima, Taizho Shiraishi, Yoshiki Sugimura
- 2) 110th American Urological Association (AUA) Meeting (平成 27 年 5 月 17 日・二

- ユーオリンズ・アメリカ)
Pretherapeutic plasma fibrinogen level is an independent survival predictor in renal cell carcinoma. **Takeshi Sasaki**, Takehisa Onishi, Yoshiki Sugimura
- 3) 第 103 回日本泌尿器科学会総会 (平成 27 年 4 月 19 日・石川県金沢市・石川県音楽堂) 去勢抵抗性前立腺癌に対するエチニルエストラジオール Re-challenge 療法の有用性. 大西 毅尚、東 真一郎、舛井 覚、芝原 拓児、**佐々木 豪**
 - 4) 第 103 回日本泌尿器科学会総会 (平成 27 年 4 月 19 日・石川県金沢市・石川県音楽堂) 線維芽細胞に作用する既存医薬品にドラッグ・リポジショニングによる前立腺癌治療戦略. 石井 健一朗、**佐々木 豪**、三木 学、神田 英輝、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
 - 5) 第 103 回日本泌尿器科学会総会 (平成 27 年 4 月 19 日・石川県金沢市・石川県音楽堂) LPA1 受容体拮抗薬の有効性を念頭にした、前立腺癌間質を含む各細胞株における L P A R 発現の検討. 三木 学、神田 英輝、**佐々木 豪**、石井 健一朗、有馬 公伸、杉村 芳樹
 - 6) 第 103 回日本泌尿器科学会総会 (平成 27 年 4 月 18 日・石川県金沢市・石川県音楽堂) 前立腺癌微小環境の不均一性に基づくアンドロゲン除去療法後の血中 PSA 動態. **佐々木 豪**、石井 健一朗、三木 学、神田 英輝、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
 - 7) 第 24 回分子細胞研究会 (平成 27 年 2 月 28 日・東京都千代田区・JP タワー) 前立腺癌への LPA 受容体拮抗薬の有効性. 三木 学、神田 英輝、**佐々木 豪**、石井 健一朗、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
 - 8) 第 24 回分子細胞研究会 (平成 27 年 2 月 28 日・東京都千代田区・JP タワー) 前立腺癌進展における IL-6 の多様な生理作用. 石井 健一朗、**佐々木 豪**、三木 学、井口 和弘、溝上 敦、神田 英輝、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
 - 9) 第 24 回分子細胞研究会 (平成 27 年 2 月 28 日・東京都千代田区・JP タワー) 前立腺癌間質に規定される ADT 後の血中 PSA 動態. **佐々木 豪**、石井 健一朗、三木 学、神田 英輝、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
 - 10) The 2014 Annual Fall Meeting of the Society for Basic Urologic Research (SBUR) (平成 26 年 11 月 14 日・ダラス・アメリカ) Fibroblasts in prostate cancer microenvironment participate in serum prostate-specific antigen kinetics after androgen deprivation therapy. **Takeshi Sasaki**, Kenichiro Ishii, Manabu Miki, Hideki Kanda, Kiminobu Arima, Taizho Shiraishi, Yoshiki Sugimura
 - 11) 第 73 回日本癌学会学術総会(平成 26 年 9 月 26 日・神奈川県横浜市・パシフィコ横浜) 前立腺癌微小環境を形成する線維芽細胞は内分泌療法後の血中 PSA 動態を規定する. **佐々木 豪**、石井 健一朗、三木 学、神田 英輝、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
 - 12) 109th American Urological Association (AUA) Meeting (平成 26 年 5 月 19 日・オランダ・アメリカ) Fibroblasts in prostate cancer microenvironment prescribe serum prostate-specific antigen kinetics after hormone therapy. **Takeshi Sasaki**, Kenichiro Ishii, Hideki Kanda, Yasushi Yamada, Kiminobu Arima, Taizho Shiraishi, Yoshiki Sugimura
 - 13) 109th American Urological Association (AUA) Meeting (平成 26 年 5 月 18 日・オランダ・アメリカ) Development of an efficient bladder tumor model by recombining with mesenchymal cells. Kenichiro Ishii, **Takeshi Sasaki**, Manabu Kato, Kenjiro Ito, Motomu Sakuragi, Nobuyuki Oda, Hideki Kanda, Yasushi Yamada, Kiminobu Arima, Taizo Shiraishi, Yoshiki Sugimura
 - 14) 第 102 回日本泌尿器科学会総会 (平成 26 年 4 月 26 日・兵庫県神戸市・神戸国際会議場) アンドロゲン除去療法後の血中 PSA 動態に対するヒト前立腺間質細胞の影響. **佐々木 豪**、石井 健一朗、加藤 学、神田 英輝、山田 泰司、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
 - 15) 第 102 回日本泌尿器科学会総会 (平成 26 年 4 月 24 日・兵庫県神戸市・神戸国際会議場) 間充織細胞との混合培養による膀胱腫瘍形成の促進モデルの開発. 石井 健一朗、**佐々木 豪**、加藤 学、伊東 顕二郎、櫻木 求、小田 伸行、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕
三重大学大学院医学系研究科
腎泌尿器外科学
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/urology/>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
佐々木 豪 (SASAKI Takeshi)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 20644941

(2)研究分担者

(3)連携研究者