

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2010 ~ 2012
 課題番号： 22591764
 研究課題名 (和文) 細胞外環境による前立腺・膀胱の発生や形態形成の制御機構
 研究課題名 (英文) Role of extracellular environment on development and organogenesis in prostate and bladder

研究代表者

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

研究成果の概要(和文):組織発生時における形態形成は細胞同士であったり、細胞と細胞外マトリックス (ECM) との相互作用によって制御されている。テネイシン C (TN-C) は主に間質細胞が産生する ECM 分子の 1 つであり、本研究課題では TN-C 欠損マウス泌尿生殖洞間充織細胞 (TN-C KO マウス UGM) における遺伝子発現プロファイルを検討した。その結果、TN-C KO マウス UGM では thymosin β 10 の他、chemotaxis, cell-matrix adhesion, response to wounding, collagen fibril organization に属する遺伝子の発現が減少もしくは消失していることを見出し、間質由来 TN-C シグナルもしくは TN-C 関連シグナルが前立腺の発生や形態形成において重要な役割を担っている可能性を示した。

研究成果の概要(英文):Morphogenesis in tissue development depends on the relationships among cells, the extracellular matrix (ECM), and other support structures. Tenascin-C (TN-C) is a hexameric glycoprotein of the ECM produced mainly by stromal cells. In this study, we evaluated the gene expression profiles in TN-C knockout (TN-C KO) mouse urogenital sinus mesenchyme (mUGM). In TN-C KO mUGM, the expressions of thymosin β 10 and specific genes related to chemotaxis, cell-matrix adhesion, response to wounding, and collagen fibril organization were decreased or disappeared as compared to those in WT mUGM, suggesting that stromal TN-C signals and/or related signals might play an important role in development and organogenesis of prostate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

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：細胞外マトリックス、前立腺、膀胱、テネイシン C、泌尿生殖洞、二核細胞

1. 研究開始当初の背景

これまで、細胞外マトリックス (ECM) 分子は単に細胞の隙間を埋めている「物質」と考えられてきたが、近年の目覚ましい研究の発展により、細胞の生存・増殖・分化に関わる

数々のシグナル伝達の間となることが分かってきた。形態形成には様々な分泌型シグナルが寄与しており、それらは産生細胞から周囲の細胞へ向けて拡散し、その分泌量や濃度勾配の程度によって、組織の形態が決まって

いく。従って、個体や組織の形態形成が繰り返し、秩序正しく進行するためには分泌型シグナルの分泌や拡散が厳密にコントロールされていなければならない。このような形態形成を司る細胞外環境は新しいコンセプトの創出が期待される未開拓な研究領域である。

テネイシン C (TN-C)は、主に間質細胞が産生するECM分子の1つで、胎児期の形態形成、癌、創傷治癒、組織再生に関与していることが知られている。特に、本分子が他のECM分子と大きく異なる特徴として、一過性に限局した部位に発現することと、反接着・細胞遊走促進に作用することが挙げられる。すなわち、TN-Cはコラーゲンやフィブロネクチンのように常在するECM分子ではなく、形態形成を含む組織の変化(組織リモデリング)に応じて消長する周辺有事物質という大きな特徴を有することから、細胞外環境を構成するECM分子のうちでも非常に興味深い因子と考えている。

本研究課題では、いま最も注目されている再生医療も視野に入れて、我々が確立してきた発生生物学的手法と遺伝子改変マウスを用いた解析を組み合わせて、細胞外環境による前立腺・膀胱の発生や形態形成の制御機構を科学的に解き明かすことが期待された。

2. 研究の目的

本研究課題では、細胞外環境を形成するECM分子：テネイシン C (TN-C)による前立腺・膀胱の発生や形態形成の制御機構を解析するために、テネイシン C 欠損 (TN-C KO)マウスを用いた病理組織学的な解析や形態学的な解析、さらに網羅的な遺伝子発現解析を施行する。これらによって、細胞外環境を形成するECM分子が前立腺・膀胱の発生や形態形成にどのように関わっているのかを深く理解し、間質-上皮の相互作用だけでは組織の発生や形態形成を説明できないことを科学的に証明することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス泌尿生殖洞間充細胞の採取

胎生16日目のTN-C KOマウスおよびwild type (WT)マウス泌尿生殖洞 (urogenital sinus: UGS)を実体顕微鏡下にて解剖し、トリプシン処理にて上皮 (urogenital sinus epithelium: UGE)と間質 (urogenital sinus mesenchyme: UGM)を取り分けた。

網羅的遺伝子発現解析

胎生16日目のTN-C KOもしくはWTマウスUGMにおける遺伝子発現を Mouse Genome 430 2.0 Array へのハイブリダイゼーションと解析ソフト GeneSpring® 7.3.1 を活用して比較解析した。

in vivo 組織組み替え実験

I型コラーゲン中にて成獣マウス膀胱上皮細胞と、TN-C KOもしくはWTマウスUGM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。

4. 研究成果

平成22年度

前立腺は男性ホルモン(アンドロゲン)依存性の臓器であり、その発生・分化・成長にはアンドロゲンが必要不可欠である。そこで、3週令のTN-C KOマウス(♂)もしくはWTマウス(♂)に3mg/Kg ジヒドロテストステロン(DHT)を皮下注射し、血中アンドロゲン濃度を高めたときの変化を病理組織学的に検討した。

【検討1】DHT投与から6, 12, 24時間後にマウスを屠殺し、体重および泌尿生殖器(前立腺、膀胱、尿道)の重量を測定したが、明らかな差は観察されなかった。

【検討2】E-カドヘリンの免疫染色により、上皮細胞における二核細胞の出現率を検したが、DHT投与により二核細胞の出現率に有意な差は認めなかった。

以上の結果から、TN-C KOマウス前立腺における二核細胞の出現は、前立腺におけるアンドロゲン受容体シグナルの活性化の有無とは関係ないことが判明した。

さらに、次年度に予定している胎生期間充細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析に対する予備検討として、TN-C KOマウスおよびWTマウスのUGS(E15-E17)を取り出し、トリプシン処理および実体顕微鏡下での解剖にてUGEとUGMを選別し、当科のプロトコルに従って初代培養できることを確認した。

平成23年度

本年度は、胎生16日目のTN-C KOマウスおよびWTマウスUGSからtotal RNAを抽出し、two-Cycle Target Labeling法によるcDNA合成、そして、Mouse Genome 430 2.0 Array

へのハイブリダイゼーションと解析ソフト GeneSpring® 7.3.1による比較解析を行った。

その結果、WTマウスと比較してTN-C KOマウスで発現が減少もしくは消失している遺伝子は、chemotaxis, cell-matrix adhesion, response to wounding, collagen fibril organizationに属するものが多かった。さらに、TN-C KOマウスではthymosin β 10の発現がWTマウスの1/10以下に減少していることを見出した。

thymosin β 10は癌遺伝子Rasを阻害し、細胞分裂や細胞増殖、血管新生を抑制する。さらに、反接着作用を有し、細胞をアポトーシスへと誘導する働きが報告されている。これまでに我々が報告した、TN-C KOマウス前立腺上皮細胞に出現する二核細胞は、正常なサイトカイネーシス（細胞質分裂）が起こらないことに起因すると考えられる。つまり、TN-Cの遺伝子欠損により、反接着作用を有するthymosin β 10発現が減少し、正常なサイトカイネーシスが起こらないことで二核細胞の出現に至る可能性が示唆された。

平成 24 年度

本年度は、TN-C KOマウス膀胱を病理組織学的に解析し、膀胱上皮細胞に対するTN-Cの役割を検討した。

【検討1】生後4週齢から4週間毎にTN-C KOマウスを屠殺し、膀胱重量の測定や組織型を病理組織学的に評価したが、二核細胞の出現等の異常は観察されなかった。

【検討2】成獣マウス膀胱上皮細胞に胎児マウスUGMを組み合わせて前立腺上皮細胞へと誘導する組織組み替え実験を施行したところ、TN-C KOマウスUGMは成獣マウス膀胱上皮細胞を前立腺上皮細胞へと誘導できなかった。

以上の結果から、TN-Cは前立腺の腺上皮細胞におけるサイトカイネーシス（細胞質分裂）に重要な役割を担っているものの、膀胱上皮細胞のサイトカイネーシスには影響していないことが判明した。また、TN-Cの遺伝子欠損に伴いUGMでは種々の遺伝子発現が低下もしくは消失していることから、膀胱上皮細胞から前立腺上皮細胞への分化誘導を起こすことができなかったと考えられた。

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 10 件）

- 1) Nishikawa K, Soga N, Ishii K, Kato M, Iwamoto Y, Hori Y, Etoh M, Ohkawara T, Yamada T, Uchida K, Kise H, Arima K, Narita M, Shiraishi T, Sugimura Y. Manserin as a novel histochemical neuroendocrine marker in prostate cancer. *Urologic Oncology* (in press) (査読有り)
- 2) Iguchi K, Fukami K, Ishii K, Otsuka T, Usui S, Sugimura Y, Hirano K. Low androgen sensitivity is associated with low levels of Akt phosphorylation in LNCaP-E9 cells. *Journal of Andrology*, 33: 660-666, 2012. (査読有り)
- 3) Iguchi K, Hayakawa Y, Ishii K, Matsumoto K, Usui S, Sugimura Y, Hirano K. Characterization of the low pH/low nutrient-resistant LNCaP cell subline LNCaP-F10. *Oncology Reports*, 28: 2009-2015, 2012. (査読有り)
- 4) Ishii K, Mizokami A, Tsunoda T, Iguchi K, Kato M, Hori Y, Arima K, Namiki M, Sugimura Y. Heterogeneous induction of carcinoma-associated fibroblast-like differentiation in normal human prostatic fibroblasts by co-culturing with prostate cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112: 3604-3611, 2011. (査読有り)
- 5) Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y. Endocrine disrupter bisphenol A increases *in situ* estrogen production in mouse urogenital sinus. *Biology of Reproduction*, 84: 734-742, 2011. (査読有り)
- 6) Hori Y, Ishii K, Kanda H, Iwamoto Y, Nishikawa K, Soga N, Kise H, Arima K, Sugimura Y. Naftopidil, a subtype selective α_1 -adrenoceptor antagonist, suppresses human prostate tumor growth by altering interactions between tumor cells and stroma. *Cancer Prevention Research*, 4: 87-96, 2011. (査読有り)

- 7) Otsuka T, Iguchi K, Fukami K, **Ishii K**, Usui S, **Sugimura Y**, Hirano K. Androgen receptor W741C and T877A mutations in AIDL cells, an androgen independent subline of prostate cancer LNCaP cells. *Tumor Biology*, 32: 1097-1102, 2011. (査読有り)
- 8) Imamura T, **Ishii K**, Kanda H, Arase S, Yoshio Y, Hori Y, Soga N, Kise H, Arima K, **Sugimura Y**. Structural changes in α_1 -adrenoceptor antagonist-treated human prostatic stroma. *Clinical and Experimental Medicine*, 10: 99-106, 2010. (査読有り)
- 9) Tanaka ST, **Ishii K**, DeMarco RT, Pope JC 4th, Brock JW 3rd, Hayward SW. Endodermal origin of bladder trigone inferred from mesenchymal-epithelial interactions. *Journal of Urology*, 183: 386-391, 2010. (査読有り)
- 10) Yoshio Y, **Ishii K**, Arase S, Hori Y, Nishikawa K, Soga N, Kise H, Arima K, **Sugimura Y**. Effect of transforming growth factor α overexpression on urogenital organ development in mouse. *Differentiation*, 80: 82-88, 2010. (査読有り)

[学会発表] (計 39 件)

- 1) 第 22 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 25 年 3 月 8-9 日・高知市)
エストロゲンにより誘導される前立腺基底上皮細胞過増殖の分子機構
加藤 学、**石井 健一朗**、佐々木 豪、岩本 陽一、堀 靖英、山田 泰司、有馬 公伸、白石 泰三、**杉村 芳樹**
- 2) 第 28 回 前立腺シンポジウム (平成 24 年 12 月 8-9 日・品川)
前立腺疾患の発生・進展における間質リモデリングの役割
石井 健一朗、加藤 学、白石 泰三、**杉村 芳樹**
- 3) 25th Annual Fall Meeting of the Society for Basic Urologic Research (SBUR) (平成 24 年 11 月 15-18 日・Florida)
A potential role of stromal interleukin-6 as paracrine-acting angiogenic cytokine in prostate cancer microenvironment
Ishii K, Kato M, Iwamoto Y, Sasaki T, Iguchi K, Mizokami A, Arima K, Shiraishi T, **Sugimura Y**
- 4) 25th Annual Fall Meeting of the Society

for Basic Urologic Research (SBUR) (平成 24 年 11 月 15-18 日・Florida)

A potential role of TGF α in estrogenically induced squamous metaplasia in mouse prostate

Kato M, **Ishii K**, Sasaki T, Iwamoto Y, Hori Y, Yamada Y, Arima K, Shiraishi T, **Sugimura Y**

- 5) 第 71 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 24 年 9 月 19-21 日・札幌市)

癌関連線維芽細胞由来インターロイキン-6 による前立腺癌-間質のパラクライン・ループ活性化機構

加藤 学、**石井 健一朗**、井口 和弘、溝上 敦、堀 靖英、山田 泰司、有馬 公伸、白石 泰三、**杉村 芳樹**

- 6) 第 31 回 日本アンドロロジー学会学術大会 (平成 24 年 6 月 29-30 日・神戸市)

TGF α -EGF 受容体シグナルを介したエストロゲンによる前立腺基底上皮細胞の異常増殖と扁平上皮化生の誘導機構

加藤 学、**石井 健一朗**、岩本 陽一、堀 靖英、山田 泰司、有馬 公伸、白石 泰三、**杉村 芳樹**

- 7) The 2012 American Urological Association (AUA) Annual Meeting (平成 24 年 5 月 19-23 日・Atlanta)

Aberrant activation of paracrine loop between prostate cancer cells and carcinoma-associated fibroblasts by overexpression of stromal interleukin-6

Ishii K, Iwamoto Y, Kato M, Iguchi K, Mizokami A, Arima K, Shiraishi T, **Sugimura Y**

- 8) The 2012 American Urological Association (AUA) Annual Meeting (平成 24 年 5 月 19-23 日・Atlanta)

Up-regulation of fibroblast growth factor 2 in castration-induced mouse prostate stromal remodeling lead to imbalance of basal epithelial-stromal interactions

Kato M, **Ishii K**, Iwamoto Y, Hori Y, Yamada Y, Arima K, Shiraishi T, **Sugimura Y**

- 9) 第 100 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 24 年 4 月 21 日-24 日・横浜市)

前立腺癌-間質相互作用: 去勢後の前立腺間質のリモデリングと増殖因子の解析

加藤 学、**石井 健一朗**、岩本 陽一、堀 靖英、神田 英輝、山田 泰司、有

- 馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
- 10) 第 100 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 24 年 4 月 21 日-24 日・横浜市)
ヒト前立腺癌移植モデルにおける α_1 アドレナリン受容体遮断薬が放射線感受性に与える影響
岩本 陽一、神田 英輝、石井 健一朗、加藤 学、堀 靖英、山田 泰司、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 11) 第 21 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 24 年 2 月 10-11 日・札幌市)
癌間質由来インターロイキン-6 による前立腺癌-間質のパラクライン・ループ活性化機構
石井 健一朗、岩本 陽一、加藤 学、井口 和弘、溝上 敦、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
- 12) 第 21 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 24 年 2 月 10-11 日・札幌市)
去勢後の前立腺間質リモデリングによる FGF2 発現上昇が基底上皮-間質相互作用に及ぼす影響
加藤 学、石井 健一朗、岩本 陽一、堀 靖英、山田 泰司、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
- 13) 第 21 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 24 年 2 月 10-11 日・札幌市)
ヒト前立腺癌移植モデルにおける α_1 アドレナリン受容体遮断薬が放射線感受性に与える影響
岩本 陽一、神田 英輝、石井 健一朗、加藤 学、堀 靖英、山田 泰司、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 14) 第 70 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 23 年 10 月 3-5 日・名古屋市)
前立腺癌-間質相互作用を標的にした新規治療戦略
石井 健一朗、堀 靖英、杉村 芳樹
- 15) 9th World Congress on Urological Research (平成 23 年 9 月 15 日-9 月 17 日・Austria, Innsbruck)
Heterogeneous induction of carcinoma-associated fibroblast-like differentiation in normal human prostatic fibroblasts by co-culturing with prostate cancer cells
Ishii K, Mizokami A, Tsunoda T, Iguchi K, Kato M, Hori Y, Arima K, Namiki M, Sugimura Y
- 16) 9th World Congress on Urological Research (平成 23 年 9 月 15 日-9 月 17 日・Austria, Innsbruck)
Mechanisms of prostatic structure maintenance by actions of androgen
Kato M, Ishii K, Iwamoto Y, Hori Y, Yamada Y, Arima K, Shiraishi T, Sugimura Y
- 17) 第 30 回 日本アンドロロジー学会学術大会 (平成 23 年 7 月 22-23 日・東京)
動物モデルと前立腺増殖機構
石井 健一朗、加藤 学、杉村 芳樹
- 18) 第 30 回 日本アンドロロジー学会学術大会 (平成 23 年 7 月 22-23 日・東京)
アンドロゲン依存的な前立腺組織構築の維持機構
加藤 学、石井 健一朗、岩本 陽一、堀 靖英、山田 泰司、曾我 倫久人、有馬 公伸、白石 泰三、杉村 芳樹
- 19) 第 57 回 日本薬学会東海支部総会・大会 (平成 23 年 7 月 9 日・名古屋市)
前立腺癌細胞株 LNCaP 細胞の亜株のアンドロゲン応答性変化機序
大塚 崇史、井口 和弘、深見 和宏、石井 健一朗、臼井 茂之、杉村 芳樹、平野 和行
- 20) 第 99 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 23 年 4 月 21 日-24 日・名古屋市)
ヒト前立腺癌細胞および間質細胞に対するフェニルピペラジン誘導体の細胞周期阻害作用
石井 健一朗、堀 靖英、岩本 陽一、西川 晃平、加藤 学、神田 英輝、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 21) 第 99 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 23 年 4 月 21 日-24 日・名古屋市)
前立腺癌組織における新規神経内分泌物質 Manserin 発現の検討
西川 晃平、曾我 倫久人、岩本 陽一、堀 靖英、石井 健一朗、木瀬 英明、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 22) 第 20 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 23 年 3 月 11-12 日・津市)
ヒト前立腺癌間質モデルの作製と発生メカニズムの解析
石井 健一朗、溝上 敦、西川 晃平、岩本 陽一、加藤 学、曾我 倫久人、木瀬 英明、有馬 公伸、並木 幹夫、杉村 芳樹
- 23) 第 20 回 泌尿器科分子・細胞研究会 (平成 23 年 3 月 11-12 日・津市)
前立腺癌組織における新規神経内分泌物質 Manserin 発現の検討
西川 晃平、曾我 倫久人、加藤 学、岩本 陽一、石井 健一朗、山田 泰司、有馬 公伸、杉村 芳樹

- 24) 第 26 回 前立腺シンポジウム (平成 22 年 12 月 11-12 日・品川)
胎生期ビスフェノール A 曝露による前立腺の異常増殖機構
石井 健一朗、荒瀬 栄樹、吉尾 裕子、杉村 芳樹
- 25) 第 69 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 22 年 9 月 22-24 日・大阪市)
Heterogeneity of carcinoma-associated fibroblast-like differentiation in normal human prostatic fibroblasts
石井 健一朗、堀 靖英、溝上 敦、山田 泰司、有馬 公伸、並木 幹夫、杉村 芳樹
- 26) 第 69 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 22 年 9 月 22-24 日・大阪市)
Phenylpiperazine derivatives induce G1 cell cycle arrest in human prostate cancer cells and stromal cells
堀 靖英、石井 健一朗、山田 泰司、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 27) 第 69 回 日本癌学会総会学術総会 (平成 22 年 9 月 22-24 日・大阪市)
Experimental approach targeting tumor-stromal interactions in prostate cancer microenvironment
杉村 芳樹、石井 健一朗
- 28) 38th Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers (ISOBM) (平成 22 年 9 月 3-8 日・Munich)
Characterization of androgen-low sensitive LNCaP subline, LNCaP-E9 cells
Iguchi K, Fukami K, Ishii K, Usui S, Sugimura Y, Hirano K
- 29) The 2010 American Urological Association (AUA) Annual Meeting (平成 22 年 5 月 28 日-6 月 3 日・San Francisco)
Biological effects of fetal exposure to bisphenol A on urogenital sinus
Ishii K, Arase S, Yoshio Y, Igarashi K, Aisaki K, Hori Y, Nishikawa K, Soga N, Kise H, Arima K, Kanno J, Sugimura Y
- 30) The 2010 American Urological Association (AUA) Annual Meeting (平成 22 年 5 月 28 日-6 月 3 日・San Francisco)
Unique growth-inhibitory effects of subtype selective α_1 -adrenoceptor

antagonists on human prostate cancer cells

Hori Y, Ishii K, Kanda H, Nishikawa K, Yoshio Y, Soga N, Kise H, Arima K, Sugimura Y

- 31) 第 98 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 22 年 4 月 26 日-30 日・盛岡市)
前立腺基底上皮細胞の生物学的特性: 増殖因子と性ホルモンの影響
吉尾 裕子、石井 健一朗、堀 靖英、西川 晃平、曾我 倫久人、木瀬 英明、有馬 公伸、杉村 芳樹
- 32) 第 98 回 日本泌尿器科学会総会 (平成 22 年 4 月 26 日-30 日・盛岡市)
 α_{1a} アドレナリン受容体選択性遮断薬 Silodosin による癌微小環境を標的とした前立腺癌増殖抑制メカニズム
堀 靖英、石井 健一朗、神田 英輝、西川 晃平、吉尾 裕子、曾我 倫久人、木瀬 英明、有馬 公伸、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

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

(2) 研究分担者

長谷川 嘉弘 (HASEGAWA YOSHIHIRO)

三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 10402687

石井 健一朗 (ISHII KENICHIRO)

三重大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 90397513

(3) 連携研究者