

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591841

研究課題名（和文）間質細胞内 TGF $\beta$ /BMP シグナルに制御される前立腺の異常増殖機構研究課題名（英文）Stromal TGF $\beta$ /BMP signals regulate abnormal growth in prostate

研究代表者 石井 健一郎 (Ishii, Kenichiro)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90397513

## 研究成果の概要：

本研究により、TGF $\beta$ /BMP シグナルの活性化が前立腺間質において筋線維芽細胞様の分化誘導に働くことを示した。よって、TGF $\beta$ 阻害剤により筋線維芽細胞への分化誘導を阻止することが出来れば、肥大症結節の発生や癌細胞の悪性化を抑える新たな治療法や分子標的薬剤の開発に結びつくと考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：腫瘍学

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：間質細胞、TGF $\beta$ /BMP シグナル、細胞分化、泌尿生殖洞、間充織細胞、筋線維芽細胞、線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺肥大症と前立腺癌の発生メカニズムの相違は、前立腺癌は上皮細胞の癌化による細胞および遺伝子レベルでの異常が原因と考えられるが、前立腺肥大症は上皮細胞とともに間質細胞の増殖を伴う腺管構造構築の異常過形成（肥大症結節の出現）と考えられる点である。これら前立腺の異常増殖性疾患が起こる原因の1つに平滑筋細胞の脱分化、すなわち筋線維芽細胞の再出現が考えられる。平滑筋細胞が筋線維芽細胞へと脱分化すると、上皮細胞へパラクライン的に働く

mitogen が再発現し、肥大症結節における新たな腺管構造構築を促進したり、癌細胞の悪性化を支援する可能性が考えられる。

前立腺は全ての哺乳類に存在しているものの、肥大症結節は間質が肥厚なヒトやイヌで自然発症する。しかし、間質が肥厚でないマウスあるいはラットにおいて肥大症結節の自然発生は認められない。申請者は、組織組み替え実験 (tissue recombination) や遺伝子改変マウスを用いた予備検討により、間質細胞内 transforming growth factor beta (TGF $\beta$ )/bone morphogenetic protein (BMP)

シグナルの活性化が、前立腺間質の肥厚をもたらすことを推察し、さらに、肥大症結節や癌といった異常増殖性疾患における平滑筋細胞の脱分化、筋線維芽細胞の増加が間質細胞内 TGF $\beta$ /BMP シグナルに制御されている、という仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究は、申請者が常用する組織組み替え実験という発生生物学的手法に、最新の分子生物学的手法を組み合わせることで、間質誘導型の異常増殖メカニズムを解析するものであり、間質細胞内 TGF $\beta$ /BMP シグナルを人為的に、かつ特異的に制御できれば、新たな治療法や分子標的薬剤の開発に結びつくことが期待される。また、本研究を完結することで、前立腺の異常増殖性疾患を自然発症するヒト前立腺の肥厚で、成熟した平滑筋細胞層の形成に必要な細胞内シグナル伝達経路が明らかになるとともに、肥大症結節や癌周囲でのシグナル異常を認めることができれば、間質細胞からのパラクライン因子に制御される前立腺の異常増殖機構の一端が解明できると考えている。

## 3. 研究の方法

【方法1：ラット胎児泌尿生殖洞間充織細胞の初代培養】

ラット胎児泌尿生殖洞を実体顕微鏡下にて解剖し、トリプシン処理にて上皮と間質を取り分けた。さらに、コラゲナーゼ処理により、間充織細胞 (rUGM) をシングルセルの状態にし、初代培養に用いた。

【方法2：良性ヒト前立腺上皮由来 BPH-1 細胞を用いた組織組み替え実験】

I 型コラーゲン中にて良性ヒト前立腺上皮由来 BPH-1 細胞と、ラット胎児泌尿生殖洞間充織細胞 rUGM もしくは市販のヒト前立腺間質細胞 PrSC を混合し、雄ヌードマウス (8~10 週齢) の腎被膜下へ移植した。

【方法3：遺伝子発現解析】

薬剤処理による間質の分化マーカー mRNA 発現量の変化は、Applied Biosystems 社のリアルタイム PCR システム 7300 を用いて測定し、無処理群と比較検討した。

## 4. 研究成果

本研究は、前立腺の異常増殖性疾患 (肥大症や癌) が起こる原因の 1 つに、TGF $\beta$ /BMP シグナルに制御される平滑筋細胞の脱分化、すなわち筋線維芽細胞の増加があると考え、間質細胞内 TGF $\beta$ /BMP シグナルを人為的に、かつ特異的に制御することを目的としている。

【主題1：TGF $\beta$ シグナルに制御されるラット胎児泌尿生殖洞間充織細胞の増殖・分化】

まず、間質細胞内 TGF $\beta$ /BMP シグナルの変化が間質細胞の増殖や分化を制御していることを、ラット胎児泌尿生殖洞間充織細胞を用いて確認した。

すなわち、胎生 18 日目のラット胎児より泌尿生殖洞間充織細胞 (rUGM) を取り出し、5% 血清含有培地にて初代培養した。血清を含まない培地に変更した後、1 ng/mL TGF $\beta$  もしくは 100 ng/mL SHH (sonic hedgehog) を添加し、2~6 日間の処理を施行した。

rUGM に対して、TGF $\beta$  および SHH は細胞増殖を低下させ、細胞形態は筋細胞様に変化した。そこで、day 2 および day 6 における RNA を回収し、リアルタイム PCR で mRNA 発現量を比較した。筋線維芽細胞の分化マーカーである tenascin-C mRNA は TGF $\beta$  および SHH 処理により顕著に上昇したが、線維芽細胞の分化マーカー vimentin mRNA は減少した。平滑筋細胞の分化マーカーのうち、myosin mRNA は TGF $\beta$  に反応し、g-actin mRNA は SHH に高い反応性を示した。

以上より、ラット胎児泌尿生殖洞間充織細胞の分化・形態的な変化は間質細胞内 TGF $\beta$ /BMP シグナルの活性化に依存していることを確認した。今回、TGF $\beta$  による遺伝子変化が SHH による変化とは一致しなかったことから、線維芽細胞  $\Rightarrow$  筋線維芽細胞  $\Rightarrow$  平滑筋細胞という一連の分化過程が複数の因子に制御されていること、また、それら因子が単独では十分な分化を誘導できない可能性が示唆された。

【主題2：TGF $\beta$ シグナルに制御されるヒト前立腺線維芽細胞の増殖・分化】

次に、市販のヒト前立腺間質細胞 PrSC を用いて、その性状を解析した後、サイトカイン (TGF $\beta$ , sonic hedgehog; SHH)、ステロイドホルモン (DHT, E2)、神経伝達物質 (フェニレフリン; PE) 刺激による細胞増殖や細胞分化の変化を検討した。

まず、間質細胞特異的な遺伝子群の網

羅的発現解析から、PrSCはvimentin, collagen, tenascin -C (TN-C), aSMA陽性の線維芽細胞>筋線維芽細胞であって、myosin, desmin陽性の平滑筋細胞ではないことが示された。次に、細胞増殖については、PEのみが増殖刺激作用を示し、TGFβ処理群は濃度依存的に増殖を低下させた。分化マーカーの発現については、TGFβ処理でcollagen, TN-C, aSMA mRNAが上昇、PE処理ではcollagen mRNAが上昇したものの、SHHやステロイドホルモンでは何の変化も観察されなかった。

以上より、PrSC細胞内TGFβ/BMPシグナルを特異的に刺激すると筋線維芽細胞の性質を増強させることが明らかになった。肥大症や癌周囲の間質では平滑筋細胞が減少し、代わりに上皮細胞の増殖を刺激する筋線維芽細胞が優位になっていることから、TGFβ阻害剤により筋線維芽細胞への分化誘導を阻止することが、肥大症や癌の発生や進展を抑える新たな治療法の確立に寄与すると考えられた。

### 【主題3：間質細胞に依存した良性ヒト前立腺上皮由来BPH-1細胞の腺管構造構築】

最後に、良性ヒト前立腺上皮由来BPH-1細胞(Dr. Haywardが1995年に樹立)を用いて、間質細胞の違いが腺管構造構築に与える影響を組織組み替え実験において検討した。

BPH-1細胞に、線維芽細胞と筋線維芽細胞を含むrUGMを組み合わせると、BPH-1細胞は一部、基底上皮細胞への分化を伴った腺管構造を構築し、腺管周囲の間質はヒト前立腺様の肥厚で成熟した平滑筋細胞層を形成した。しかし、BPH-1細胞にPrSC(主に線維芽細胞)を組み合わせても腺管構造を構築することはなく、BPH-1細胞は無秩序に存在するだけであった。また、PrSCが平滑筋細胞へと分化した形跡も認められなかった。

以上より、前立腺上皮細胞が腺管構造を構築するには線維芽細胞が産生・分泌するmitogenだけでは不十分であり、rUGMが含む筋線維芽細胞の存在が重要である可能性が示唆された。すなわち、前立腺の発生時には筋線維芽細胞が上皮細胞の増殖を刺激し、腺管構造が構築されていくことを基礎実験的に実証するに至った。

## 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) Ishii K, Imamura T, Iguchi K, Arase S, Yoshio Y, Arima K, Hirano K, Sugimura Y. Evidence that androgen-independent stromal growth factor signals promote androgen-insensitive prostate cancer cell growth *in vivo*. *Endocrine-Related Cancer* (in press)
- 2) Li X, Wang Y, Sharif-Afshar AR, Uwamariya C, Yi A, Ishii K, Hayward SW, Matusik RJ, Bhowmick NA. Adult urothelial transdifferentiation to prostate epithelia is mediated by paracrine TGF-β signaling. *Differentiation*, 77: 95-102 (2009)
- 3) Ishii K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Sugimura Y. Role of stromal tenascin-C in mouse prostatic development and epithelial cell differentiation. *Developmental Biology*, 324: 310-319 (2008)
- 4) Kanai M, Ishii K, Kanda H, Ogura Y, Kise H, Arima K, Sugimura Y. Improvement to predict tumorigenic phenotype of androgen-insensitive human LNCaP prostatic cancer cell subline in recombination with rat urogenital sinus mesenchyme. *Cancer Science*, 99: 2435-2443 (2008) (equal contributor)
- 5) Kanda H, Ishii K, Ogura Y, Imamura T, Kanai M, Arima K, Sugimura Y. Naftopidil, a selective alpha-1 adrenoceptor antagonist, inhibits growth of human prostate cancer cells by G1 cell cycle arrest. *International Journal of Cancer*, 122: 444-451, 2008.
- 6) Iguchi K, Ishii K, Nakano T, Otsuka T, Usui S, Sugimura Y, Hirano K. Isolation and characterization of LNCaP sublines differing in hormone sensitivity. *Journal of Andrology*, 28: 670-678, 2007. (equal contributor)
- 7) Ogura Y, Ishii K, Kanda H, Kanai M, Arima K, Wang YZ, Sugimura Y. Bisphenol A induces permanent squamous change in mouse prostatic epithelium. *Differentiation*, 75: 745-756, 2007.

- 8) Uchida K, Kanai M, Yonemura S, Ishii K, Hirokawa Y, Sugimura Y. Proprotein convertases modulate budding and branching morphogenesis of rat ventral prostate. *International Journal of Developmental Biology*, 51: 229-233, 2007.

[学会発表] (計 21 件)

- 1) 第 18 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 21 年 2 月 13-14 日・鹿児島)

エストロゲン様化学物質曝露による前立腺基底上皮細胞の異常増殖機構

石井 健一朗、吉尾 裕子、荒瀬 栄樹、今村 哲也、堀 靖英、有馬 公伸、杉村 芳樹

- 2) 第 18 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 21 年 2 月 13-14 日・鹿児島)

ビスフェノール A 経胎盤曝露によりマウス泌尿生殖洞で発現変動する性分化関連遺伝子群の同定

荒瀬 栄樹、石井 健一朗、五十嵐 勝秀、相崎 健一、小倉 友二、今村 哲也、吉尾 裕子、有馬 公伸、菅野 純、杉村 芳樹

- 3) 第 13 回日本生殖内分泌学会学術集会 (平成 20 年 11 月 29 日・大阪市)

ビスフェノール A 経胎盤投与によりマウス泌尿生殖洞で発現変動する性分化関連遺伝子群の同定

荒瀬 栄樹、石井 健一朗、五十嵐 勝秀、相崎 健一、小倉 友二、今村 哲也、吉尾 裕子、有馬 公伸、菅野 純、杉村 芳樹

- 4) 18th Annual Fall Meeting of the Society for Basic Urologic Research (SBUR) (平成 20 年 11 月 13 日—16 日・Phoenix)

A new therapeutic strategy for targeting tumor stroma in hormone-refractory prostate cancer growth under androgen ablation therapy

Kenichiro Ishii, Tetsuya Imamura,

Kazuhiro Iguchi, Shigeki Arase, Yuko Yoshio, Kiminobu Arima, Kazuyuki Hirano, Yoshiki Sugimura

- 5) 18th Annual Fall Meeting of the Society for Basic Urologic Research (SBUR) (平成 20 年 11 月 13 日—16 日・Phoenix)

Role of stromal tenascin-C in mouse prostatic development and epithelial cell differentiation

Kenichiro Ishii, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida, Yoshiki Sugimura

- 6) 第 67 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 20 年 10 月 28 日-10 月 30 日・名古屋市)

アンドロゲン非依存的間質由来シグナルに制御されるアンドロゲン不応性前立腺癌細胞の増殖に関する研究

石井 健一朗、金井 優博、井口 和弘、小倉 友二、有馬 公伸、平野 和行、杉村 芳樹

- 7) 第 67 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 20 年 10 月 28 日-10 月 30 日・名古屋市)

前立腺癌における GNAS1 遺伝子多型の解析

広川 佳史、渡邊 昌俊、鈴木 啓悦、市川 智彦、杉村 芳樹、加藤 貴彦、白石 泰三

- 8) The 3<sup>rd</sup> Greatwall International

Andrology Forum(GIAF) 2008 (平成 20 年 10 月 16-20 日・中国)  
Androgen and prostate tumor microenvironment: Role of stromal signaling in the regulation of androgen-dependent or -independent prostate cancer cells.

Yoshiki Sugimura

- 9) 第 73 回 日本泌尿器科学会東部総会 (平成 20 年 9 月 19-20 日・東京)

【モーニングセミナー】

- 前立腺肥大と癌 -  $\alpha 1$  遮断薬の新しい展開 -  
**杉村 芳樹**
- 10) 第 96 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 20 年 4 月 25 日 - 27 日・横浜市)  
再燃前立腺癌の増殖に関わる間質由来増殖因子の探索  
**石井 健一朗**、今村 哲也、吉尾 裕子、荒瀬 栄樹、有馬 公伸、**杉村 芳樹**
- 11) 第 96 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 20 年 4 月 25 日 - 27 日・横浜市)  
ビスフェノール A 経胎盤投与によるマウス泌尿生殖洞での SF1 発現誘導  
荒瀬 栄樹、**石井 健一朗**、五十嵐 勝秀、相崎 健一、小倉 友二、今村 哲也、吉尾 裕子、有馬 公伸、菅野 純、**杉村 芳樹**
- 12) 第 96 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 20 年 4 月 25 日 - 27 日・横浜市)  
 $\alpha 1$  遮断剤の前立腺組織に及ぼす影響: 間質の線維化に関する組織学的検討  
今村 哲也、**石井 健一朗**、吉尾 裕子、荒瀬 栄樹、曾我 倫久人、木瀬 英明、有馬 公伸、**杉村 芳樹**
- 13) 第 17 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 20 年 2 月 15-16 日・東京)  
ヒト前立腺癌細胞株のアンドロゲン感受性と間質由来増殖因子への応答性  
**石井 健一朗**、今村 哲也、吉尾 裕子、荒瀬 栄樹、有馬 公伸、**杉村 芳樹**
- 14) 第 17 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 20 年 2 月 15-16 日・東京)  
ビスフェノール A 経胎盤投与によりマウス泌尿生殖洞で発現変動した遺伝子群の探索  
荒瀬 栄樹、**石井 健一朗**、五十嵐 勝秀、相崎 健一、小倉 友二、今村 哲也、吉尾 裕子、有馬 公伸、菅野 純、**杉村 芳樹**
- 15) 第 10 回 環境ホルモン学会 (平成 19 年 12 月 10 日 - 11 日・大宮市)  
低用量ビスフェノール A 経胎盤投与によるマウス副生殖腺への影響  
荒瀬 栄樹、**石井 健一朗**、五十嵐 勝秀、相崎 健一、小倉 友二、今村 哲也、吉尾 裕子、有馬 公伸、菅野 純、**杉村 芳樹**
- 16) 47th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology  
(平成 19 年 12 月 1 日 - 5 日・Washington, DC)  
Binucleate Cells Appears in Tenascin-C Knockout Mouse Prostatic Epithelium  
**Kenichiro Ishii**, Kyoko Imanaka - Yoshida, Hideki Kanda, Yuji Ogura, Masahiro Kanai, Kiminobu Arima, Toshimichi Yoshida, **Yoshiki Sugimura**
- 17) 日本泌尿器科学会中部総会 (平成 19 年 11 月 7 日 - 9 日・奈良市)  
前立腺肥大症手術症例における組織病理学的検討: 間質の線維化について  
今村 哲也、**石井 健一朗**、吉尾 裕子、荒瀬 栄樹、曾我 倫久人、木瀬 英明、有馬 公伸、**杉村 芳樹**
- 18) 第 66 回 日本癌学会学術総会 (平成 19 年 10 月 3-5 日・横浜市)  
Tenascin-C regulates epithelial-stromal interactions in mouse prostate  
**石井 健一朗**、今中 恭子、小倉 友二、金井 優博、有馬 公伸、吉田 利通、**杉村 芳樹**
- 19) 第 8 回 ホルモンと癌研究会 (平成 19 年 7 月 27-28 日・東京)  
間質細胞を標的としたアンドロゲン不応性前立腺癌細胞の増殖抑制  
**石井 健一朗**、今村 哲也、井口 和弘、吉尾 裕子、荒瀬 栄樹、有馬 公伸、平野 和行、**杉村 芳樹**

20)第 95 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 19  
年 4 月 14-17 日・神戸市)

前立腺の腺構造構築における前立腺特異  
抗原 PSA の役割

石井 健一郎、Karin Williams、井口 和  
弘、有馬 公伸、平野 和行、Simon W.  
Hayward、杉村 芳樹

21)第 95 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 19  
年 4 月 14-17 日・神戸市)

Naftopidil Inhibits Proliferation of  
Prostate Cancer Cell Lines by Inducing  
G1 Cell Cycle Arrest

神田 英輝、石井 健一郎、小倉 友二、金  
井 優博、今村 哲也、金原 弘幸、有馬 公

伸、杉村 芳樹

6. 研究組織

(1)研究代表者

石井 健一郎 (Ishii, Kenichiro)  
三重大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：90397513

(2)研究分担者

杉村 芳樹 (Sugimura, Yoshiki)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90179151

(3)連携研究者