

前立腺がんにおける  
3-O-硫酸化ヘパラン硫酸を介した  
去勢抵抗性獲得機構の解明

2023 年 9 月

太田 隼人

# 目次

1. 序論.....	4
2. 方法.....	10
細胞培養.....	10
<i>HS3ST1</i> の一過性ノックダウン(KD).....	10
リアルタイム PCR と RNA-seq.....	10
細胞増殖アッセイ.....	11
Western blot.....	11
フローサイトメトリー.....	13
免疫染色.....	13
培養液に添加した EGF の局在の観察.....	14
異種移植腫瘍モデル.....	14
HPLC を用いた HS の組成分析.....	14
ヘパリンから 3-O-硫酸化オリゴ糖の抽出.....	15
統計解析.....	15
3. 結果.....	16
ヒト前立腺がん細胞株 C4-2 はホルモン非依存的に増殖する.....	16
ホルモン非存在下で C4-2 細胞では EGFR-ERK1/2 シグナルが活性化する.....	18
ホルモン非存在下で C4-2 細胞では <i>HS3ST1</i> の発現が増加する.....	20
ホルモン非存在下で C4-2 細胞では 3-O-硫酸化オリゴ糖が増加する.....	24
<i>HS3ST1</i> が合成する 3-OS HS は、C4-2 のホルモン非存在下の増殖に必要である...	26
<i>HS3ST1</i> が合成する 3-OS HS は、CRPC における EGFR-ERK1/2 シグナルの活性化 に必要である.....	27

<i>HS3ST1</i> は AR シグナルの下流で抑制されている .....	33
CRPC の増殖は EGFR シグナルに依存している .....	34
4. 考察 .....	40
5. 結論 .....	44
6. 謝辞 .....	46
7. 参考文献 .....	47

## 1. 序論

前立腺がんは日本やアメリカの男性の間で最も罹患数の多い高いがんである(1)。通常、テストステロンなどのアンドロゲンが、細胞質のアンドロゲン受容体(AR: Androgen Receptor)に結合し、その後 AR が核内で、増殖に関わる遺伝子の発現を促進することでホルモン依存的に前立腺がんが増殖する(2)。また、前立腺特異抗原(PSA: Prostate Specific Antigen)は、AR シグナルの下流遺伝子であり、前立腺がんのバイオマーカーとして診断に用いられる(3)。

そのため、前立腺がんの増殖を抑制するために去勢などのアンドロゲン除去療法(ADT: Androgen Depleted Therapy)が行われるが、一部のがん細胞は ADT に耐性を持ち、ホルモン非依存的に増殖することが問題となっている。ADT への耐性を獲得した前立腺がんは去勢抵抗性前立腺がん(CRPC: Castration-Resistant Prostate Cancer)と呼ばれる。CRPC は通常の前立腺がんとは増殖メカニズムが異なり、既存の抗がん剤の効果も小さく、未だ CRPC に対して効果的な治療法は確立されていない。CRPC のホルモン非依存的な増殖は、特に上皮成長因子受容体(EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor)シグナルや IL-6/STAT3 シグナル伝達などの活性化に起因すると考えられている(図 1)。ホルモン依存的に増殖する前立腺がん細胞よりも、ホルモン非依存的に増殖する前立腺がん細胞において EGFR の発現が増加することが報告されている(4,5)。さらに、EGFRシグナルの下流因子である活性化 ERK1/2 の発現が、前立腺がん患者の転移性 CRPC で上昇することが報告されている(6,7)。しかし、CRPC における、EGFR-ERK1/2 シグナル活性化の詳細な分子メカニズムは、ほとんど明らかになっていない。

シグナル伝達は、細胞膜上の受容体とリガンド分子の結合によって引き起こされる。EGFR シグナルに関わる受容体の EGFR ファミリーには EGFR、HER2、HER3、HER4 が存在する(8)。受容体にリガンドが結合すると、EGFR ファミリーはホモダイマーもしくはヘテロダイマーを形成し、下流のシグナル分子のリン酸化を促進する。EGF と heparin binding EGF (HB-EGF)が EGFR シグナルのリガンドとしてよく知られている。EGF は EGFR のみに結合し、HB-EGF は EGFR と HER4 に結合し、EGFR-ERK1/2 シグナルを活性化する。



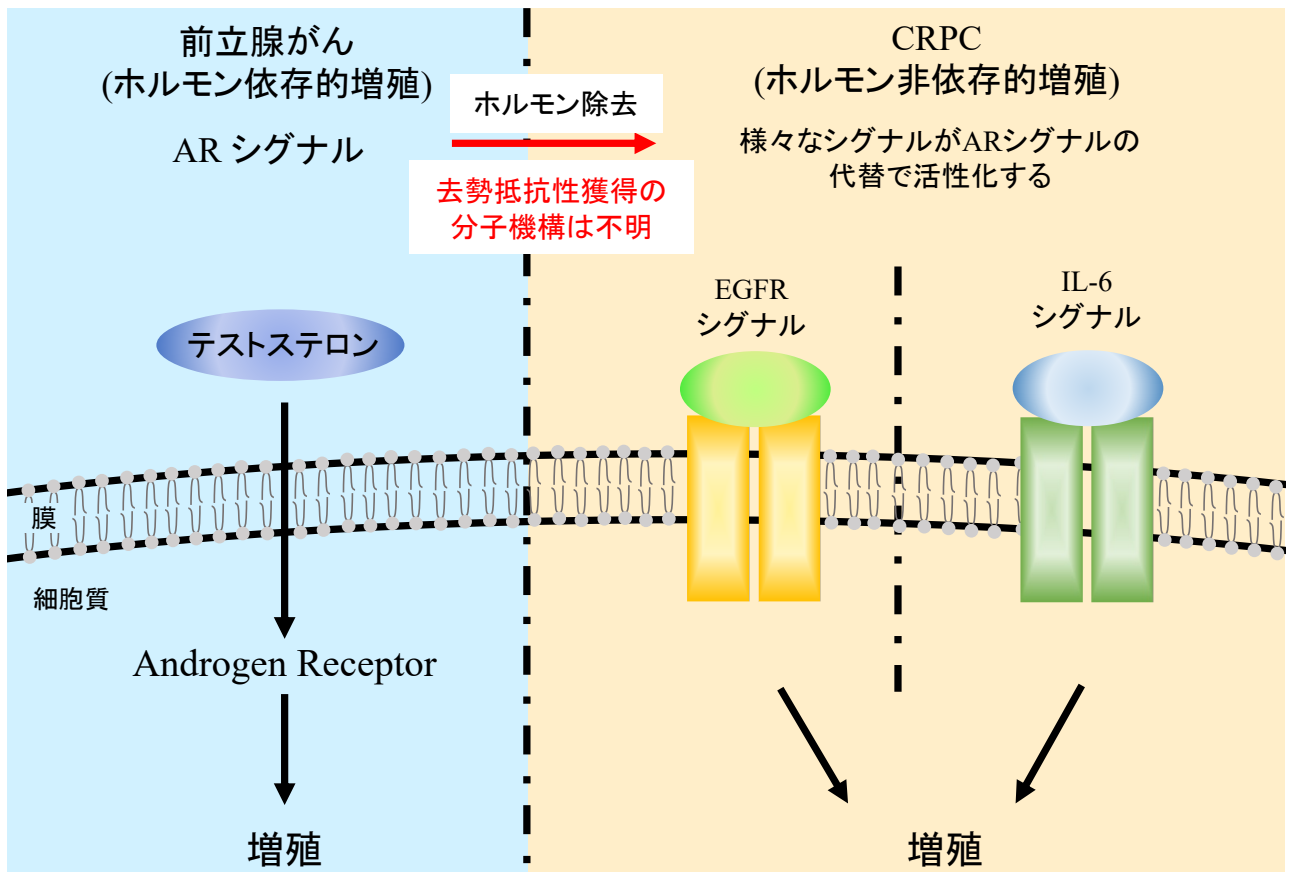


図 1. 前立腺がんの去勢抵抗性獲得

前立腺がんはテストステロンなどのアンドロゲンホルモン依存的に増殖する。細胞質でアンドロゲンが AR に結合し、AR は核内で増殖に関わる遺伝子の発現を促進する。ホルモン除去療法をおこなった後、一部の細胞が抵抗性を示してホルモン非依存的に増殖し生き残ることがある。この細胞を去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)と呼ぶ。CRPC は、EGFR シグナルや IL-6 シグナルなどの、他のシグナル経路を介して増殖することが報告されている。しかし、去勢抵抗性獲得の詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。

リガンド分子が受容体に結合するためには、共受容体を必要とする場合が多い。細胞表面に存在する様々な糖鎖の中で、グリコサミノグリカン(GAG)はシグナル伝達において、重要な役割を果たすことが知られている。GAG には、ヘパラン硫酸(HS)、コンドロイチン硫酸(CS)、デルマタン硫酸(DS)、ケラタン硫酸(KS)、ヒアルロン酸(HA)が含まれる。GAG の中でも硫酸化 GAG は、シグナル伝達においてリガンド分子の共受容体として働く。高硫酸化 CS 構造である CS-E は Wnt3a と結合し、Wnt3a- $\beta$ -CATENIN シグナルを促進することが報告されている(9)。さらに、我々のグループからは、DS がマウス胚性幹細胞(ESC: Embryonic Stem Cell)において骨形成タンパク質(BMP4: Bone Morphogenetic Protein 4)シグナルの活性

化に必要であり、未分化性を維持することや、高硫酸化 HA がヒト人多能性幹細胞(iPSC: induced Pluripotent Stem Cell)の未分化性維持に必要な塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF: basic Fibroblast Growth Factor)シグナルを促進することを報告した(10-11)。HS の機能については、我々や他のグループが、FGF、Wnt、BMP4、Fas および Hedgehog などのリガンドに結合することで、マウス ESC をはじめ、様々な細胞種でシグナル伝達を制御することが報告した(12-16)。HB-EGF もヘパリン結合ドメインを有しており、ヘパラン硫酸と結合して、受容体に結合する(17)。一方で、EGF はヘパリン結合ドメインを持っていないため、ヘパラン硫酸に結合しないと考えられている。

HS はゴルジ体内で、コアタンパク質のセリン残基上の結合領域四糖[GlcA-Gal-Gal-Xyl-(Ser)]に引き続いて、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とグルクロン酸(GlcA)の二糖繰り返し構造として合成される(図 2)。二糖繰り返し構造は Exostosins (EXTs) および EXT-like proteins (EXTLs) によって合成される(18)。そして、硫酸基転移酵素が伸長された二糖繰り返し構造に対して段階的に硫酸基を転移する(19)。初めに、*N*-deacetylase/ *N*-sulfotransferases (NDSTs) による GlcNAc の *N*-硫酸化が行われる。グルクロン酸の *N*-硫酸化が最初に行われた後に、以降の硫酸化修飾が進む。次に、一部の GlcA 基は、GlcA C5-epimerase (GLCE) によってイズロン酸(IdoA)に異性化される。Heparan sulfate 2-*O*-sulfotransferase (HS2ST) は、GlcA および IdoA の C2 位に硫酸基を転移する。さらに、HS 6-*O*-sulfotransferases (HS6STs) は *N*-硫酸化されたグルコサミン(GlcNS)の C6 位を硫酸化し、最後に、HS 3-*O*-sulfotransferases (HS3STs) が GlcNS の C3 位を硫酸化する(20)。それぞれの合成ステップには複数の酵素が関与している。

様々な HS 構造は高速液体クロマトグラフィー(HPLC: High Performance Liquid Chromatography)などの構造解析によって同定および定量化することができる。しかし、HS の 3-*O*-硫酸化はヘパリン分解酵素による HS の分解を妨げるため、3-*O*-硫酸化 HS(3-OS HS)はヘパリン分解酵素耐性オリゴ糖として存在する(21-24)。したがって、3-OS HS 構造の同定と定量化は依然として困難となっている。3-OS HS は、Antithrombin III と結合することで抗凝固活性を示すことや、ヘルペスウイルス感染にも関与しているなど様々な機能を持つことが報告されており、各種細胞において機能を解明するためにも構造の定量や発現変化を明らかにすることは重要である(25-27)。本研究では、3-OS HS 構造を検出する方法として、HPLC

によるヘパリン分解酵素耐性オリゴ糖ピークの定量とともに、Antithrombin III とレクチン(変異型コクリン)を使用したフローサイトメリー解析を行った。3-OS HS の中でも Antithrombin III によって認識される構造と認識されない構造が存在し、Antithrombin III は HS3ST1 が合成する 3-OS HS 構造を中心とした五糖構造を認識することが明らかになっている(25,28,29)。また、東京大学・山本先生との共同研究によって、3-OS HS 構造を含む硫酸化 GAG を認識する変異型コクリン( $\Delta vWA2$ )をフローサイトメリー解析に使用した(30)。本研究では、これらの多面的なアプローチから 3-OS HS 構造の発現変化を検討した。

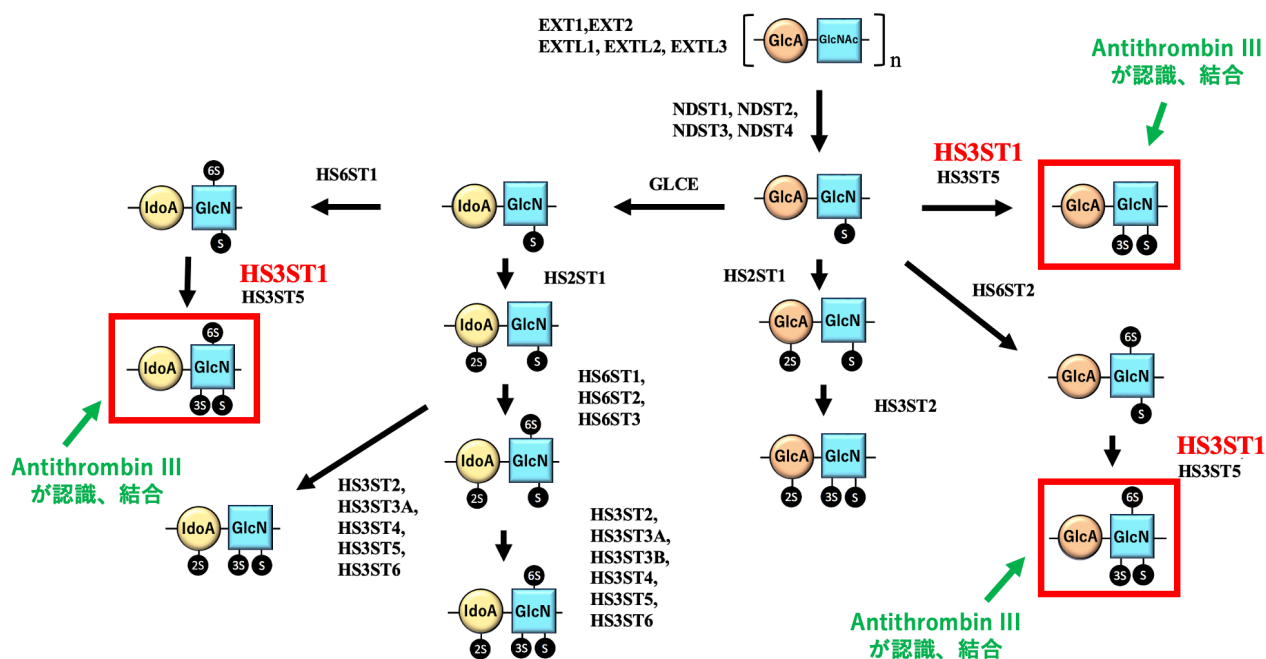


図 2. HS の合成経路

HS は *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) とグルクロン酸 (GlcA) の二糖繰り返し構造で構成される。一部の GlcA は GLCE によって、イズロン酸 (IdoA) に異性化される。NDSTs によるグルクロン酸の *N*-硫酸化を始めとして、複数の硫酸転移酵素による硫酸化が順番に行われる。Antithrombin III は HS3ST1 が合成する 3-OS HS (赤枠) を中心とした五糖配列を認識し、結合する。

本研究では、前立腺がんがホルモン依存的増殖からホルモン非依存的増殖に切り替わり、去勢抵抗性を獲得する分子機構を明らかにすることを目的とした。前立腺がん細胞のホルモン依存的な増殖と、CRPC のホルモン非依存的な増殖の違いを明確にするために、ホルモン存在下およびホルモン非存在下の両方の培養条件で増殖することが可能なヒト前立腺がん細胞株 C4-2 を用いて実験を行った(31)。代表

的な前立腺がん細胞として、LNCaP 細胞株がよく研究に使用されている。LNCaP はリンパ節転移した前立腺がん由来の細胞株であり、ホルモン依存的な増殖のみを示す。LNCaP を去勢したヌードマウスに移植し、去勢抵抗性を獲得しホルモン非依存的にも増殖することができるようになった細胞株が C4-2 細胞株である。他にも、よく研究に使用されてきた去勢抵抗性前立腺がん細胞株として、PC3 や DU145 がある(32,33)。PC3 は骨転移した CRPC、DU145 は脳転移した CRPC 由来の細胞株である。C4-2 とは異なり、PC3 と DU145 は AR を発現していない。すなわち、C4-2 はホルモン依存的、および非依存的な増殖の両方が可能であるが、PC3 と DU145 は AR が発現していないため、ホルモン非依存的な増殖のみを示す。本研究では、ホルモン依存的な増殖環境として Fetal Bovine Serum (FBS)含有培地を使用し、ホルモン非依存的な増殖環境として Charcoal Stripped Serum (CSS) 含有培地を使用して C4-2 を培養した。

本研究は、前立腺がんの去勢抵抗性獲得におけるヘパラン硫酸の機能に着目し、HS3ST1 が合成する 3-OS HS が CRPC における EGFR-ERK1/2 シグナルの活性化に必要であるという新たな分子メカニズムを明らかにした。3-OS HS を介して EGF と HB-EGF が EGFR に結合し活性化することがわかった。EGF が HB-EGF のようにヘパリン結合ドメインを持たないにも関わらず、3-OS HS が EGF の共受容体として機能することを解明したことは EGFR シグナルの活性化メカニズムの理解を深める上で重要である。

本研究では、ChiP シークエンスのデータベースである ChiP-Atlas を用いて、ヘパラン硫酸の合成と硫酸化に関わる酵素の転写が AR によって制御されているかを網羅的に検索した(34)。ホルモン存在下とホルモン非存在下の C4-2 において、AR によって転写促進される遺伝子、AR によって転写抑制される遺伝子、AR 非依存的に制御される遺伝子の 3 つに大別できた。HS3ST1 は AR によって転写抑制されることが考えられ、本研究は HS3ST1 を介した AR シグナルと EGFR シグナルのクロストークも明らかにした。

さらに本研究は、異種移植腫瘍モデルにおいて抗がん剤をマウスに投与する実験を行い、去勢と並行して EGFR-ERK1/2 シグナルを阻害すると、CRPC の治療として非常に効果的であることを示した。本研究で使用した Gefitinib は EGFR 阻害剤であり、非小細胞性肺がんによく使用される抗がん剤である(35, 36)。Gefitinib は EGFR の ATP 結合部位に ATP と競合して結合し、活性化を阻害する分子標的治療薬である。これまでの CRPC の治療はタキサン系抗がん剤が使用されている。タキサン系抗がん剤は微小管の脱重合を阻害することにより細胞増殖を抑制するため、正常細胞にも作用する。そのため、副作用が強いこと

が知られている。本研究は、分子標的治療薬の Gefitinib が CRPC の新規治療薬として期待される成果も提示する。

本研究は、3-OS HS を介した EGFR シグナル活性化機構が前立腺がんの去勢抵抗性獲得を促進するという新しい分子機構を明らかにし、分子細胞生物学、がん細胞生物学、糖鎖生物学の分野における新たな知見を示す。また、本研究は実際の治療にもつながる成果を示し、去勢と同時に Gefitinib を投与するという CRPC に効果的な新規治療法を提案する。

## 2. 方法

### 細胞培養

ホルモン存在下および非存在下培養条件で、ヒト前立腺がん細胞株 LNCaP および C4-2 を培養した。ホルモン依存的増殖には、RPMI 培地 (Gibco) に 10% FBS (Gibco) 含有培地を使用した。ホルモン非依存的増殖には、FBS の代わりに 10% CSS (Invitrogen) を使用した。PC3 は CSS 含有培地で培養した。3 日ごとに培地交換し、6 日ごとに 0.02% EDTA で剥離し、継代した。

### *HS3ST1* の一過性ノックダウン(KD)

*HS3ST1* 遺伝子を KD するために、2 つの KD 配列、10 nM Stealth siRNA オリゴ (siRNA-1; HSS115087, Invitrogen) と 10 nM Silencer Select siRNA オリゴ (siRNA-2; s19336, Invitrogen) をそれぞれ Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて C4-2 細胞に導入した。siRNA-1 に対しては Stealth RNAi Negative Control Low GC Duplex # 2 (Invitrogen) を、siRNA-2 に対しては Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA (Invitrogen) をネガティブコントロールとして使用した。siRNA-1 は 3 日ごとに合計 3 回 C4-2 細胞へ導入し、9 日目に細胞を回収した。siRNA-2 は 3 日ごとに合計 5 回 C4-2 細胞へ導入し、15 日目に細胞を回収した。PC3 細胞では、siRNA-1 を 1 回導入し、3 日目に細胞を回収した。

### リアルタイム PCR と RNA-seq

TRIzol 試薬 (Invitrogen) を使用して細胞から total RNA を抽出し、Oligo dT プライマー (Invitrogen) および Superscript II First Strand Synthesis kit (Invitrogen) を使用して逆転写した。リアルタイム PCR は、Quant Studio 12K Flex (Applied Biosystems) を使用し、プライマーは表 1 に記載されている配列を用いた。RNA-seq においては、total RNA を TruSeq Stranded mRNA Prep kit (Illumina) で調整し、NovaSeq 6000 シーケンサー (Illumina) でシーケンスを読んだ。RStudio を使用してデータを解析した(37)。

表1. リアルタイム PCR で使用したプライマーセット一覧

遺伝子	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>PSA</i>	GGGTCCCGTTGTCTTCCT	ACTCCAGCCTCCCACAATC
<i>AR</i>	CGGAAGCTGAAGAACTTGG	GCTTCTGGGTTGTCTCCTCA
<i>GLCE</i>	TGGTTAGGTTGATTGCAAAGGT	TGCAGCCATGTGGGCTG
<i>EXT1</i>	TTGGGTCCTTCAGATTCCTG	CATCCATTGCTGAGCATCAC
<i>EXTL2</i>	AGGGCCCCACCCTATCC	AAAGACCTGGAGTCGATTTCTCA
<i>EXTL3</i>	CTTTGACTTGGTCGTATCACCG	TGTGGTGGGATTTCCATGAA
<i>HS2ST1</i>	ATTATGATGCCGCCAAGTT	AAGAGCATCGCCACCGC
<i>HS3ST1</i>	CCAGCCAGGAGCCTATT	CAGCAGGGAAGCCTCCTA
<i>HS6ST1</i>	CCAGCGCAAGACGCAGT	TGAAGGGCCGGATGAACTT
<i>NDST2</i>	AGACCGGTACTGCGTGGAGT	GGCTGTGCTCGTGGGCT
<i>EGF</i>	GTGTGCCCCCTGCCT	CTCCTTGGTAGCCTTCTGAGCA
<i>HB-EGF</i>	GCCACAAGCACTGGCCAC	GCCCCTTGCCTTTCTTCTTT
<i>EGFR</i>	GGGCCGACAGCTATGAGATG	CAAGGCCCTTCGACTTCT
<i>HER2</i>	GGATGTGCGGCTCGTACAC	TTCTCAGGGTTGGTACAGTTTAAAT
<i>HER3</i>	GCCCGAAACGTGCTACTCAA	GTCTAAAACCACACCGACTGGA
<i>HER4</i>	GCCTCTGGAGAATTTACGCATT	AATACTCCTAGCTATACGGAACC
<i>GAPDH</i>	CAAAGTTGTCATGGATGACC	CCATGGAGAAGGCTGGGG

## 細胞増殖アッセイ

*HS3ST1* KD 細胞の増殖アッセイは、siRNA-1 導入後 9 日目、siRNA-2 導入後 15 日目から開始した。

Cell Counting Kit-8 (Dojindo)を用いて 0、2、4、6 日目に測定した。発色反応は、5% CO<sub>2</sub> 下で 1 時間行われ、450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー(Thermo Scientific)で測定した。Gefitinib (Santa Cruz Biotechnology)添加実験では、コントロールとして DMSO を使用した。

## Western blot

細胞は可溶化液(1% SDS)で溶解し、99°Cで変性させた。試料は SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、PVDF 膜(Millipore)にトランスファーした。1% BSA でブロッキングし、4°Cで一晩一次抗体反応をした後、室温で 60 分間二次抗体反応を行った。最後に、ECL prime(GE healthcare)で検出した。リガンド刺激実験では、細胞を無血清培地で 24 時間培養後、リガンドを 7.5 分間反応させた。*HS3ST1* KD 細胞へのリガンド刺激実験では、siRNA-1 導入後 9 日目または siRNA-2 導入後 15 日目に無血清培地に置き換えられ、

24 時間後にリガンドを添加した。使用したリガンドは表 2 に記載した。また、Western blot 解析で使用した抗体は表 3 に記載した。

**表 2. リガンド刺激実験に使用したリガンド一覧**

リガンド	入手元	使用濃度
human IL-6	7270-IL; R&D Systems	10 ng/ml
human Wnt3a	5036-WN; R&D Systems	10 ng/ml
human EGF	#8916SF; Cell Signaling	1 ng/ml
human HB-EGF	SRP3052; SIGMA	1 ng/ml
human bFGF	060-04543; Wako	1 ng/ml

**表 3. Western blot 解析で使用した抗体一覧**

抗体	入手元	使用濃度/希釈倍率
rabbit anti-ERK1/2	#9102L; Cell Signaling	1:3,000
rabbit anti-phospho-ERK1/2	#9101L; Cell Signaling	1:2,000
mouse anti-STAT3	610189; BD Biosciences	0.08 µg/ml
mouse anti-phospho-STAT3	612356; BD Biosciences	0.25 µg/ml
rabbit anti-β-CATENIN	#9562; Cell Signaling	1:3,000
rabbit anti-phospho-β-CATENIN	#9561S; Cell Signaling	1:1,000
mouse anti-β-ACTIN	A5441; SIGMA	1:10,000
HRP-conjugated anti-mouse IgG	#7076; Cell Signaling	1:10,000
HRP-conjugated anti-rabbit IgG	#7074; Cell Signaling	1:20,000



## フローサイトメトリー

2 × 10<sup>5</sup> 細胞を FACS バッファー(PBS に 0.5% BSA (Iwai)、0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich)含有)に懸濁した。一次抗体を 4°C で 30 分間反応後、二次抗体を 4°C で 30 分間反応させた。フローサイトメトリーで使用した抗体および分子は表 4 に記載した。透過処理には 100% メタノール(Wako)を使用した。サンプルは BD FACS Aria III Cell Sorter(BD Biosciences)で解析した。死細胞を除去するために、測定直前にサンプルを propidium iodide で染色した。

表 4. フローサイトメトリー解析で使用した抗体/レクチン/リガンド 一覧

抗体/レクチン/リガンド	入手元	使用濃度/希釈倍率
rabbit anti-HS3ST1	14358-1-AP; Proteintech	1:100
His-tagged human recombinant Antithrombin-III	ab276207; abcam	2 µg/ml
human IgG Fc fused mutated-cochlin ΔvWA2	Ref. 31	3 µg/ml
Alexa Fluor 647-conjugated human recombinant EGF	E35351; Thermo Fisher	2 µg/ml
FITC-conjugated human recombinant HB-EGF	00470-01-50F; Aviscera Bioscience	2 µg/ml
Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG	A11008; Life Technologies	1:300
FITC-conjugated anti-His tag	362618; BioLegend	1:300
PE-conjugated anti-human IgG Fc	109-117-008; Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:300

## 免疫染色

細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、ブロッキング剤(1% BSA, 0.3% TritonX-100)でブロッキングした。一次抗体の anti-HS3ST1(14358-1-AP; Proteintech)を 4°C で一晩反応後、二次抗体の Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG(A11008; Life Technologies)を室温で 60 分間反応させた。最後に、Hoechst

33342 (Invitrogen) で核を染色した。LSM 700 共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss)を使用して細胞を観察した。

### 培養液に添加した EGF の局在の観察

C4-2 細胞を無血清培地で 24 時間前培養した後、Alexa Fluor 647 human recombinant EGF (Thermo Fisher) を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 7.5 分間反応させた。細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、Hoechst 33342 (Invitrogen) で核を染色した。LSM 700 共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss)を使用して細胞を観察した。

### 異種移植腫瘍モデル

去勢されたヌードマウスと去勢されていないヌードマウス(それぞれ 8 週齢のオス KSN 系統(Japan SLC, Inc))を用意し、去勢されたマウスは 3 つのグループに、去勢されていないマウスは 4 つのグループに無作為に分けた。FBS および CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞( $2 \times 10^7$  個)をマウスの右腹部側面に皮下注射した。皮下注射後 10 日目から週に 5 回、50 mg/kg または 100 mg/kg の投与量で Gefitinib を腹腔内注射し、Gefitinib 投与後 12 日間の腫瘍の大きさを測定した。コントロールとして、Gefitinib を投与しないマウスには 0.5% Tween 80 (Tokyo Chemical Industry) を投与した。腫瘍の最大直径(L)とその軸に垂直な直径(W)を測定し、腫瘍の体積は  $(L \times W^2)/2$  の式で計算した。摘出した腫瘍の重さを測定し、腫瘍を 10% 緩衝ホルマリンで固定した後、パラフィン切片としてヘマトキシリン/エオジン(HE)染色した。

### HPLC を用いた HS の組成分析

ゴム製のスクレーパーを使用して、FBS 及び CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞を回収後、超音波破碎し、アクチナーゼ E 処理をした。トリクロロ酢酸でペプチドを沈殿させ、得られた GAG-ペプチド分画は Amicon Ultra-4 (3 K, Millipore) で脱塩した。heparinase-I, heparinase-III (IBEX Pharmaceuticals)、そして heparinase-II (R&D Systems) の混合物で処理し、HS の二糖類の組成と heparinase 耐性オリゴ糖 (3 位硫

酸化グルコサミン残基を含む可能性があるオリゴ糖)の分析を行った。サンプルは蛍光色素 2-aminobenzamide (2AB)で標識され、2AB 誘導体の二糖類およびオリゴ糖類は、PA-G カラム (YMC Co.)を通してアニオン交換 HPLC で分析した(38,39)。ヘパリンから調製された 3-*O*-硫酸化オリゴ糖の溶出位置との比較によって 3-*O*-硫酸化グルコサミン残基を含む可能性があるオリゴ糖を同定した(40)。

### ヘパリンから 3-*O*-硫酸化オリゴ糖の抽出

3-*O*-硫酸化オリゴ糖をヘパリンから抽出した。ヘパリン(Nacalai tesque)を、20 mM の酢酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)および 2 mM の  $\text{Ca}(\text{OAc})_2$  中で、heparinase-I、heparinase-III (IBEX Pharmaceuticals)、そして heparinase-II (R&D Systems)の混合物で 37 °C で 48 時間処理した。サンプルを PA-G カラムを通してアニオン交換 HPLC で分析した。heparinase 耐性オリゴ糖を含む分画を濃縮し、Superdex Peptide カラム (1.0 x 30 cm、GE healthcare)を通して脱塩した。各 heparinase 耐性オリゴ糖分画を 2AB で標識し、アニオン交換 HPLC で分析した(39-41)。本研究では、得られた 3-*O*-硫酸化オリゴである $\Delta\text{HexA-GlcNAc}(6\text{S})\text{-GlcA-GlcN}(\text{NS},3\text{S})$ および $\Delta\text{HexA-GlcNAc}(6\text{S})\text{-GlcA-GlcN}(\text{NS},3\text{S},6\text{S})$ ( $\Delta\text{HexA}$ : 4,5-unsaturated hexuronic acid、GlcN: glucosamine、NS: 2-*N*-sulfate、3S: 3-*O*-sulfate、6S: 6-*O*-sulfate)を 2AB で標識し、HPLC で分析した。

### 統計解析

2つの群を比較する際の検定は Student の t 検定を使用した。1つの対照群に対して複数の群を比較する際は Dunnett 検定を使用した。異種移植腫瘍実験では、Tukey-Kramer 検定を使用した。

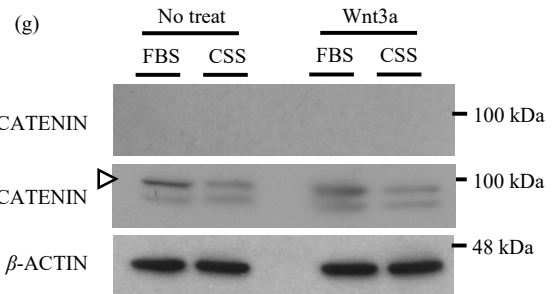
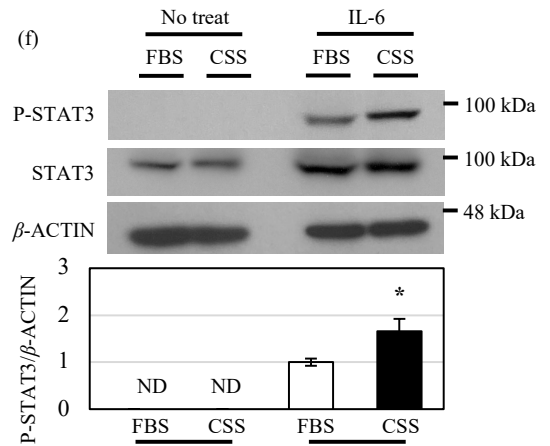
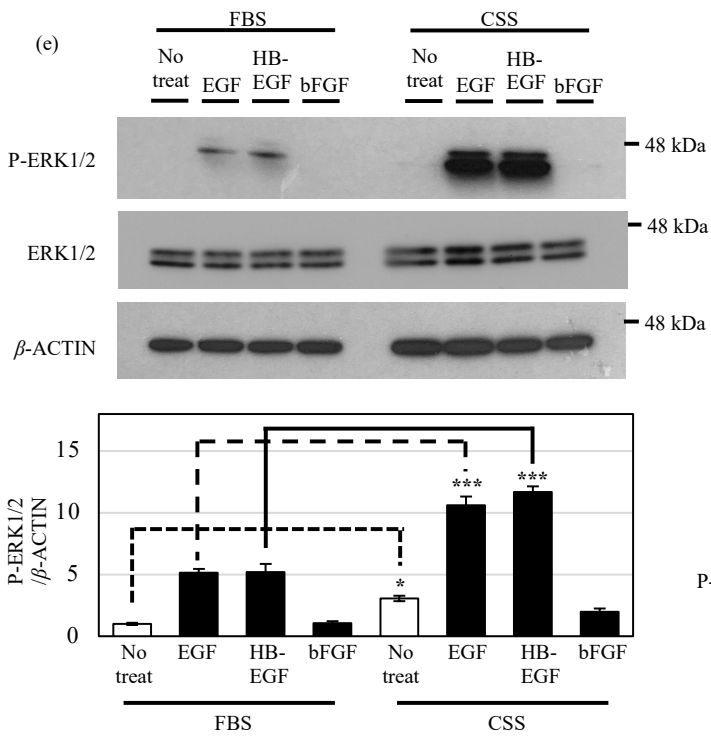
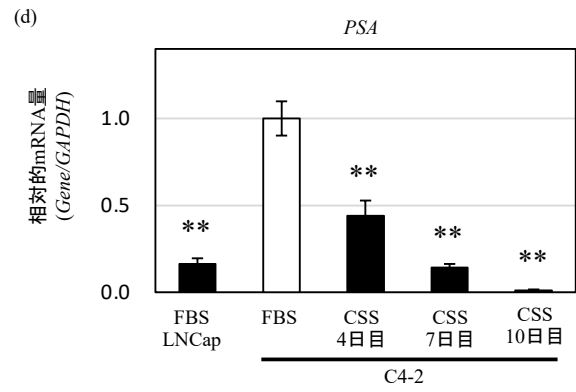
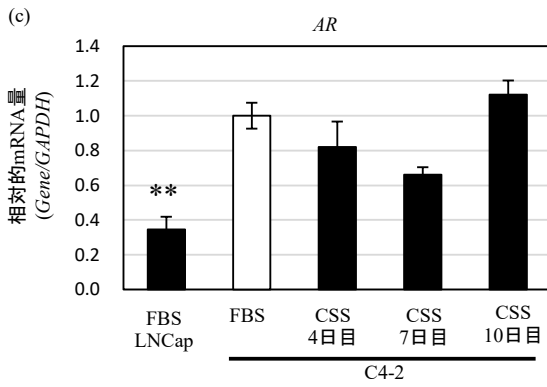
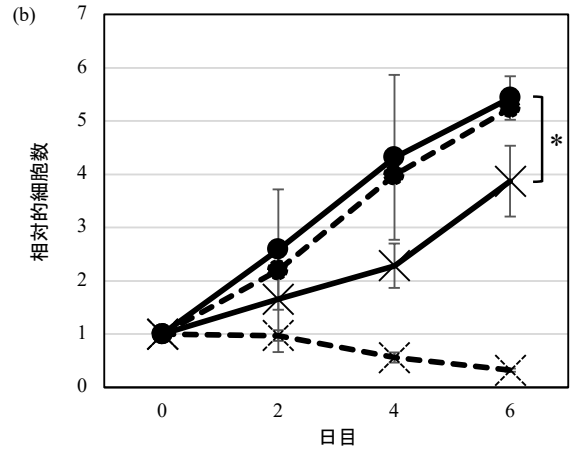
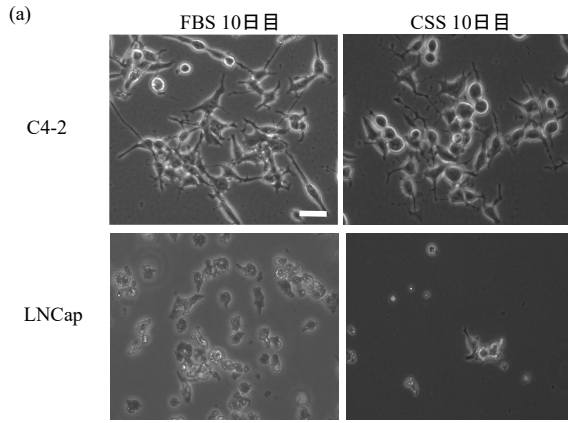
### 3. 結果

#### ヒト前立腺がん細胞株 C4-2 はホルモン非依存的に増殖する

本研究では、ホルモン依存的及び非依存的に増殖することができるヒト前立腺がん細胞株 C4-2 を使用した。C4-2 は、去勢マウスに移植されたヒト前立腺がん細胞株 LNCaP が去勢抵抗性を獲得して樹立された細胞株である。LNCaP 細胞と、C4-2 細胞を FBS 含有培地および CSS 含有培地で 10 日間培養し、増殖能を検討した(図 3a、b)。LNCaP 細胞は FBS 含有培地では増殖したが、CSS 含有培地では死滅した。一方、C4-2 細胞は FBS 含有培地および CSS 含有培地の両培地で増殖した(図 3a、b)。FBS 含有培地中よりも増殖速度は抑制されていたが、CSS 含有培地でも C4-2 細胞は増殖することがわかった。

PSA は、AR シグナルの下流遺伝子であり、前立腺がんのバイオマーカーである(3)。C4-2 細胞を FBS 含有培地および CSS 含有培地で 10 日間培養したときの、AR および PSA の mRNA の発現を検討した。両培地中での C4-2 細胞における AR の発現に変化はなかったが、CSS 含有培地で培養したときの PSA の mRNA 発現量は、培養 10 日目に劇的に減少した(図 3c、d)。これらの結果は、ホルモン除去によって AR シグナルが抑制されたにも関わらず C4-2 は増殖可能であることを示す。

CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞を、再度 FBS 含有培地で 24 日間培養した。このとき AR の発現は減少するが、10 日目以降に安定的に発現していた(図 4a、b)。再度 FBS 含有培地で培養した C4-2 細胞において AR の発現が減少しても、AR が発現している限り、PSA は有意に増加した。これらの事実から、CSS 含有培地から FBS 含有培地へ再置換すると AR シグナルが再活性化することがわかった。FBS 含有培地と CSS 含有培地の切り替え、すなわち、ホルモンの存在の有無が C4-2 細胞における AR シグナルの活性を調節することがわかった。C4-2 細胞は AR シグナルが抑制されても増殖できることから、AR シグナルとは別のホルモン非依存的なシグナルを介して増殖すると考えられた。

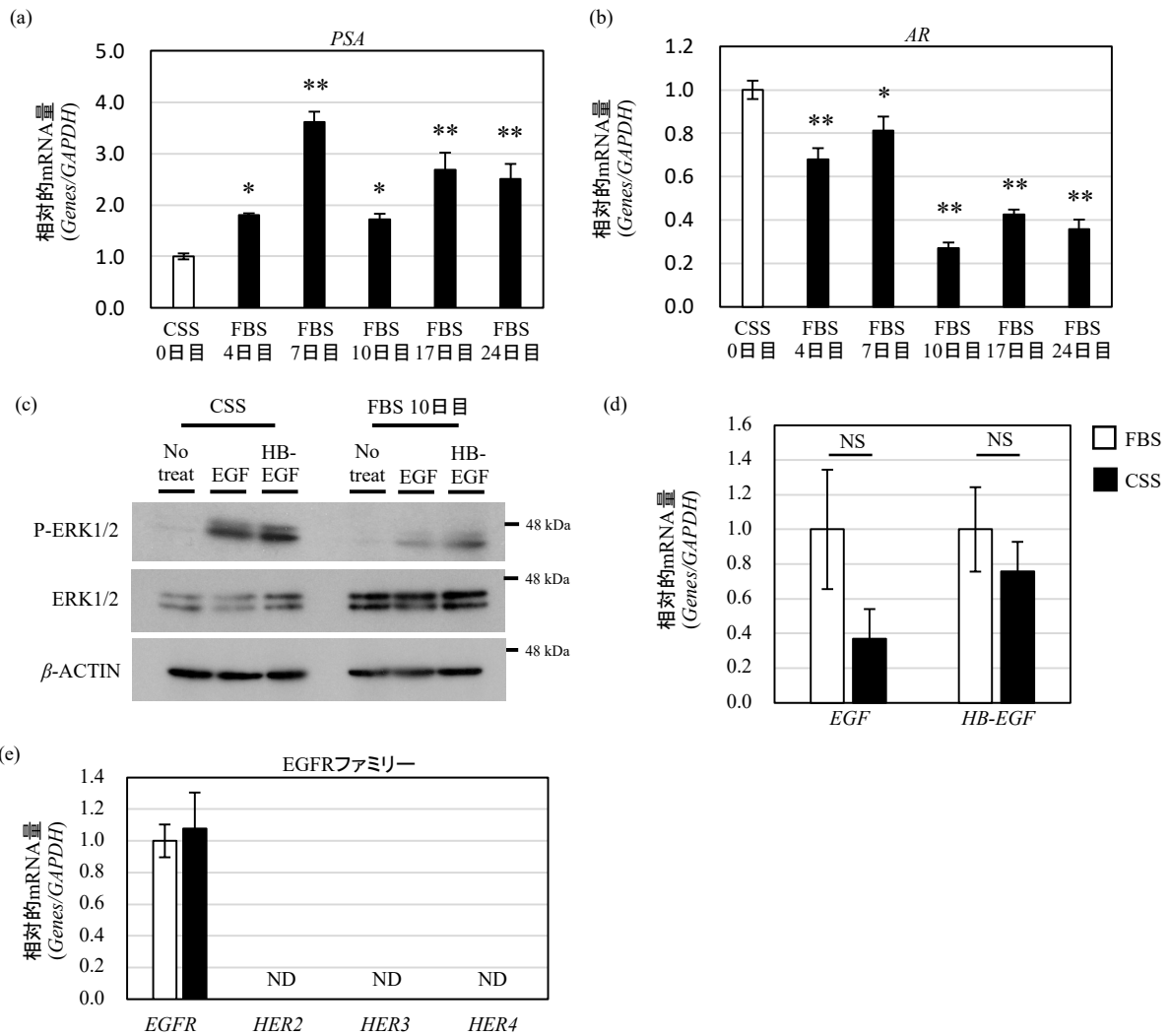


### 図 3. C4-2 は EGFR シグナルを介してホルモン非依存的に増殖する

- (a) C4-2 および LNCaP 細胞を FBS または CSS 含有培地で 10 日間培養したときの形態を観察した。スケールバー: 50  $\mu$ m。
- (b) FBS または CSS 含有培地で培養した C4-2 および LNCaP 細胞の増殖能を測定した。C4-2 は実線、LNCaP は点線で示した。FBS 含有培地での培養は(●)、CSS は含有培地での培養(×)で示した。(c, d) FBS 含有培地で培養した LNCaP 細胞、および FBS または CSS 含有培地(4 日目、7 日目、10 日目)で培養した C4-2 細胞の AR および PSA の相対的 mRNA 発現量をリアルタイム PCR で解析した。GAPDH mRNA で標準化した。FBS 含有培地で培養した C4-2 細胞における発現量を 1 とした。
- (e) リガンド刺激後にウェスタンブロット解析で ERK1/2 シグナルの活性を検討した。EGF、HB-EGF、または bFGF (各 1 ng/ml、7.5 分間)で刺激する前に、C4-2 細胞を FBS または CSS 含有培地で 10 日間培養した。下部には、リン酸化 ERK1/2(P-ERK1/2)の定量結果を示した。発現量は  $\beta$ -ACTIN で標準化した。
- (f) IL-6 (10ng/ml)で刺激後にウェスタンブロット解析で STAT3 シグナルの活性を検討した。下部には、リン酸化 STAT3(P-STAT3)の定量結果を示した。発現量は  $\beta$ -ACTIN で標準化した。
- (g) Wnt3a (10ng/ml)で刺激後にウェスタンブロット解析で  $\beta$ -CATENIN シグナルの活性を検討した。P- $\beta$ -CATENIN = リン酸化  $\beta$ -CATENIN。
- n=3、\*(p<0.05)、\*\*(p<0.01)、\*\*\*(p<0.001). ND: not detected.

### ホルモン非存在下で C4-2 細胞では EGFR-ERK1/2 シグナルが活性化される

C4-2 細胞のホルモン非依存的な増殖に関与する細胞内シグナル伝達経路を同定するために、FBS 含有培地および CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞を、様々なリガンドで刺激実験を行い、シグナルの活性を検討した。C4-2 細胞を EGF または HB-EGF で刺激したとき、リン酸化 ERK1/2 の発現は CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞で有意に増加した(図 3e)。EGF と HB-EGF は EGFR に結合してシグナルを活性化する。一方、C4-2 細胞を basic FGF で刺激したとき、リン酸化 ERK1/2 の発現は変化しなかった。C4-2 細胞を IL-6 で刺激したとき、下流のリン酸化 STAT3 の発現は CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞において増加した(図 3f)。また、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞において Wnt3a の下流である  $\beta$ -CATENIN の発現が減少した(図 3g)。これらの事実から、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞において EGF および HB-EGF によって強く活性化した EGFR-ERK1/2 シグナルが、ホルモン非依存的増殖を促進する主要なシグナル経路であることが明らかになった。CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞を、再度 FBS 含有培地で培養すると、活性化していた ERK1/2 のリン酸化レベルが抑制された(図 4c)。さらにこのとき、PSA の発現が増加しているため、ホルモンの存在の有無によって AR と EGFR-ERK1/2 シグナルが切り替わることが明らかになった(図 3c-e および図 4a-c)。



**図 4. C4-2 細胞を CSS 含有培地から FBS 含有培地へ戻すと AR シグナルが再活性化する**

(a, b) CSS 含有培地から FBS 含有培地へ置換し、24 日間培養したときの C4-2 細胞の AR および PSA の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で解析した。GAPDH mRNA で標準化した。0 日目の発現量を 1 とした。  
 (c) リガンド刺激後にウェスタンブロット解析で ERK1/2 シグナルの活性を検討した。EGF と HB-EGF (各 1 ng/ml、7.5 分間) で刺激した。  
 (d, e) FBS または CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞における EGF、HB-EGF、EGFR ファミリー遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で解析した。GAPDH mRNA で標準化した。発現量は、FBS 含有培地で培養した C4-2 細胞の遺伝子発現を 1 とした。n=3、\*(p<0.05)、\*\*(p<0.01)。ND: not detected、NS: not significant.

FBS 含有培地と CSS 含有培地で培養した C4-2 における遺伝子発現の変化を明らかにするために、RNA-seq 解析をおこなった。RNA-seq 解析の結果、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞において、FOS や FOSL1 などの ERK 標的遺伝子の発現が増加することが明らかになった(図 5a, b)(42,43)。この事実は、ホルモン非存在下で培養した C4-2 細胞において EGFR-ERK1/2 シグナルが活性化するという結果をさらに裏付けていた。C4-2 細胞のホルモン非依存的な増殖は、EGF および HB-EGF を介した EGFR-ERK1/2 シグナルに依存していると考えられた。また、FOS は前立腺がんが進行すると高頻度で過剰発現されることが報告されている(44)。FOSL1 は前立腺がん細胞の増殖と転移を促進することが報告されている(45)。したがって、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞において発現が増加した FOS と FOSL1 が去勢抵抗性獲得に関与している可能性が考えられた。

### ホルモン非存在下で C4-2 細胞では HS3ST1 の発現が増加する

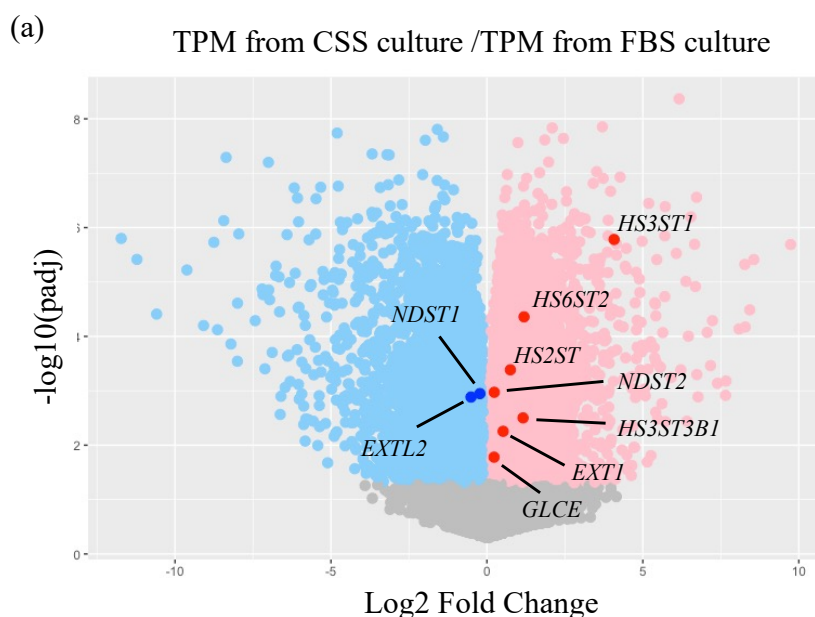
CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞における EGFR-ERK1/2 活性化の分子メカニズムを検討した。EGFR-ERK1/2 シグナルの活性化が、リガンドまたは受容体の発現増加に起因するかどうかを明らかにするために、C4-2 細胞における *EGF*、*HB-EGF*、および EGFR ファミリー遺伝子 (*EGFR*、*HER2*、*HER3*、および *HER4*) の mRNA 発現量を検討した。*EGF* と *HB-EGF* の mRNA 量は CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞で減少傾向であり、増加していなかった(図 4d)。また、EGFR ファミリーの中で *EGFR* のみが C4-2 細胞で発現し、FBS 含有培地と CSS 含有培地で培養したときの間で発現量に変化はなかった(図 4e)。これらの事実から、ホルモン非依存的な増殖における EGFR-ERK1/2 シグナルの活性化は、リガンドまたは受容体の発現変化が原因ではないことが明らかになった。したがって、本研究ではリガンドと受容体の結合に必要な共受容体に着目した。

RNA-seq 解析で得られたデータから、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞において HS の伸長および硫酸化に関与する酵素の発現が大きく変化していることがわかった(図 5a, c)。特に、*HS3ST1* の発現が CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞において著しく増加していた(図 5a, c)。*HS3ST1* は、2-O-硫酸化を欠いた GlcA または IdoA の GlcNS の C3 位に硫酸基を転移する硫酸基転移酵素である(図 1)。*HS3ST* のアイソフォームは 7 つあり(46)、C4-2 細胞において *HS3ST1* の発現が他のアイソフォームに比べて圧倒



的に高いことがわかった。この事実から、C4-2 細胞における HS の 3-O-硫酸化は主に HS3ST1 によって合成されていると考えられた。リアルタイム PCR 解析の結果からも、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞で *HS3ST1* 遺伝子が顕著に増加することが明らかになった(図 6a)。さらに、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞において HS3ST1 タンパク質の発現も有意に増加していることがわかった(図 6b、c)。CSS 含有培地から FBS 含有培地での培養に切り替えると、*HS3ST1* の発現は劇的に減少した(図 7)。これらの結果は、C4-2 細胞での HS3ST1 の発現増加がホルモン非存在下特異的であり、AR シグナルから EGFR シグナルへの切り替えに対応していることが明らかになった。

また、C4-2 細胞における 3-OS HS 構造の発現も検討した。Antithrombin III は、HS3ST1 が合成する 3-OS HS に特異的に結合することが報告されている(24,27,28)。フローサイトメーター解析を行い、FBS 含有培地で培養した C4-2 細胞と比較して、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞の細胞表面により多くの Antithrombin III が結合した(図 6d)。また、3-OS HS を含む硫酸化された GAG を認識するレクチンである変異型コクリン( $\Delta vWA2$ )を用いて実験を行った(29)。 $\Delta vWA2$  も、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞により多く結合した(図 6e)。これらの事実から、HS3ST1 が合成する 3-OS HS が C4-2 細胞のホルモン非依存的増殖に関与していることが考えられた。さらに、千葉大学の池原先生らとの共同研究によって、HS3ST1 は C4-2 細胞だけでなく、ヒトの肺における転移性 CRPC でも発現していることがわかった(図 6f)。これは、HS3ST1 が CRPC の進行において重要な要素であることを示唆していた。



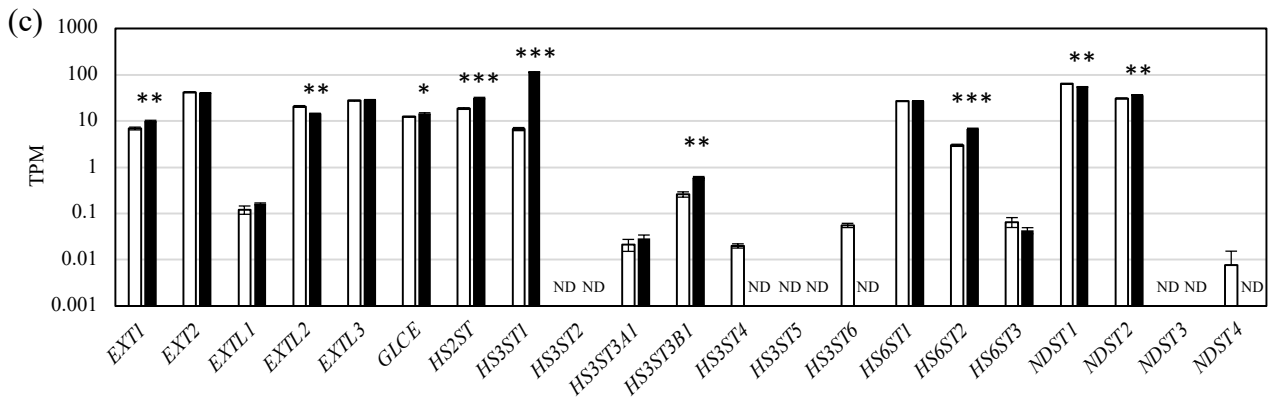
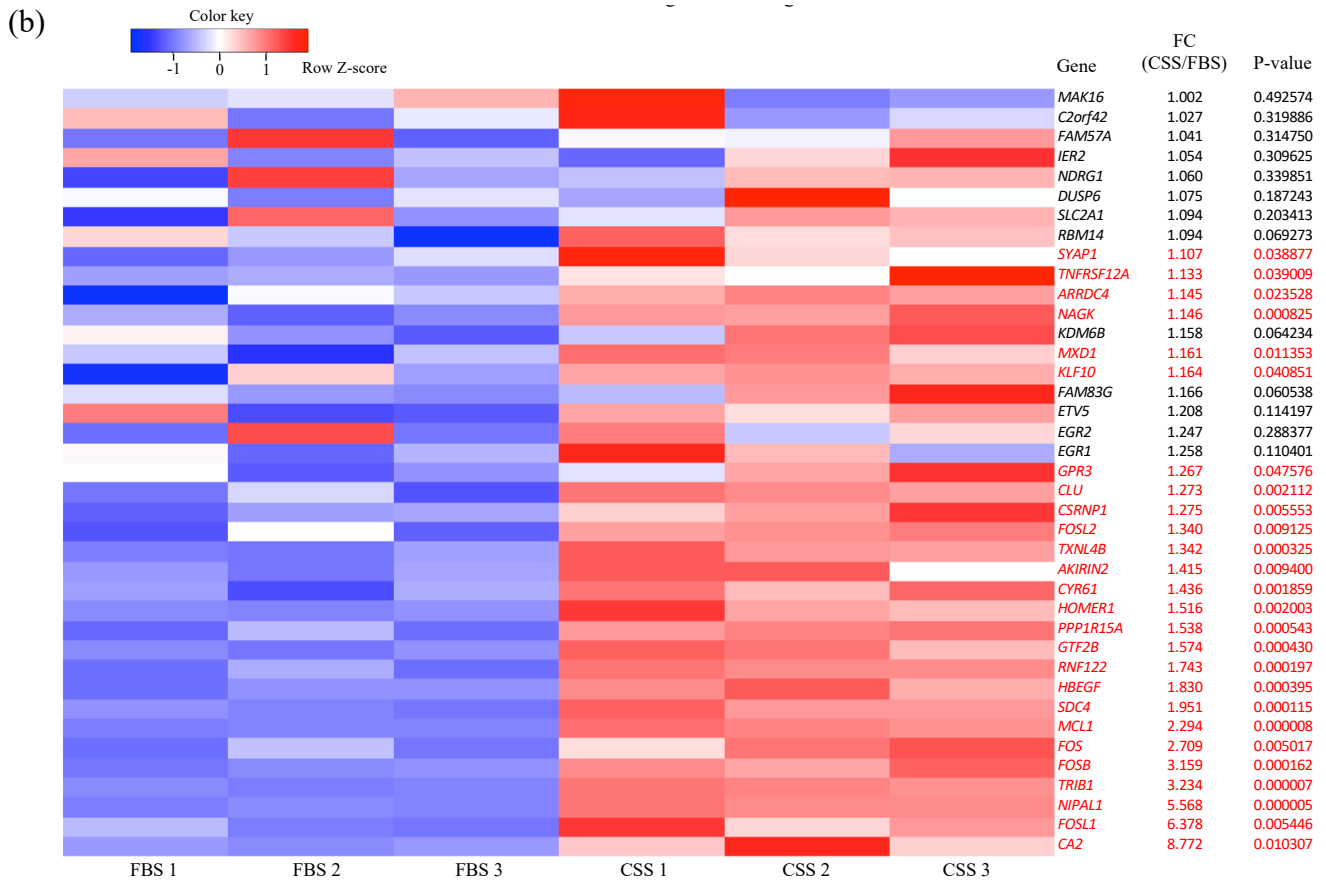


図 5. RNA-seq による C4-2 細胞の遺伝子発現解析

(a) FBS および CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞から得られた RNA-seq データを用いて、ボルケーノプロットを作成した。

(b) CSS 含有培地で培養された C4-2 細胞において上昇した EGFR-ERK1/2 の標的遺伝子のヒートマップを示した。発現が低い遺伝子は青、高い遺伝子は赤で示した。有意に上昇した遺伝子名は赤で示した。Fold Change (FC) は、CSS 含有培地での TPM を FBS 含有培地での TPM で割って計算した。

(c) FBS または CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞における HS 合成に関わる糖転移酵素と硫酸基転移酵素の TPM を示した。

n=3、\*(p<0.05)、\*\*(p<0.01)、\*\*\* (p<0.001). ND: not detected.

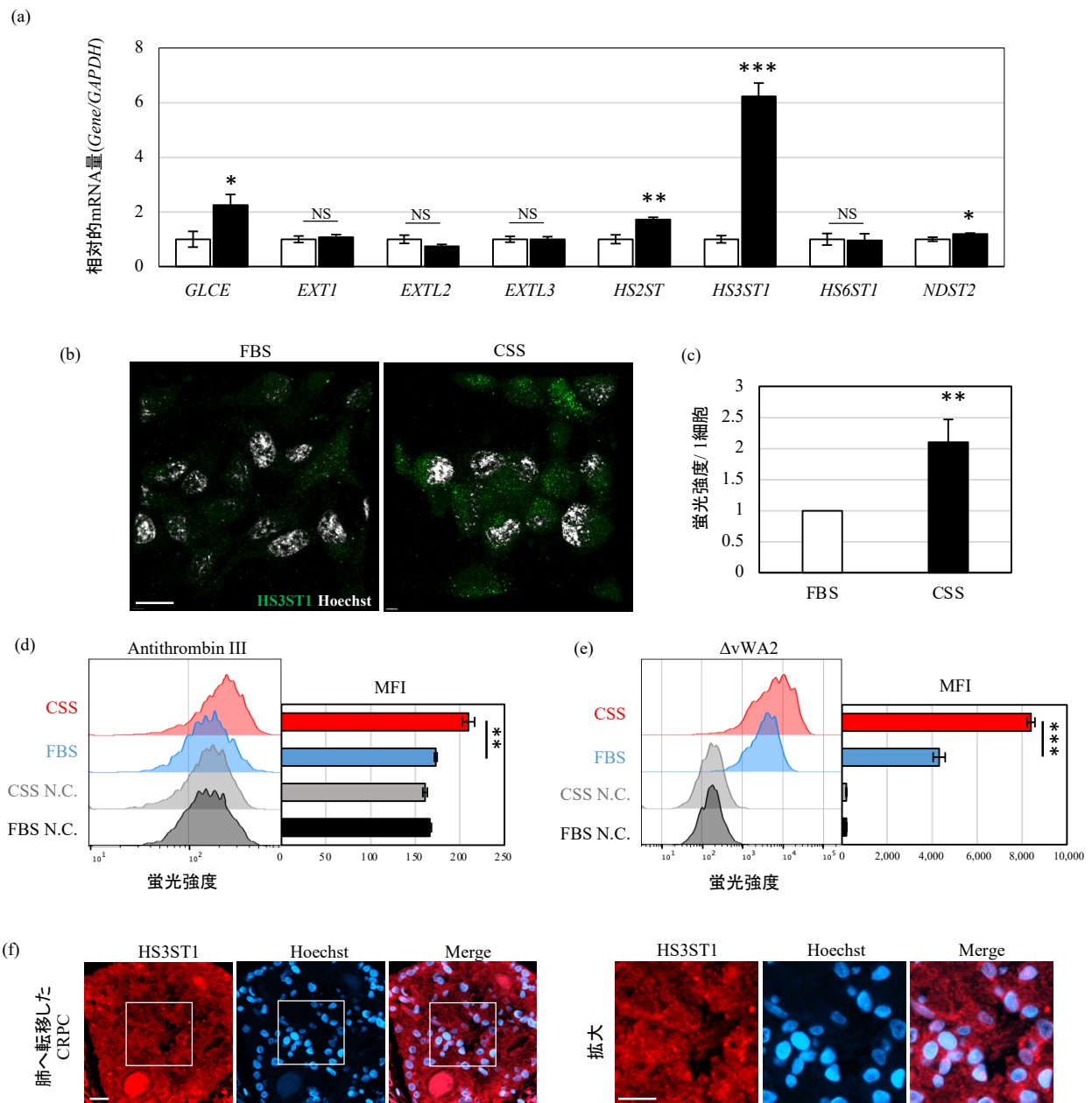


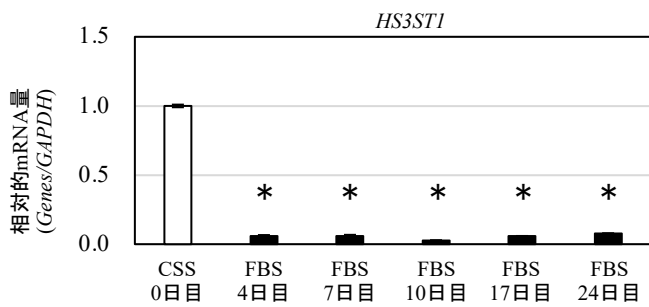
図 6. ホルモン非存在下で C4-2 細胞では HS3ST1 の発現が増加する

(a) FBS または CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞における HS 合成に関わる遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で解析した。GAPDH mRNA で標準化した。発現量は、FBS 含有培地で培養した C4-2 細胞の遺伝子発現を 1 とした。

(b) FBS または CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞を抗 HS3ST1 抗体で染色して観察した。スケールバー: 20 μm。 (c) b の定量結果を示した。

(d, e) FBS または CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞で、Antithrombin III と ΔvWA2 を用いたフローサイトメトリー解析を行った。MFI: Mean Fluorescence Intensity、N.C.: Negative Control。

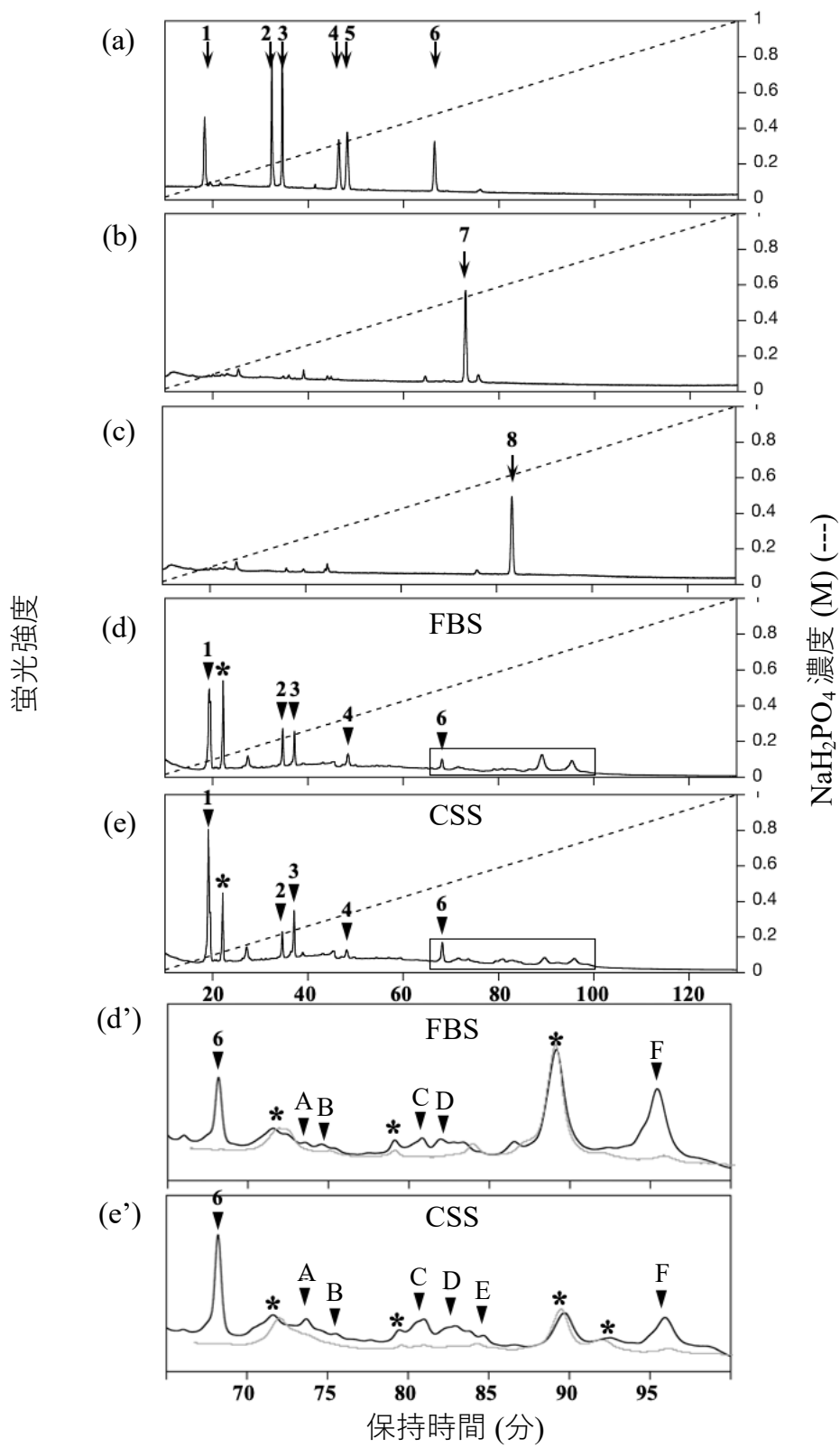
(f) ヒトの肺における転移性 CRPC を抗 HS3ST1 抗体で染色して観察した。スケールバー: 20 μm。 n=3、\*(p<0.05)、\*\*(p<0.01)、\*\*\* (p<0.001)。NS: not detected、NS: not significant。



**図 7. C4-2 細胞を CSS 含有培地から FBS 含有培地へ戻すと *HS3ST1* が減少する**  
 FBS または CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞における *HS3ST1* 遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で解析した。*GAPDH* mRNA で標準化した。発現量は、0 日目を 1 とした。n=3、\*(p<0.01)

### ホルモン非存在下で C4-2 細胞では 3-O-硫酸化オリゴ糖が増加する

CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞において 3-OS HS 構造が増加することを検討するために、名城大学の水元先生らとの共同研究で、FBS 含有培地および CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞から HS を分離し、HPLC で構造を解析した。HS の-IdoA-GlcNS,3S,6S-以外の 3-O-硫酸化された GlcN(GlcNS,3S) 残基は heparinase に対して耐性がある(39)。ヘパリンから抽出した構造既知のオリゴ糖を HPLC で解析すると、heparinase で分解されるオリゴ糖はピーク 1-6、heparinase 耐性オリゴ糖はピーク 7 と 8 として検出された(図 8a-c)。これらの標準オリゴ糖と比較して、FBS 含有培地および CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞から抽出した HS を HPLC 解析すると、FBS 含有培地では heparinase 耐性オリゴ糖含有のピークは 5 つ(ピーク A、B、C、D、F)、CSS 含有培地では 6 つのピーク(ピーク A、B、C、D、E、F)が検出された(図 8d-e')。ピーク A、C、D、E の 4 つの GAG-ペプチド分画の量が CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞において増加したことが明らかになった(図 8a-f)。これまでの結果から、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞で増加した 3-O-硫酸化グルコサミン残基を含むオリゴ糖は、*HS3ST1* が合成する 3-OS HS 構造であることが考えられた。



(f)

Heparinase耐性オリゴ糖	C4-2 (FBS含有培地)	C4-2 (CSS含有培地)
	pmol disaccharide/mg total protein	
Peak A	0.3	2.8
Peak B	0.5	0.5
Peak C	2.0	3.2
Peak D	1.0	2.0
Peak E	ND	0.9
Peak F	26.7	20.4
合計	30.5	29.7

**図 8. ホルモン非存在下で C4-2 細胞では 3-O-硫酸化オリゴ糖が増加する**

(a) HPLC による HS 構造の解析を行った。2AB 標識した HS 二糖構造の標準物質を検出した。

(b, c) 構造が同定されている 3-O-硫酸化含有四糖構造:

$\Delta$ HexA-GlcNAc(6S)-GlcA-GlcN(NS,3S) (b) および  $\Delta$ HexA-GlcNAc(6S)-GlcA-GlcN(NS,3S,6S) (c)。

(d, e) FBS (d) または CSS (e) 含有培地で培養した C4-2 細胞由来の GAG ペプチドの二糖およびオリゴ糖の 2AB 標識体を検出した。

(d', e') それぞれ d と e の拡大 (65-100 分) を示した。

1,  $\Delta$ HexA-GlcNAc; 2,  $\Delta$ HexA-GlcNAc(6S); 3,  $\Delta$ HexA-GlcN(NS); 4,  $\Delta$ HexA-GlcN(NS,6S); 5,  $\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS); 6,  $\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS,6S)。矢頭(A-E)は、前立腺がん細胞由来の heparinase 耐性オリゴ糖を示しており、GlcN(3S)を含んでいる可能性がある。\*は不純物を示している。

(f) 各オリゴ糖の量をクロマトグラム中のピーク面積から計算した。ND: not detected (<0.1 pmol/mg タンパク質)

**HS3ST1 が合成する 3-OS HS は、C4-2 のホルモン非存在下の増殖に必要である**

C4-2 細胞のホルモン非依存的な増殖における HS3ST1 機能を明らかにするため、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞において *HS3ST1* を KD した (図 9a および図 10a)。*HS3ST1* KD 細胞では、HS3ST1 の発現が転写およびタンパク質レベルで有意に減少していた (図 9b, c および図 10b, c)。また、3-OS HS に結合する Antithrombin III および変異型コクリン  $\Delta$ vWA2 を用いて、*HS3ST1* KD 細胞における 3-OS HS の細胞表面での発現を検討した。*HS3ST1* KD 細胞では、Antithrombin III および  $\Delta$ vWA2 の細胞表面への結合が有意に減少し、*HS3ST1* KD 細胞で 3-OS HS の発現が減少していることがわかった (図 9d, e および図 10d, e)。さらに、3-OS HS の減少に伴って CSS 含有培地での *HS3ST1* KD 細胞の増殖が有意に

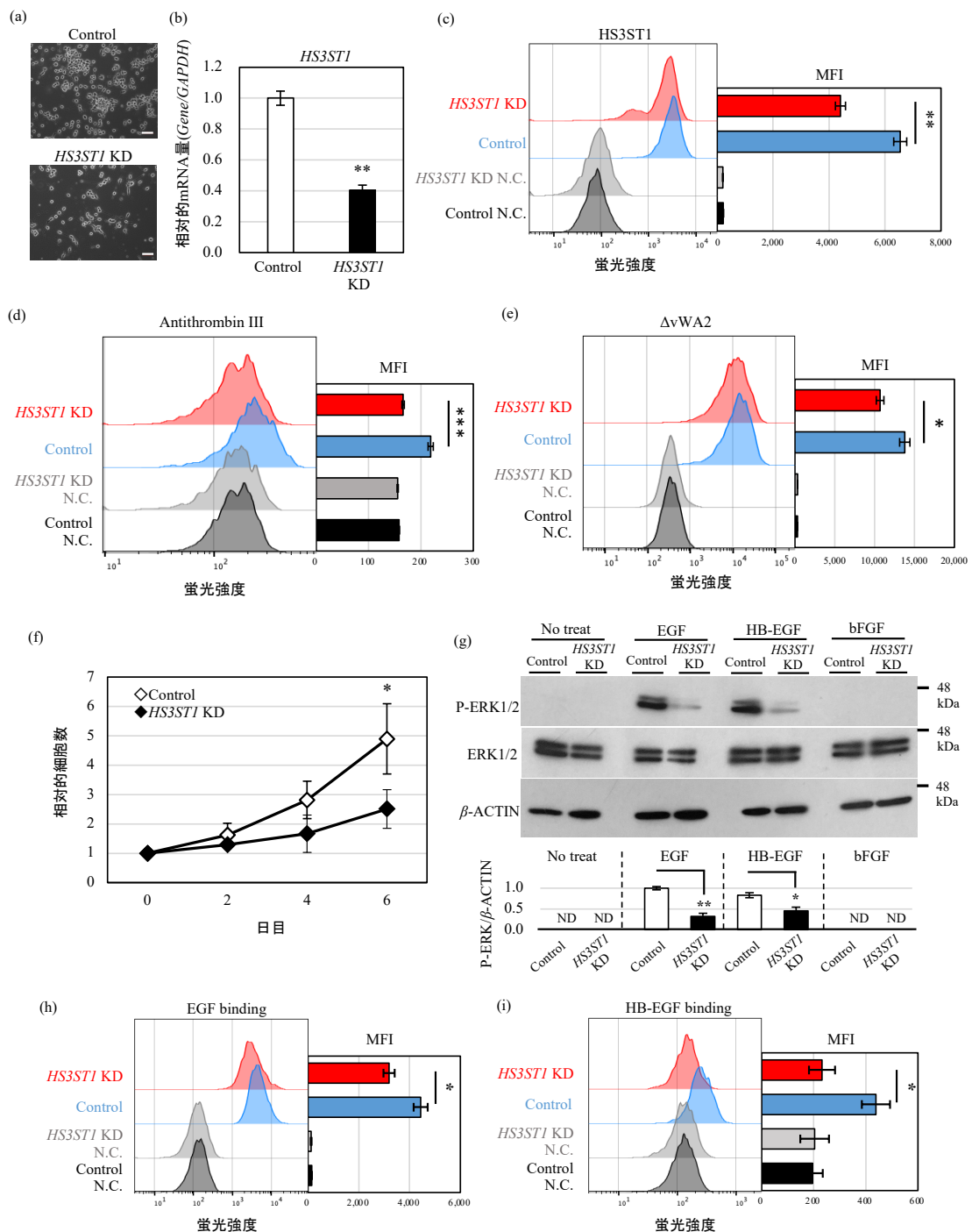
抑制された(図 9f および図 10f)。これらの事実から、HS3ST1 が合成する 3-OS HS が、CSS 含有培地での C4-2 細胞のホルモン非依存的な増殖に必要であることが明らかになった。

## HS3ST1 が合成する 3-OS HS は、CRPC における EGFR-ERK1/2 シグナルの活性化に必要である

*HS3ST1* KD C4-2 細胞における EGFR-ERK1/2 シグナルの活性を検討した。*HS3ST1* KD 細胞を EGF または HB-EGF で刺激すると、リン酸化 ERK1/2 の発現が有意に減少した(図 9g および図 10g)。事実は、HS3ST1 が合成する 3-OS HS が、EGF および HB-EGF による EGFR-ERK1/2 シグナルの活性化に必要であることを示していた。C4-2 細胞において 3-OS HS が EGF および HB-EGF の共受容体として機能するという仮説に基づき、生細胞の細胞表面に EGF および HB-EGF が結合するかどうかをフローサイトメトリーで検討した。コントロール細胞では、EGF および HB-EGF が細胞表面に結合することが明らかになった(図 9h, i および図 10h, i)。一方、*HS3ST1* KD 細胞では EGF および HB-EGF の生細胞の表面への結合が有意に減少した。これらの事実から、EGF および HB-EGF が C4-2 細胞表面の HS3ST1 が合成する 3-OS HS を介して細胞表面に結合することが明らかになった。さらに、蛍光色素標識された EGF で刺激した *HS3ST1* KD 細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、*HS3ST1* KD 細胞において細胞膜に局在する EGF の量が減少していることがわかった(図 11)。3D 構築した染色画像は、EGF が細胞膜に局在し、*HS3ST1* KD 細胞への EGF の結合が減少することを強調していた。HB-EGF は HS に結合することが報告されているが、EGF にはヘパリン結合ドメインがない(22)。しかし、本研究の結果から、HB-EGF だけでなく EGF も HS3ST1 が合成する 3-OS HS を介して EGFR に結合することが明らかとなった。CRPC のホルモン非依存的な増殖において、AR シグナルの代わりに EGF および HB-EGF が 3-OS HS を介して EGFR-ERK1/2 シグナルを活性化することを示した。

さらに、C4-2 以外の CRPC 細胞株でも 3-OS HS を介した EGFR シグナル活性機構が存在するかを検討した。C4-2 は AR が発現し、ホルモン依存的・非依的に増殖することが可能である。一方で、PC3 細胞株は C4-2 とは異なり、AR を発現していない細胞株で、ホルモン依存的には増殖せず、ホルモン非依的にのみ増殖する(31)。CSS 含有培地で培養した PC3 においても *HS3ST1* の KD を行った。*HS3ST1*

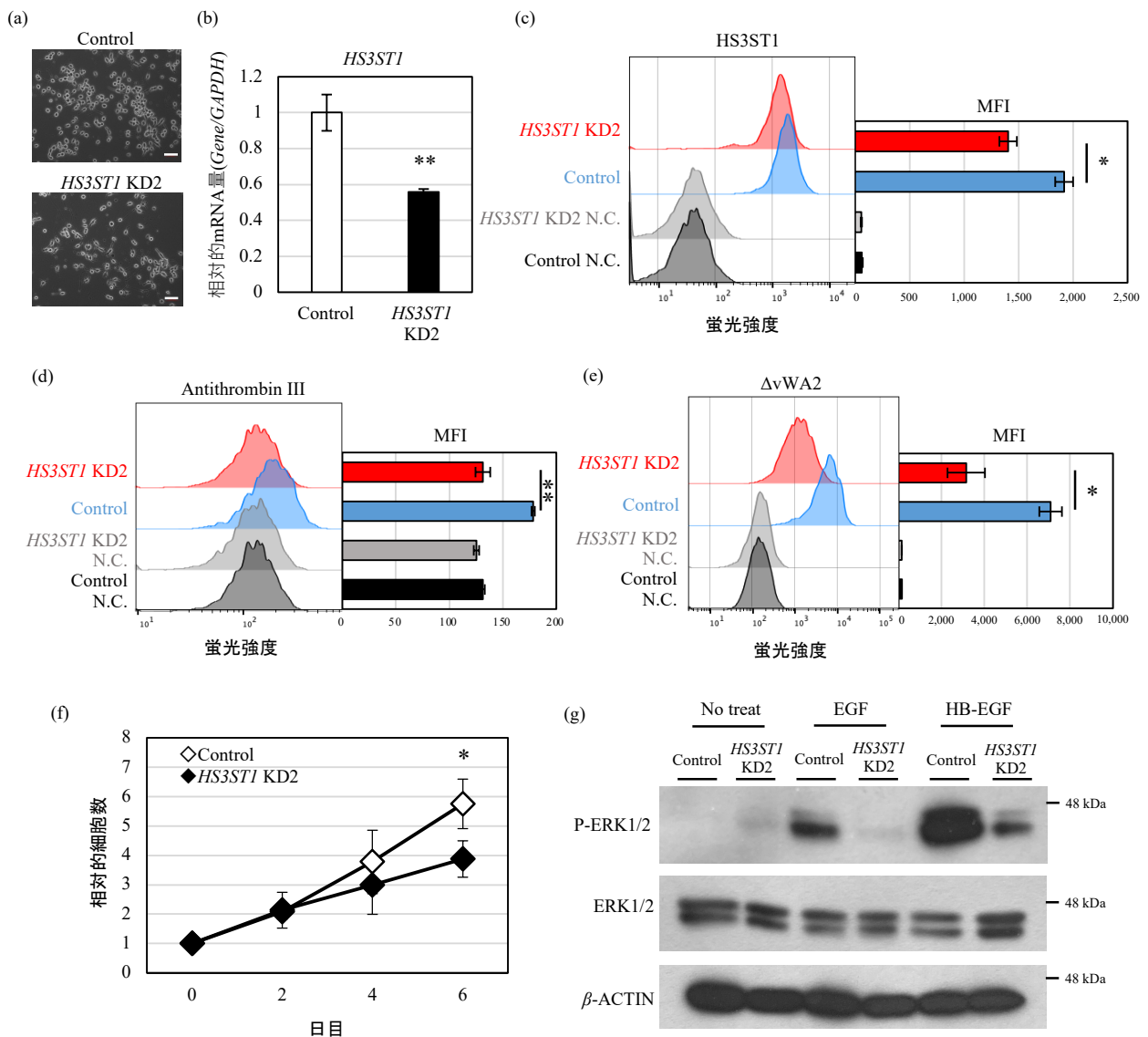
KD PC3 細胞では Antithrombin III の細胞表面への結合が減少したことから、3-OS HS の発現が減少していることがわかった(図 12a)。EGFR シグナルの活性を検討するために、*HS3ST1* KD PC3 細胞を EGF と HB-EGF で刺激した。その結果、*HS3ST1* KD PC3 細胞を EGF と HB-EGF のどちらで刺激しても ERK1/2 のリン酸化レベルが低下した。(図 12b)。すなわち、AR の発現の有無に関係なく、ホルモン非存在下で 3-OS HS が PC3 細胞および C4-2 細胞の EGFR-ERK1/2 シグナルの活性化に重要な役割を果たすことが明らかになった。





**図 9. HS3ST1 が合成する 3-OS HS は CRPC における EGFR-ERK1/2 シグナルの活性化に必要である**

- (a) CSS 含有培地で培養した *HS3ST1* KD C4-2 細胞の形態を観察した。スケールバー: 100 nm。  
 (b) *HS3ST1* KD C4-2 細胞における *HS3ST1* の発現量をリアルタイム PCR で解析した。*GAPDH* mRNA で標準化した。コントロール細胞での発現量を 1 とした。  
 (c) *HS3ST1* KD C4-2 細胞で、抗 *HS3ST1* 抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。MFI: Mean Fluorescence Intensity、N.C.: Negative Control。  
 (d, e) *HS3ST1* KD C4-2 細胞で、Antithrombin III と  $\Delta vWA2$  を用いてフローサイトメトリー解析を行った。  
 (f) *HS3ST1* KD C4-2 細胞の増殖能を測定した。  
 (g) *HS3ST1* KD C4-2 細胞をリガンド刺激し、ウェスタンブロット解析で ERK1/2 シグナルの活性を検討した。EGF と HB-EGF (各 1 ng/ml、7.5 分間)で刺激した。下部には、リン酸化 ERK1/2(P-ERK1/2)の定量結果を示した。発現量は  $\beta$ -ACTIN で標準化した。  
 (h, i) *HS3ST1* KD C4-2 細胞で、蛍光標識された EGF と HB-EGF を用いてフローサイトメトリー解析を行い、細胞へのリガンドの結合を検討した。  
 n=3、\*(p<0.05)、\*\*(p<0.01)、\*\*\* (p<0.001). ND: not detected.



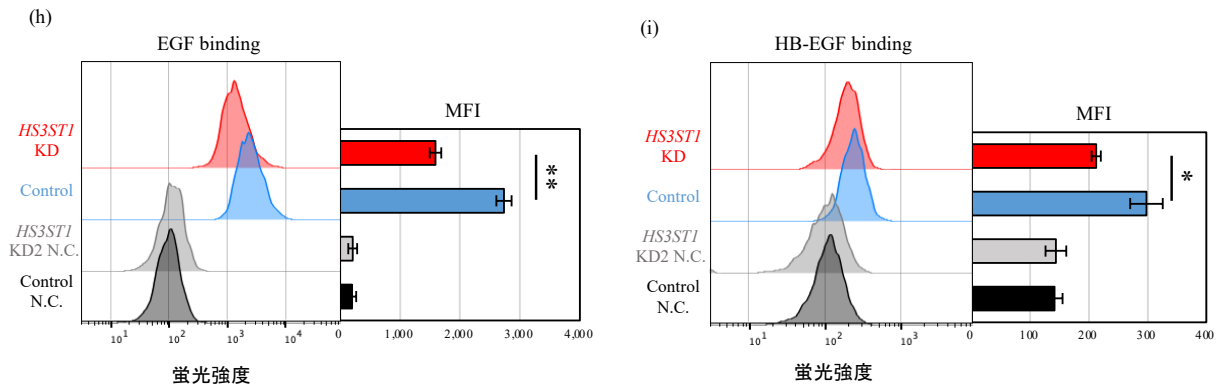


図 10. siRNA-2 を使用して *HS3ST1* を KD しても同様に EGFR-ERK1/2 シグナルが抑制される

siRNA-2 を C4-2 細胞に導入し、実験を行った。

(a) CSS 含有培地で培養した *HS3ST1* KD2 C4-2 細胞の形態を観察した。スケールバー: 100 nm。

(b) *HS3ST1* KD2 C4-2 細胞における *HS3ST1* の発現量をリアルタイム PCR で解析した。*GAPDH* mRNA で標準化した。コントロール細胞での発現量を 1 とした。

(c) *HS3ST1* KD2 C4-2 細胞で、抗 *HS3ST1* 抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。MFI: Mean Fluorescence Intensity、N.C.: Negative Control。

(d, e) *HS3ST1* KD2 C4-2 細胞で、Antithrombin III と  $\Delta$ vWA2 を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

(f) *HS3ST1* KD2 C4-2 細胞の増殖能を測定した。

(g) *HS3ST1* KD2 C4-2 細胞をリガンド刺激し、ウェスタンブロット解析で ERK1/2 シグナルの活性を検討した。EGF と HB-EGF (各 1 ng/ml、7.5 分間) で刺激した。

(h, i) *HS3ST1* KD2 C4-2 細胞で、蛍光標識された EGF と HB-EGF を用いてフローサイトメトリー解析を行い、細胞へのリガンドの結合を検討した。

n=3、\*(p<0.05)、\*\*(p<0.001)、ND: not detected.

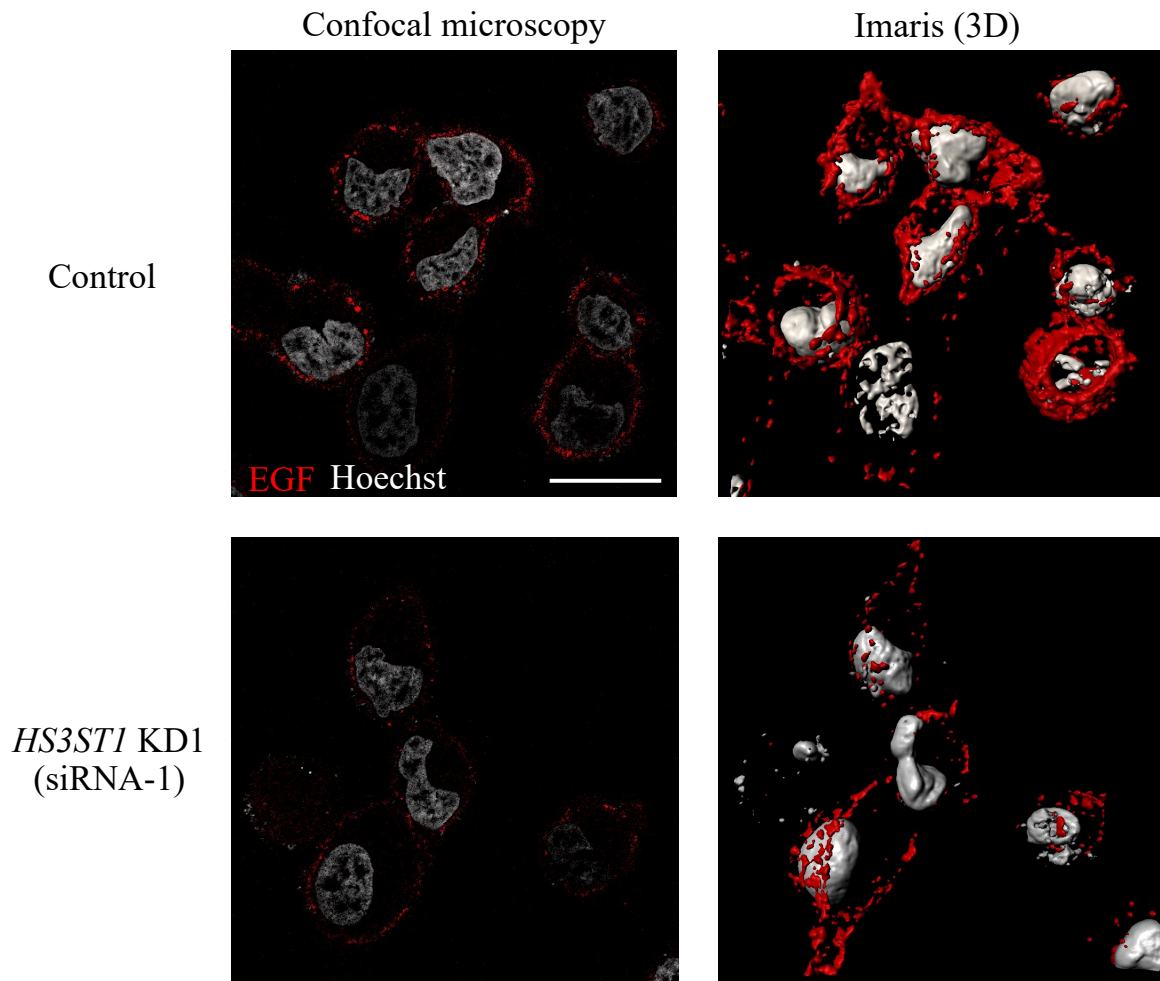


図 11. *HS3ST1* KD1 細胞では、細胞表面への EGF の結合が減少する

C4-2 細胞に *HS3ST1* siRNA-1 およびコントロール siRNA を導入した。細胞を Alexa Fluor 647 で標識された EGF で 7.5 分間刺激後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。3D イメージは Imaris を使用して作成した。  
スケールバー: 20  $\mu$ m

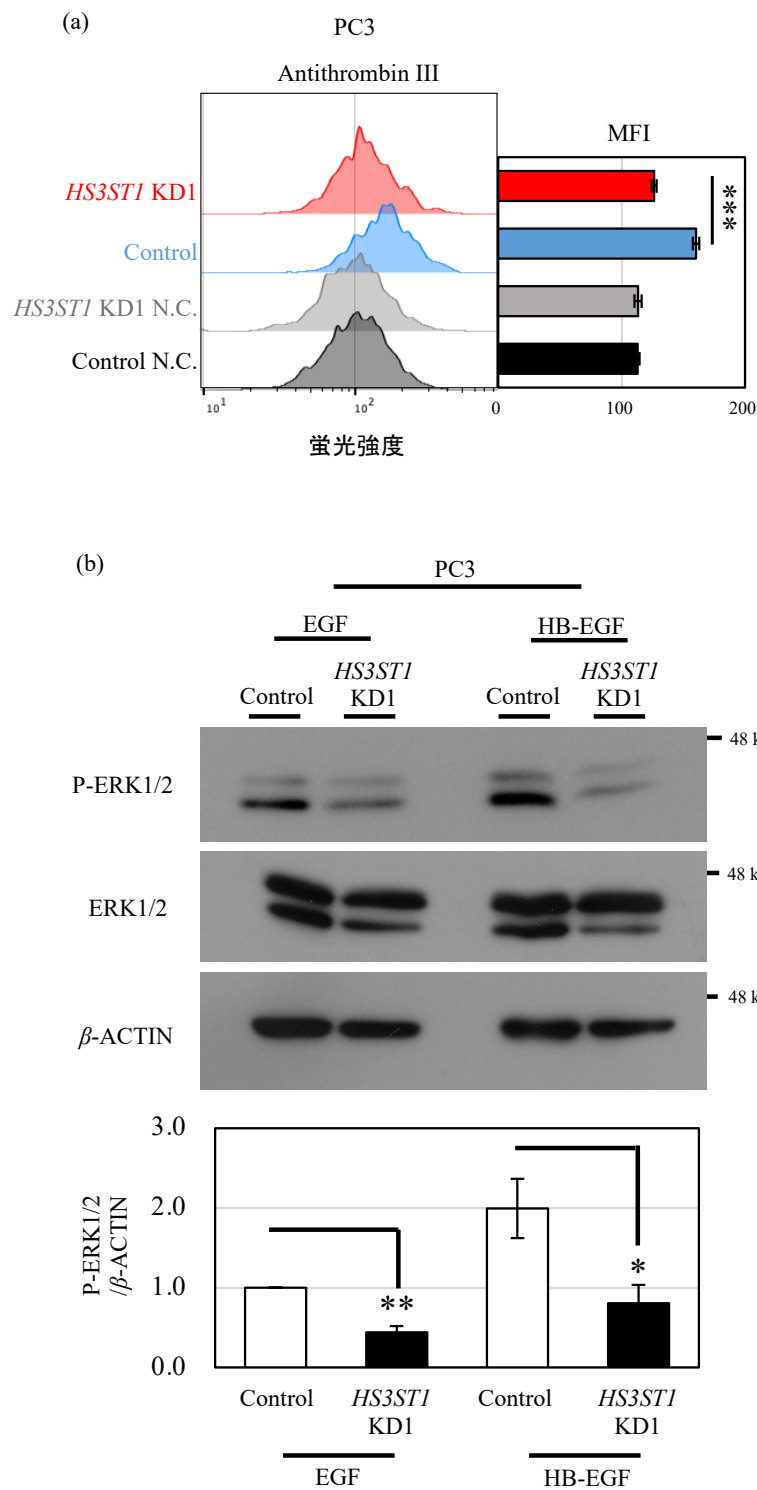


図 12. PC3 細胞においても 3-OS HS が EGFR-ERK1/2 シグナルの活性化に必要である

(a) CSS 含有培地で培養した *HS3ST1* KD1 PC3 細胞で、Antithrombin III を用いてフローサイトメトリー解析を行った。MFI: Mean Fluorescence Intensity、N.C.: Negative Control。

(b) *HS3ST1* KD1 PC3 細胞をリガンド刺激し、ウェスタンブロット解析で ERK1/2 シグナルの活性を検討した。EGF と HB-EGF (各 1 ng/ml、7.5 分間) で刺激した。下部には、リン酸化 ERK1/2 (P-ERK1/2) の定量結果を示した。発現量は  $\beta$ -ACTIN で標準化した。n=3、\*(p<0.05)、\*\*(p<0.01)、\*\*\* (p<0.001)。

## HS3ST1はARシグナルの下流で抑制されている

ARは、下流の遺伝子の転写を活性化するだけでなく、クロマチンリモデリング複合体であるポリコーム抑制複合体2 (PRC2: Polycomb Repressive Complex 2) の構成分子であるEZH2などの特定の分子と協調して転写の抑制因子としても機能することが報告されている(47-50)。最近、当研究室は、マウスESCでPRC2が複数の糖転移酵素の発現を制御することを報告した(51)。したがって、前立腺がん細胞においてもHS合成に関与する糖転移酵素と硫酸基転移酵素の発現が特定の分子によって制御されているかをChiP-Atlasのデータを用いて検討した(33)。C4-2細胞をエタノール(ホルモン非存在条件)とmibolerone(ホルモン存在条件)で培養したときのChiP-seqデータを抽出した(図13)(52,53)。Miboleroneは合成AR作動薬である。データから、C4-2細胞においてARがHS合成に関与する糖転移酵素および硫酸基転移酵素のゲノム領域に結合することがわかった。さらに、培養条件とARの結合パターンから遺伝子を3つに大別できた。ホルモン存在下でのみARが結合する遺伝子、ホルモン存在下および非存在下の両方でARが結合する遺伝子、および、どちらの条件下でもARが結合しない遺伝子の3群である。FBSおよびCSS含有培地で培養したC4-2細胞のRNA-seqデータと組み合わせると、HS合成に関連する遺伝子はARによって抑制される遺伝子(*EXT1*、*HS3ST1*)、ARによって活性化する遺伝子(*EXTL2*、*HS3ST4*、*NDST1*)、AR非依存的な遺伝子(その他)の3つのグループに分けることができた(図13)。さらに、ChiP-Atlasを用いた解析から、遺伝子発現抑制因子としてARと協調するEZH2が、ホルモン依存的に増殖するLNCaP細胞の*HS3ST1*ゲノム領域に結合することがわかった(54)。これらの事実から、ホルモン存在下でARはEZH2と共に*HS3ST1*ゲノム領域へ結合して*HS3ST1*の転写を抑制しており、ARシグナルからEGFRシグナルの切り替えを制御していることが考えられた。

	EXT1	EXT2	EXTL1	EXTL2	EXTL3	GLCE	HS2ST1	HS3ST1	HS3ST2	HS3ST3A1	HS3ST3B1	HS3ST4	HS3ST5	HS3ST6	HS6ST1	HS6ST2	HS6ST3	NDST1	NDST2	NDST3	NDST4	
ホルモン存在下でARが結合 (mibolerone) *																						
ホルモン非存在下でARが結合 (EtOH) *																						
mRNAの発現変化 (TPM (CSS/FBS))**	Up	-	-	Down	-	Up	Up	Up	-	-	Up	Down	-	Down	-	Up	-	Down	Up	-	-	
ARによって抑制される遺伝子候補																						
ARによって活性化される遺伝子候補																						
AR非依存的な制御を受ける遺伝子候補																						

図 13. AR によって抑制される遺伝子と AR によって活性化する遺伝子の候補

ChiP-Atlas を用いて、HS 合成に関わる遺伝子に AR が結合するかどうかを解析した。\*: mibolerone はホルモン存在化での C4-2 の培養、EtOH はホルモン非存在下での培養を示す。各条件において AR が結合する場合は遺伝子のカラムを灰色で示した(52,53)。\*\*: 図 5 の RNA-seq データにおいて、CSS 含有培地で培養したときに遺伝子の発現が増加した(赤)か、減少した(青)かを示した。下部 3 行は、上記の情報をもとに、AR によって抑制される遺伝子と AR によって活性化する遺伝子、AR 非依存的な制御を受ける遺伝子のいずれに該当するかを示した。該当する分類のカラムを灰色で示した。

## CRPC の増殖は EGFR シグナルに依存している

CRPC における EGFR シグナルを標的とした治療の可能性を検討した。C4-2 細胞において EGFR シグナルを阻害するために、EGFR 阻害剤である Gefitinib を培地に添加し、増殖能を測定した。Gefitinib は非小細胞性肺がんの治療でよく使用される抗がん剤である(34,35)。FBS および CSS 含有培地に Gefitinib (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu$ M) を添加したところ、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞の増殖の方がより強く抑制された(図 14a)。FBS 含有培地で培養した C4-2 細胞において、0, 0.01、および 0.1  $\mu$ M の Gefitinib を添加したときには増殖に変化がなかった。しかし、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞においては、0.1  $\mu$ M Gefitinib を添加したときに有意に増殖が抑制された(図 14a)。Gefitinib の阻害作用の有効度を示す IC<sub>50</sub> (50%阻害濃度)を計算した。FBS 含有培地における C4-2 細胞に対する Gefitinib の IC<sub>50</sub> は 3.67  $\mu$ M であったが、CSS 含有培地における IC<sub>50</sub> は 0.33  $\mu$ M であった (図 14b)。これらの結果から、Gefitinib の EGFR 阻害作用は、ホルモン依存的に増殖する C4-2 細胞に対してよりもホルモン非依存的に増殖する C4-2 細胞に対しての方が効果的であることがわかった。すなわち、ホルモン非依存的に増殖する C4-2 細胞は EGFR シグナルにより依存していることをより強調した。

Gefitinib の前立腺がん腫瘍への影響を検討するために、ヌードマウスを用いた C4-2 細胞の異種移植腫瘍モデルを作成した(図 15)。腫瘍形成後、Gefitinib (0, 50, 100 mg/kg)を腹腔内投与し、腫瘍のサイズを 12 日間測定した。(図 16)。Gefitinib 投与後 12 日目に腫瘍を摘出し、腫瘍の重さを測定した(表 5)。さらに、グループ間の腫瘍の大きさをわかりやすくするために、摘出した腫瘍の切片を HE 染色し、観察した(図 17)。まず、未処置のヌードマウスにおける CSS 含有培地由来の C4-2 腫瘍に対する Gefitinib の効果(薄い青、青、濃い青点線)について着目すると、Gefitinib を 0, 50, 100 mg/kg と濃度を振っても濃度依存的な Gefitinib の抗腫瘍効果はなかった。これは、CSS 含有培地中で EGFR シグナルに依存していた C4-2 は、ホルモンを分泌する未処置マウスにおいて、AR シグナルにも依存して増殖しているためであると考えられた。そして、去勢ヌードマウスにおける CSS 含有培地由来の C4-2 腫瘍に対する Gefitinib の効果(黄色、オレンジ、赤実線)について着目すると、100 mg/kg の Gefitinib によって 6 日目に有意に腫瘍の大きさが抑制された。これは、EGFR シグナルに依存していた C4-2 は去勢マウスにおいても EGFR シグナルに依存したままであるため、Gefitinib の効果が現れたと考えた。マウスに 100 mg/kg Gefitinib を投与した場合に着目した。未処置マウスにおける FBS 含有培地で培養した細胞由来の腫瘍(黒の点線)よりも、去勢マウスにおける CSS 含有培地で培養した細胞由来の腫瘍(赤の実線)ははるかに小さくなった(図 16, 17)。さらに、未処置マウスを使用するとき、FBS 含有培地で培養した細胞由来の腫瘍(黒の点線)よりも、CSS 含有培地で培養した細胞由来の腫瘍(青の点線)に対しての方が Gefitinib の効果が示された。CSS 含有培地で培養した細胞を使用するとき、未処置マウスで形成した腫瘍(青の点線)よりも去勢マウスでの腫瘍(赤の実線)の方が Gefitinib の効果が示された。すなわち、ホルモンを除去した条件下の方が Gefitinib の効果が大きいということがわかった。HE 染色した腫瘍の切片は、ホルモン非存在下における腫瘍への Gefitinib 治療の有効性をより強調した(図 17)。これらの結果は、Gefitinib の抗腫瘍効果はホルモン非存在下の前立腺がん腫瘍に有効であり、CRPC のホルモン非依存的増殖が EGFR シグナルに依存していることを明らかにした。

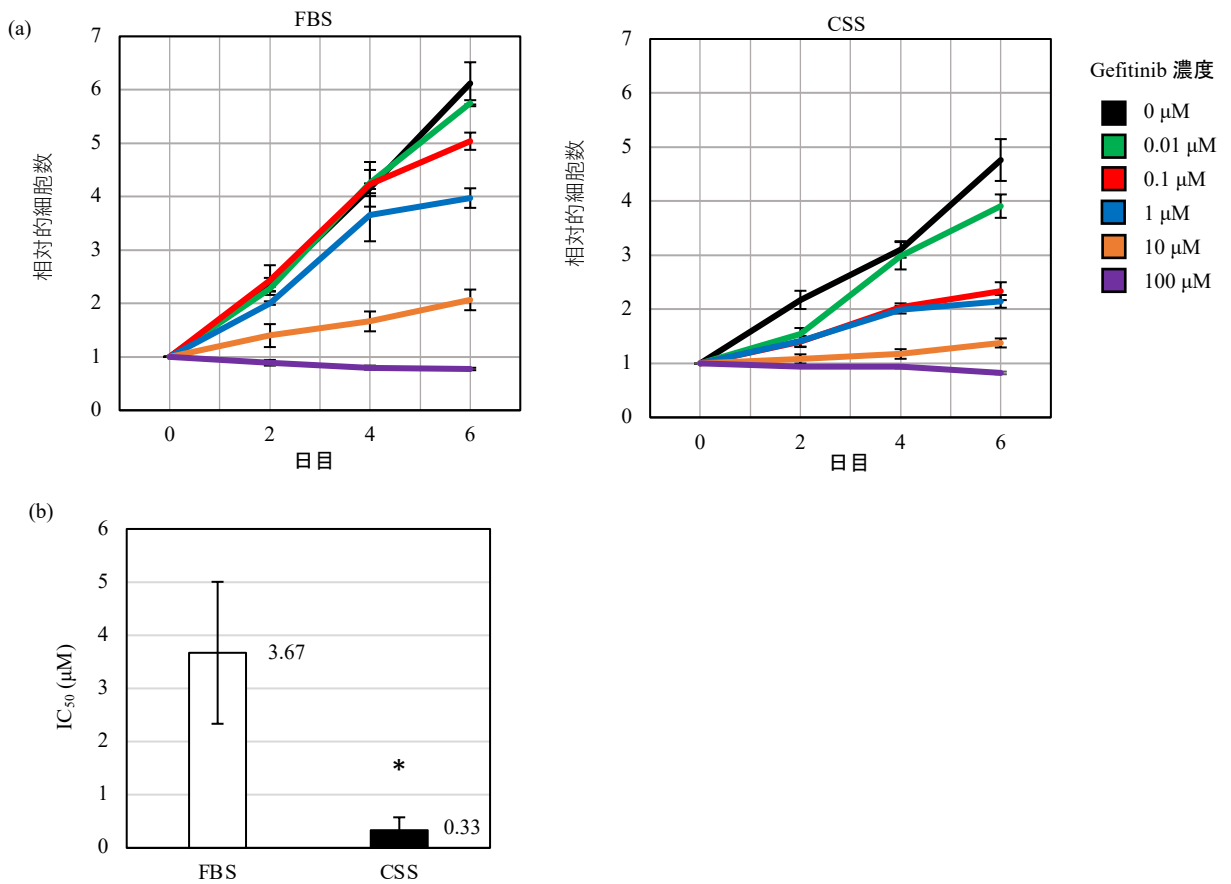


図 14. CSS 含有培地で培養した C4-2 の増殖は EGFR シグナルに依存している

(a) FBS および CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞に Gefitinib を添加し、増殖能を測定した。コントロールには DMSO を使用した。

(b) FBS および CSS 含有培地中での C4-2 細胞に対する Gefitinib の IC<sub>50</sub> を算出した。

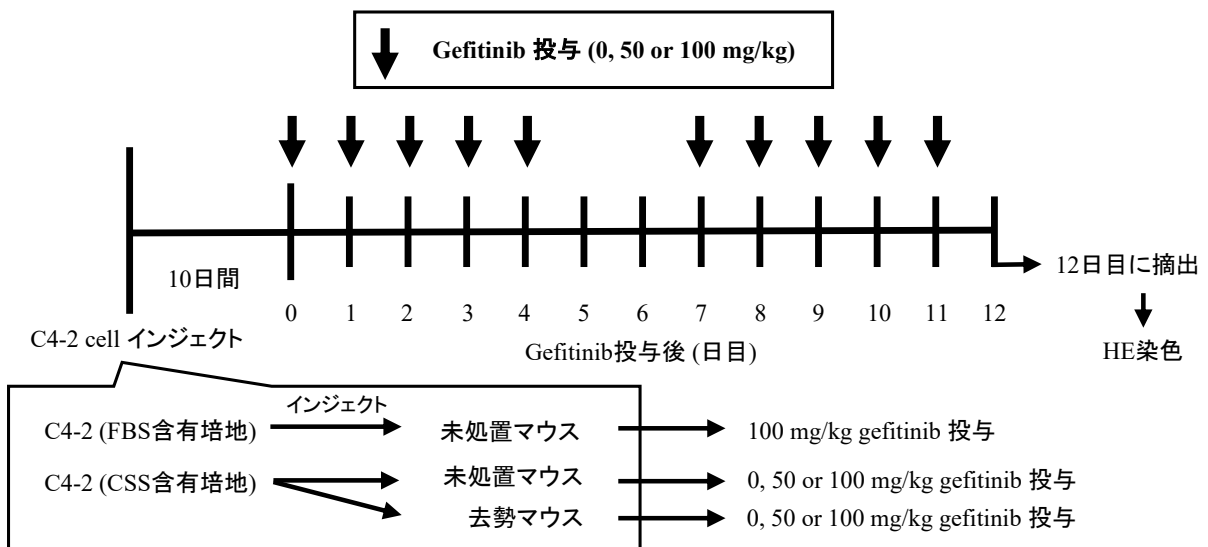
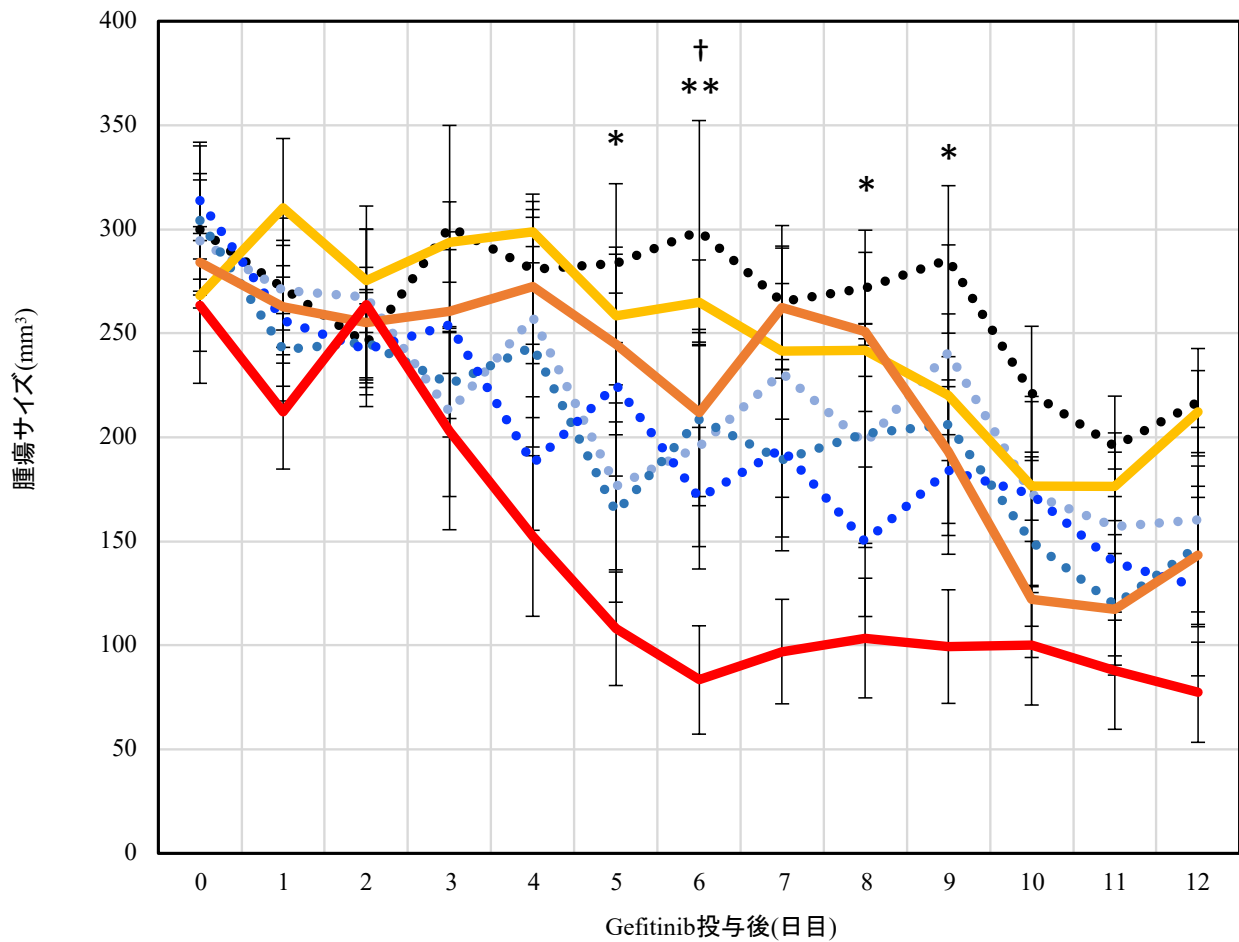


図 15. 異種移植腫瘍実験の概要



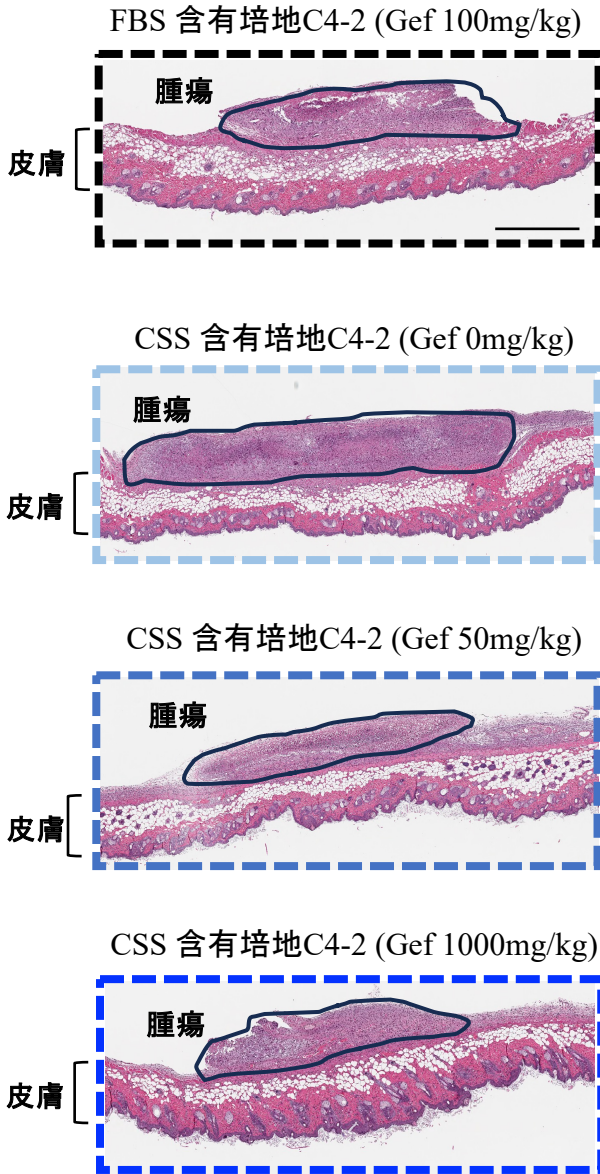


- Gefitinib 100 mg/kg n=10  
(未処置マウス & FBS含有培地由来C4-2)
- Gefitinib 0 mg/kg n=9  
(未処置マウス & CSS含有培地由来C4-2)
- Gefitinib 50 mg/kg n=9  
(未処置マウス & CSS含有培地由来C4-2)
- Gefitinib 100 mg/kg n=10  
(未処置マウス & CSS含有培地由来C4-2)
- Gefitinib 0 mg/kg n=10  
(去勢マウス & CSS含有培地由来C4-2)
- Gefitinib 50 mg/kg n=10  
(去勢マウス & CSS含有培地由来C4-2)
- Gefitinib 100 mg/kg n=10  
(去勢マウス & CSS含有培地由来C4-2)

**図 16. CRPC の増殖は EGFR シグナルに依存している**

各グループの腫瘍の大きさを 12 日間計測し、Gefitinib の効果を観察した。未処置マウスにおける FBS 含有培地由来 C4-2 腫瘍に対する 100 mg/kg Gefitinib 投与(黒点線)と、去勢マウスにおける CSS 含有培地由来 C4-2 腫瘍に対する 100 mg/kg Gefitinib 投与(赤実線)との間の統計的有意性を 5、8、9 日目では \* ( $p < 0.05$ )、6 日目では \*\* ( $p < 0.01$ ) として示している。去勢マウスにおける CSS 含有培地由来 C4-2 腫瘍に対する 0 mg/kg Gefitinib 投与(黄色実線) と、100 mg/kg Gefitinib 投与(赤色の実線) の間の統計的有意性を、6 日目で † ( $p < 0.05$ ) として示した。

## 未処置マウス



## 去勢マウス

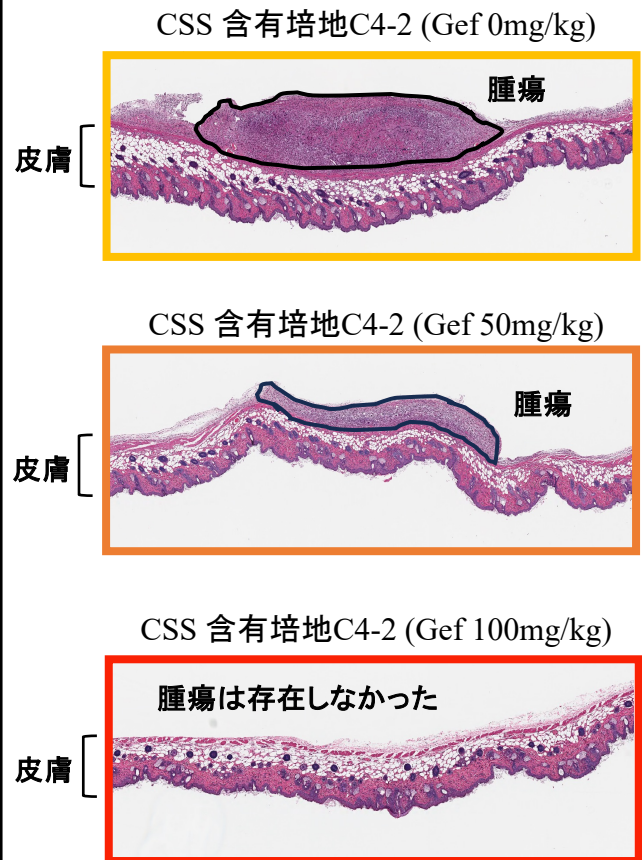


図 17. 異種移植モデル実験の腫瘍の HE 染色像

ヌードマウスで形成した C4-2 腫瘍を 12 日目に採材し、切片を HE 染色した。皮膚と、腫瘍の部分を図中に示した。枠の色は図 16 と対応している。ここでは、代表的な画像を示している。スケールバー: 800  $\mu$  m

表 5. 異種移植腫瘍の重さ一覧 \*; 重さを測定するには小さすぎたためデータ無し

サンプル No.	腫瘍の重さ (mg)
1	7.8
2	11.9
3	13.74
4	*
5	14.94
6	15.14
7	18.76
8	17.86
9	*
10	9.6

サンプル No.	腫瘍の重さ (mg)
1	0
2	19.34
3	5.24
4	0
5	9.06
6	14.42
7	*
8	*
9	26.32
10	15.74
1	*
2	11.36
3	0
4	0
5	13.2
6	0
7	14.18
8	*
9	18.32
1	0
2	*
3	0
4	*
5	0
6	14.1
7	11.3
8	13.68
9	13.52

サンプル No.	腫瘍の重さ (mg)
1	*
2	5.1
3	*
4	16.6
5	19.18
6	9.16
7	*
8	14.06
9	12.3
10	0
1	12.14
2	0
3	*
4	*
5	*
6	*
7	10.76
8	13.64
9	12.16
10	14.7
1	0
2	0
3	0
4	0
5	6.94
6	8.1
7	*
8	16.08
9	*
10	14.84

## 4. 考察

本研究では、AR シグナルから 3-OS HS を介した EGFR シグナルに切り替わることにより前立腺がんが去勢抵抗性を獲得する機構を明らかにした。テストステロンやジヒドロテストステロンなどのアンドロゲンホルモンは、AR シグナルを活性化させ、前立腺がん細胞の増殖を促進する。前立腺がんにおいて AR シグナルが活性化されると、*HS3ST1* および 3-OS HS の発現が抑制される。しかし、ADT によって前立腺がんにおける AR シグナルが抑制されると、*HS3ST1* および 3-OS HS の発現が上昇し、EGF および HB-EGF が 3-OS HS を介して EGFR を活性化する。EGFR シグナルの活性化によって前立腺がんはホルモン非存在下でも増殖することが可能になり、去勢抵抗性を獲得した CRPC となる。CRPC の去勢抵抗性獲得、および増殖は、*HS3ST1* が合成する 3-OS HS が EGFR シグナルの活性化重要な因子であることが明らかになった。

本研究では、CRPC モデルとして C4-2 細胞を用いて実験を行った。C4-2 細胞の培養条件を FBS 含有培地および CSS 含有培地を用いて制御することで、前立腺がんと CRPC の増殖環境を模倣することができた。CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞では、AR シグナルの標的遺伝子である *PSA* の発現が低下し、EGF および HB-EGF によって ERK1/2 が活性化することが明らかになった。これらの結果は、ホルモン非存在化において、前立腺がんの AR シグナルが抑制され、EGFR シグナルが活性化することを示していた。逆に、CSS 含有培地から FBS 含有培地に切り替えると、EGFR シグナルが抑制され、*PSA* の発現が回復した。これらの結果は、前立腺がんにおける AR と EGFR シグナリングの切り替えは、ホルモンの存在に依存する可逆的なものであり、AR シグナルが EGFR シグナルを抑制することを示している。

これまで、前立腺がんにおいて、AR と EGFR シグナルのクロストークは、細胞株や培養条件によって異なる議論がされてきた。EGF-EGFR シグナルは、ホルモン依存적および非依存적増殖をする細胞株の両方で AR および *PSA* の発現を抑制すると報告されている(55-57)。一方で、ホルモン非依存적増殖をする VCap 細胞では、EGFR、AR、および Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) が、がんの進行を促進するために協調することが報告されている(58)。このように、前立腺がんにおける AR と EGFR シグナルのクロスト

ークについては、一致した見解は得られていなかった。本研究は、ホルモンが除かれると、CRPC においては HS3ST1 を介して AR シグナルから EGFR シグナルへ切り替わるという新たな事実を示した。

本研究では、ホルモン非存在下での C4-2 細胞における *HS3ST1* 遺伝子の KD 実験から、HS3ST1 が合成する 3-O-S HS が EGFR シグナルを活性化し、ホルモン非依存的な増殖を促進することを明らかにした。HB-EGF に加えて、EGF も 3-O-S HS に結合することで EGFR シグナリングが活性化されることを示したことは特に重要である。これまで EGF はヘパリン結合ドメインを欠いているため HS に結合しないと報告されていた(59-62)。ある研究グループは、HS3ST2 が合成する 3-O-S HS が EGF を捕捉し、シグナルの活性化を阻害すること報告をしている(63)。3-O-S HS と EGF の直接的な相互作用を示す結果は提示していないが、3-O-S HS と EGF が相互作用するという本研究の結果を裏付けている。さらに、本研究は、HB-EGF と HS の強い結合が 3-O-S HS によって制御されていることを示唆している。

ホルモン非依存的な前立腺がん細胞において、HS の硫酸化パターンの違いによって HS の機能が異なることがいくつか報告されている。たとえば、2-O-硫酸化 HS を合成する HS2ST が C4-2B 細胞の増殖と浸潤を促進することが報告されている(64)。一方で、6-O-硫酸化を除去する SULF2 が、DU145 および PC3 細胞の生存と遊走を促進し、6-O-硫酸化が CRPC の腫瘍形成能を抑制することを報告している(65)。したがって、HS の機能はその硫酸化パターンに依存することが考えられてきた。しかし、これらの報告は FBS を使用し、ホルモン存在下において去勢抵抗性前立腺がんを培養していた。つまり、これらは去勢をした条件を反映していない実験であった。本研究は、C4-2 細胞を、FBS と CSS を用いてホルモン依存的、非依存的な条件を明確に定義し、去勢抵抗性前立腺がんの増殖メカニズムの解明を正確に初めて行い、3-O-硫酸化ヘパリン硫酸が EGFR シグナルを活性化するという去勢抵抗性前立腺がんにおけるヘパリン硫酸の機能を初めて明らかにした。

本研究は前立腺がんの去勢抵抗性獲得、また、CRPC の増殖における HS の 3-O-硫酸化の重要性を示した。また、HS が機能するためにはコアタンパク質の存在が必要である。FBS および CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞における HS プロテオグリカン(HSPG)遺伝子の発現を RNA-seq のデータから抽出した(図 18)。ホルモン非存在下で 14 個の HSPG 遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった。これらの HSPG は、HS3ST1 が合成する 3-O-S HS のコアタンパク質の候補となりうる。Syndecan-1、Glypican-

1、および Perlecan は、ホルモン非依存的前立腺がん細胞株においてよく研究されている(66-68)。Syndecan-1 は、患者の CRPC 腫瘍の進行と化学療法耐性と関連していることも報告されている(69,70)。HSPG の機能は HS の硫酸化パターンによっても異なるため、本研究の成果は前立腺がんにおける HSPG の役割の解明にも貢献すると考えられた。

ヌードマウスにおける異種移植腫瘍モデルでは、EGFR 阻害剤である Gefitinib が、ホルモン非存在下でより効果的に前立腺がん細胞の増殖を抑制することが明らかになった。現在、CRPC の治療においては、Docetaxel と Cabazitaxel というタキサン系薬剤が一般的に使用されている(71,72)。タキサン系薬剤は微小管に結合し、微小管の重合を安定化させると同時に細胞分裂を阻害する。CRPC だけでなく、正常細胞にも微小管への影響を及ぼすため、一般的にタキサン系薬剤は患者に強い副作用をもたらす。本研究では、副作用が少ない分子標的治療薬である Gefitinib が CRPC の治療に効果的であることを示した。これまでの去勢抵抗性前立腺がんの治療はホルモン除去療法後に、去勢抵抗性を獲得したがん細胞が残存した場合に抗がん剤治療を行うものであった。そのため、去勢抵抗性前立腺がんによる死亡率が高まっていた。本研究は、前立腺がんに対するホルモン除去療法と同時に Gefitinib を投与することで、3-OS HS を介した EGFR シグナルへの切り替えが抑制され、前立腺がんの去勢抵抗性獲得を予防するという新規治療を提案する。

EGF は EGFR のみに結合し、HB-EGF は EGFR と HER4 に結合する(73)。本研究は、C4-2 細胞において EGFR ファミリー(EGFR、HER2、HER3、HER4)のうち、EGFR のみが発現していることを明らかにした。したがって、C4-2 細胞での HB-EGF による ERK1/2 の活性化は、HER4 ではなく EGFR を介してのシグナルであることが考えられた。EGFR が主に機能する C4-2 細胞において、EGFR 特異的な阻害剤である Gefitinib を選択して使用したことは妥当であり、CRPC に対する大きな効果を観察することができた。

本研究では、細胞表面の HS の硫酸化とその機能に焦点を当てた。一般的に、異種移植腫瘍実験では、腫瘍形成の足場として Matrigel が使用される。しかし、Matrigel の成分には HS が含まれている。さらに、Matrigel 中の HS 構造は同定されておらず、Matrigel のロットによっても構造が異なる。したがって、本研究では、細胞表面 HS による結果なのか、Matrigel 中の HS の結果なのかが判断できなくなるため、Matrigel を使用しないことを選択した。結果として、腫瘍が本来よりも小さくなったと考えた。また、マウス間で去勢

の効果に違いがある可能性があるため結果に個体差が出ると考えた。去勢の効果を示すための実験として去勢マウスの血液中のホルモン量を検討することが考えられるが、本研究では行っていない。

IL-6/STAT3 シグナル伝達も、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞の増殖に寄与する可能性がある。本研究は、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞において IL-6/STAT3 シグナルも活性化することを明らかにした。IL-6/STAT3 シグナルも、CRPC の進行において重要な制御因子であると報告されている(74)。当研究室は以前、マウス ESC において LIF/STAT3 シグナルが活性化するために LIF 受容体と gp130 の GalNAc  $\beta$  1-4GlcNAc(LacdiNAc) 構造が必要であることを報告した(75)。IL-6 も LIF と同様に、gp130 に結合して下流のシグナルを活性化するため、LacdiNAc 構造が CRPC における IL-6/STAT3 シグナル伝達の活性化にも関与している可能性がある。

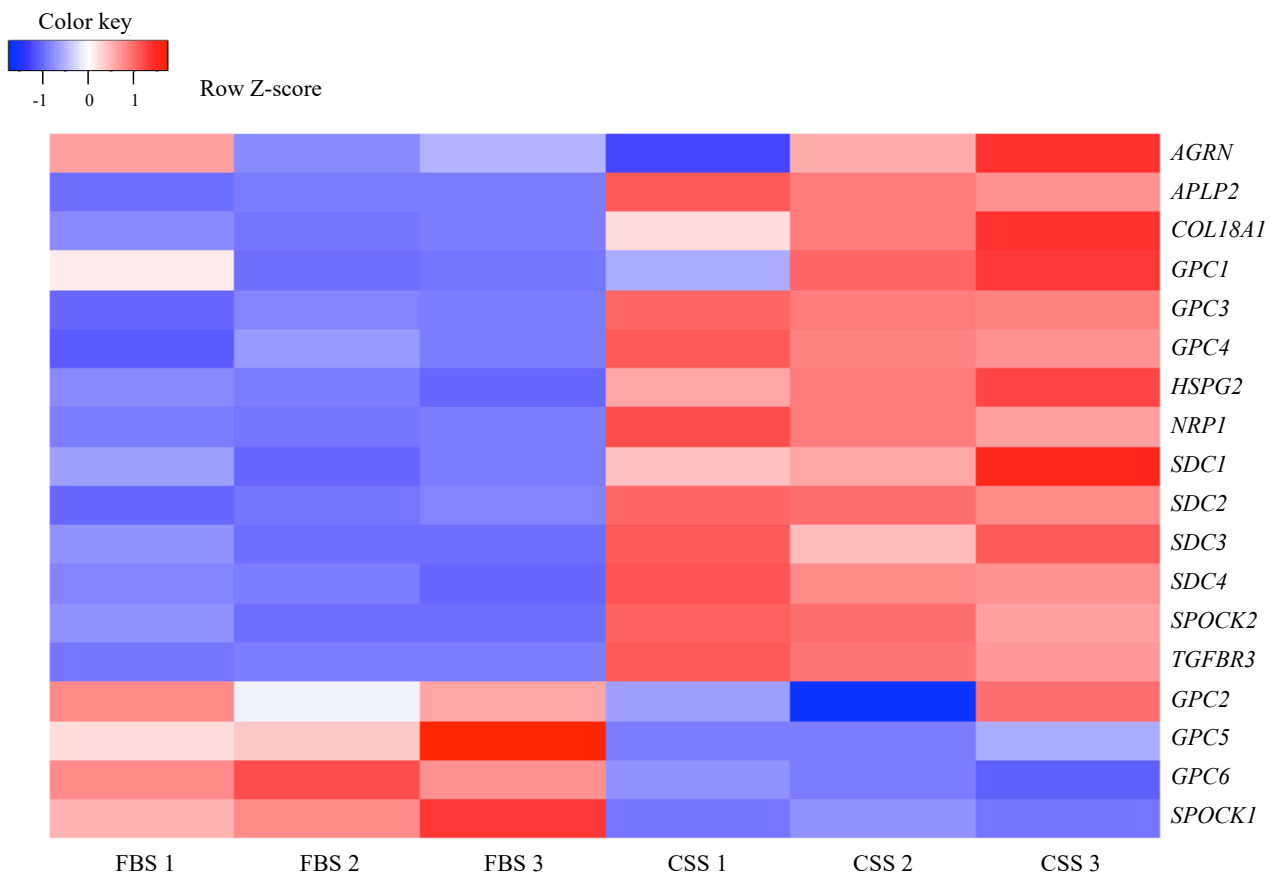


図 18. CRPC で HS が合成する 3-OS HS のコアプロテイン候補の遺伝子発現

FBS および CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞の RNA-seq データから HSPG の遺伝子の発現量を抽出し、ヒートマップを作成した。発現が高い遺伝子は赤、低い遺伝子は青で示した。

## 5. 結論

本研究は、前立腺がん細胞が AR シグナルを介したホルモン依存的な増殖から EGFR シグナルを介したホルモン非依存的な増殖に切り替わる去勢抵抗性獲得機構を明らかにした(図 19)。前立腺がんにおいては、アンドロゲンが AR シグナルを活性化させ、ホルモン依存的な増殖を促進する。前立腺がんにおいて AR シグナルが活性化されると、PSA の発現が上昇し、HS3ST1 および 3-OS HS の発現が抑制される。しかし、ADT によって AR シグナルが抑制されると、HS3ST1 および 3-OS HS の発現が上昇し、EGF および HB-EGF が 3-OS HS を介して EGFR シグナルを活性化する。この 3-OS HS を介した EGFR シグナルの活性化が前立腺がんの去勢抵抗性獲得の鍵となり、CRPC がホルモン非依存的な増殖を行う。本研究では、CRPC の去勢抵抗性獲得、および増殖は、HS3ST1 が合成する 3-OS HS が EGFR シグナルの活性化に重要な因子であることが明らかになった。さらに、EGFR 阻害剤の Gefitinib が CRPC の増殖抑制に効果的であることを見出した。本研究成果から、ADT と同時に Gefitinib を投与することで前立腺がんの去勢抵抗性獲得を抑制するという新規治療法を提案した。

また、本研究の新規性は、前立腺がんの去勢抵抗性獲得機構を解明したこと、去勢抵抗性前立腺がんにおいて 3-OS HS を介して EGFR シグナルが活性化することを明らかにしたこと、ヘパラン硫酸に結合しないとされていた EGF が 3-OS HS を介して細胞表面に結合することを明らかにしたこと、去勢と同時に Gefitinib を投与することで前立腺がんの去勢抵抗性獲得を抑制する新規の治療に繋がる成果を示したことであり、本研究は、がん細胞における分子細胞生物学的、糖鎖生物学的意義を持つと共に、前立腺がんの新規治療に貢献する成果を提示した。



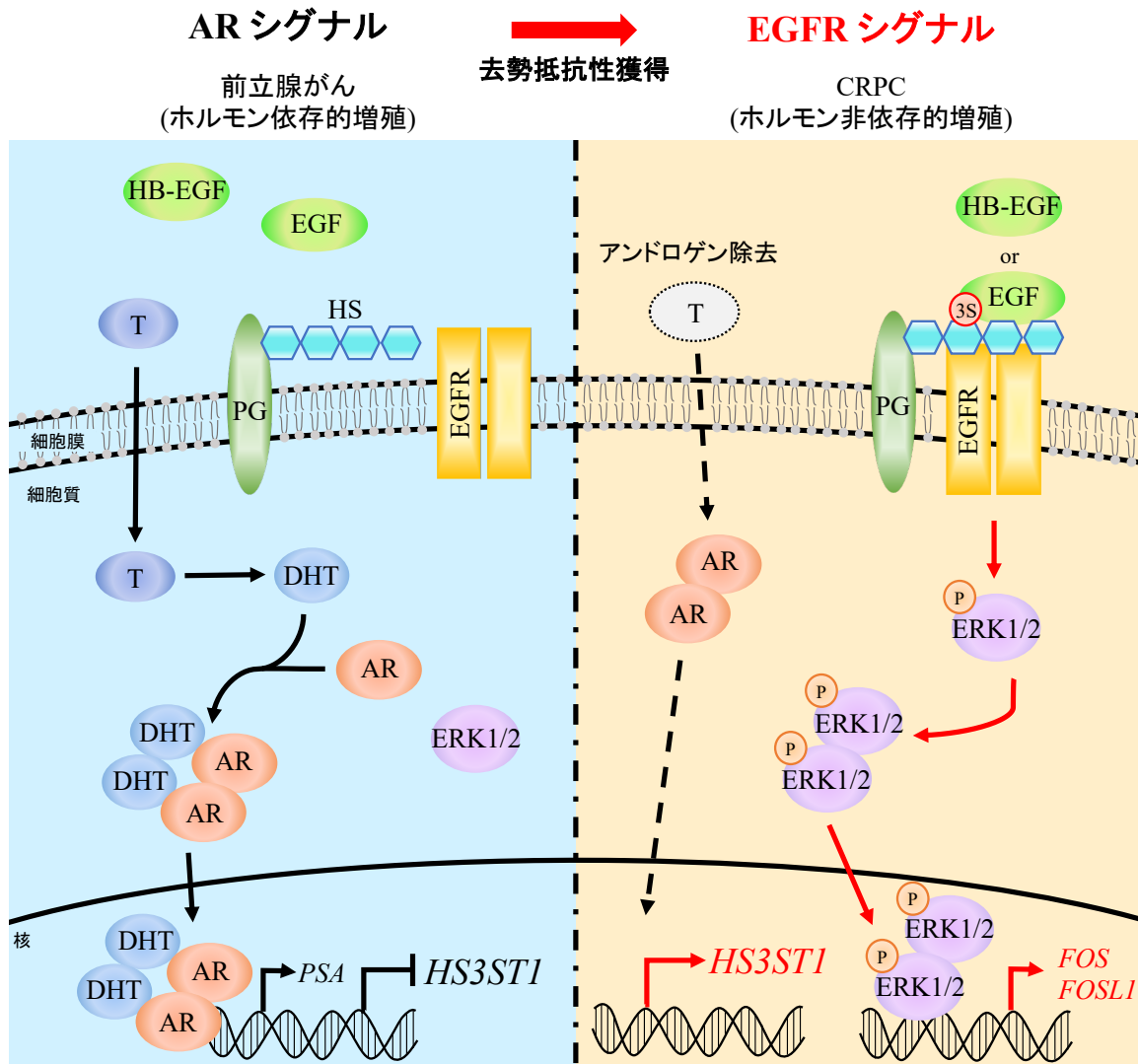


図 19. 3-OS HS を介した去勢抵抗性獲得機構

アンドロゲンが存在する状態では、前立腺がんは AR シグナルの活性化を通じて増殖する。この時、AR シグナルの下流では HS3ST1 の発現が抑制されている。アンドロゲン除去後、つまり AR シグナルの抑制後、HS3ST1 とその生成物である 3-OS HS の発現が上昇する。EGF と HB-EGF が 3-OS HS を介して EGFR に結合することで EGFR-ERK1/2 シグナルを活性化する。EGFR シグナルが AR シグナルの代わりに CRPC の増殖を促進し、細胞は去勢抵抗性を獲得する。

T: testosterone, DHT: dihydrotestosterone, PG: proteoglycan.

## 6. 謝辞

本研究は、創価大学工学部の西原祥子教授の指導のもとで行いました。西原祥子教授には、本研究の機会を与えていただき、ご指導をいただきましたことに心から感謝申し上げます。また、日々議論を深めてきた西原研究室のメンバーにも感謝いたします。副査として本論文の審査と助言をしていただいた高瀬明先生、梶谷内晶先生に感謝申し上げます。

本研究において様々な助言と協力をいただいた共同研究者の皆様にも感謝の意を表します。名城大学の水本先生、山田先生にはヘパラン硫酸の構造解析にご協力いただきました。深く感謝いたします。愛知県がんセンターの中西速夫先生からは、マウスへの細胞のインジェクション方法や薬剤投与の方法をご教授いただきました。深く感謝いたします。池原譲先生をはじめとする千葉大学の先生方には、組織学的側面からご協力していただきました。深く感謝いたします。東京大学の山本一夫先生からは、レクチンを分与していただきました。深く感謝いたします。特に、千葉大学池原譲先生と東京大学の山本一夫先生におかれましては、何度もご議論の機会をいただき、多くの助言をいただきました。心から感謝申し上げます。

他にも多くの方々のご協力をいただき、研究を進めることができました。改めて感謝申し上げます。

最後に、創立者池田先生と、ずっと見守り支えてくれた家族に心から感謝いたします。

## 7. 参考文献

1. Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 69, 7–34 (2019).
2. Lu, S., Tsai, S.Y. & Tsai, M.J. Regulation of androgen-dependent prostatic cancer cell growth: androgen regulation of CDK2, CDK4, and CKI p16 genes. *Cancer Res.* 57, 4511–4516 (1997).
3. Stamey, T.A., Yang, N., Hay, A.R., McNeal, J.E., Freiha, F.S. & Redwine, E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med.* 317, 909–916 (1987).
4. Pignon, J.C., Koopmansch, B., Nolens, G., Delacroix, L., Waltregny, D. & Winkler, R. Androgen receptor controls EGFR and ERBB2 gene expression at different levels in prostate cancer cell lines. *Cancer Res.* 69, 2941–2949 (2009).
5. Imada, K., Shiota, M., Kohashi, K., Kuroiwa, K., Song, Y., Sugimoto, M., Naito, S. & Oda, Y. Mutual regulation between Raf/MEK/ERK signaling and Y-box-binding protein-1 promotes prostate cancer progression. *Clin Cancer Res.* 19, 4638–4650 (2013).
6. Nickols, N.G., Nazarian, R., Zhao, S.G., Tan, V., Uzunangelov, V., Xia, Z., Baertsch, R., Neeman, E., Gao, A.C., Thomas, G.V., Howard, L., De Hoedt, A.M., Stuart, J., Goldstein, T., Chi, K., Gleave, M.E., Graff, J.N., Beer, T.M., Drake, J.M., Evans, C.P., Aggarwal, R., Foye, A., Feng, F.Y., Small, E.J., Aronson, W.J., Freedland, S.J., Witte, O.N., Huang, J., Alumkal, J.J., Reiter, R.E. & Rettig, M.B. MEK-ERK signaling is a therapeutic target in metastatic castration resistant prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 22, 531–538 (2019).
7. Drake, J.M., Graham, N.A., Lee, J.K., Stoyanova, T., Faltermeier, C.M., Sud, S., Titz, B., Huang, J., Pienta, K.J., Graeber, T.G. & Witte, O.N. Metastatic castration-resistant prostate cancer reveals inpatient similarity and interpatient heterogeneity of therapeutic kinase targets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110, E4762–E4769 (2013).
8. Cook, N., Frese, K. & Moore, M. Assessing the role of the EGF receptor in the development and progression of pancreatic cancer. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy.* 4, 23–27 (2014).
9. Nadanaka, S., Ishida, M., Ikegami, M. & Kitagawa, H. Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 modulates Wnt-3a signaling through control of E disaccharide expression of chondroitin sulfate. *J Biol Chem.* 283, 27333–27343 (2008).
10. Ogura, C. & Nishihara, S. Dermatan-4-O-sulfotransferase-1 contributes to the undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Front Cell Dev Biol.* 9, 733964 (2021).

11. Miura, T., Yuasa, N., Ota, H., Habu, M., Kawano, M., Nakayama, F. & Nishihara, S. Highly sulfated hyaluronic acid maintains human induced pluripotent stem cells under feeder-free and bFGF-free conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 518, 506–512 (2019).
12. Hirano, K., Sasaki, N., Ichimiya, T., Miura, T., Van Kuppevelt, T.H. & Nishihara, S. 3-*O*-sulfated heparan sulfate recognized by the antibody HS4C3 contribute to the differentiation of mouse embryonic stem cells via Fas signaling. *PLoS One.* 7, e43440 (2012).
13. Sasaki, N., Okishio, K., Ui-Tei, K., Saigo, K., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Nishimura, T., Suda, Y., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Hitoshi, S., Ikenaka, K. & Nishihara, S. Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 283, 3594–3606 (2008).
14. Sasaki, N., Hirano, T., Ichimiya, T., Wakao, M., Hirano, K., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Suda, Y. & Nishihara, S. The 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters, PAPST1 and 2, contribute to the maintenance and differentiation of mouse embryonic stem cells. *PLoS One.* 4, e8262 (2009).
15. Ohkawara, B., Iemura, S., ten Dijke, P. & Ueno, N. Action range of BMP is defined by its N-terminal basic amino acid core. *Curr Biol.* 12, 205–209 (2002).
16. Zhang, F., McLellan, J.S., Ayala, A.M., Leahy, D.J. & Linhardt, R.J. Kinetic and structural studies on interactions between heparin or heparan sulfate and proteins of the hedgehog signaling pathway. *Biochemistry.* 46, 3933–3941 (2007).
17. Schneider, M.R. & Wolf, E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol.* 218, 460–466 (2009).
18. Esko, J.D. & Selleck, S.B. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem.* 71, 435–471 (2002).
19. Kusche-Gullberg, M. & Kjellén, L. Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol.* 13, 605–611 (2003).
20. Soares da Costa, D., Reis, R.L. & Pashkuleva, I. Sulfation of Glycosaminoglycans and Its Implications in Human Health and Disorders. *Annu Rev Biomed Eng.* 19, 1–26 (2017).
21. Kobayashi, F., Yamada, S., Taguwa, S., Kataoka, C., Naito, S., Hama, Y., Tani, H., Matsuura, Y. & Sugahara, K. Specific interaction of the envelope glycoproteins E1 and E2 with liver heparan sulfate involved in the tissue tropism infection by hepatitis C virus. *Glycoconj J.* 29, 211–220 (2012).

22. Li, G., Yang, B., Li, L., Zhang, F., Xue, C. & Linhardt, R.J. Analysis of 3-*O*-sulfo group-containing heparin tetrasaccharides in heparin by liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal Biochem.* 455, 3–9 (2014).
23. Xiao, Z., Tappen, B.R., Ly, M., Zhao, W., Canova, L.P., Guan, H. & Linhardt, R.J. Heparin mapping using heparin lyases and the generation of a novel low molecular weight heparin. *J Med Chem.* 54, 603–610 (2011).
24. Yamada, S., Sakamoto, K., Tsuda, H., Yoshida, K., Sugahara, K., Khoo, K.H., Morris, H.R. & Dell, A. Structural studies on the tri- and tetrasaccharides isolated from porcine intestinal heparin and characterization of heparinase/heparitinases using them as substrates. *Glycobiology.* 4, 69–78 (1994).
25. Lindahl, U., Bäckström, G., Thunberg, L. & Leder, I.G. Evidence for a 3-*O*-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77, 6551–6555 (1980).
26. Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N.W., Bai, X., Esko, J.D., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Rosenberg, R.D. & Spear, P.G. A novel role for 3-*O*-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell.* 99, 13–22 (1999).
27. Gulberti, S., Mao, X., Bui, C. & Fournel-Gigleux, S. The role of heparan sulfate maturation in cancer: A focus on the 3*O*-sulfation and the enigmatic 3*O*-sulfotransferases (HS3STs). *Semin Cancer Biol.* 62, 68–85 (2020).
28. Petitou, M., Duchaussoy, P., Driguez, P.A., Héroult, J.P., Lormeau, J.C. & Herbert, J.M. New synthetic heparin mimetics able to inhibit thrombin and factor Xa. *Bioorg Med Chem Lett.* 9, 1155–60 (1999).
29. Zhang, L., Lawrence, R., Schwartz, J.J., Bai, X., Wei, G., Esko, J.D. & Rosenberg, R.D. The effect of precursor structures on the action of glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase-1 and the biosynthesis of anticoagulant heparan sulfate. *J Biol Chem.* 276, 28806–28813 (2001).
30. Murakami, K., Tamura, R., Ikehara, S., Ota, H., Ichimiya, T., Matsumoto, N., Matsubara, H., Nishihara, S., Ikehara, Y. & Yamamoto, K. Construction of mouse cochlin mutants with different glycosaminoglycan (GAG)-binding specificities and their use for immunohistochemistry. *Biochem J.* 480, 41–56 (2023).
31. Thalmann, G.N., Anezinis, P.E., Chang, S.M., Zhou, H.E., Kim, E.E., Hopwood, V.L., Pathak, S., von Eschenbach, A.C. & Chung, L.W. Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res.* 54, 2577–2581 (1994).
32. Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F. & Jones, L.W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* 17, 16–23 (1979).

33. Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H. & Paulson, D.F. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int. J. Cancer*. 21, 274–281 (1978).
34. Oki, S., Ohta, T., Shioi, G., Hatanaka, H., Ogasawara, O., Okuda, Y., Kawaji, H., Nakaki, R., Sese, J. & Meno, C. ChIP–Atlas: a data–mining suite powered by full integration of public ChIP–seq data. *EMBO Rep*. 19, e46255 (2018).
35. Jackman, D.M., Cioffredi, L.A., Jacobs, L., Sharmeen, F., Morse, L.K., Lucca, J., Plotkin, S.R., Marcoux, P.J., Rabin, M.S., Lynch, T.J., Johnson, B.E. & Kesari, S. A phase I trial of high dose gefitinib for patients with leptomeningeal metastases from non–small cell lung cancer. *Oncotarget*. 6, 4527–4536 (2015).
36. Ciardiello, F., Caputo, R., Bianco, R., Damiano, V., Pomatico, G., De Placido, S., Bianco, A.R. & Tortora, G. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD–1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor–selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res*. 6, 2053–2063 (2000).
37. RStudio Team. RStudio: integrated development for R. <http://www.rstudio.com/> (2020).
38. Mizumoto, S. & Sugahara, K. Glycosaminoglycan chain analysis and characterization (glycosylation/epimerization). *Methods Mol Biol*. 836, 99–115 (2012).
39. Kinoshita, A. & Sugahara, K. Microanalysis of glycosaminoglycan–derived oligosaccharides labeled with a fluorophore 2–aminobenzamide by high–performance liquid chromatography: application to disaccharide composition analysis and exosequencing of oligosaccharides. *Anal Biochem*. 269, 367–378 (1999).
40. Mourier, P.A.J. Specific non–reducing ends in heparins from different animal origins: building blocks analysis using reductive amination tagging by sulfanilic acid. *Molecules*. 25, 5553 (2020).
41. Yamada, S., Yoshida, K., Sugiura, M., Sugahara, K., Khoo, K.H., Morris, H.R. & Dell, A. Structural studies on the bacterial lyase–resistant tetrasaccharides derived from the antithrombin III–binding site of porcine intestinal heparin. *J Biol Chem*. 268, 4780–4787 (1993).
42. Davies, A.E., Pargett, M., Siebert, S., Gillies, T.E., Choi, Y., Tobin, S.J., Ram, A.R., Murthy, V., Juliano, C., Quon, G., Bissell, M.J. & Albeck, J.G. Systems–level properties of EGFR–RAS–ERK signaling amplify local signals to generate dynamic gene expression heterogeneity. *Cell Syst*. 11, 161–175 (2020).
43. Mikula, M., Skrzypczak, M., Goryca, K., Paczkowska, K., Ledwon, J. K., Statkiewicz, M., Kulecka, M., Grzelak, M., Dabrowska, M., Kuklinska, U., Karczmarski, J., Rumienczyk, I., Jastrzebski, K., Miaczynska, M., Ginalski, K., Bomsztyk, K. & Ostrowski, J. Genome–wide co–localization of active EGFR and

downstream ERK pathway kinases mirrors mitogen-inducible RNA polymerase 2 genomic occupancy. *Nucleic Acids Res.* 44, 10150–10164 (2016).

44. Rosenberg, E.E., Gerashchenko, G.V., Hryshchenko, N.V., Mevs, L.V., Nekrasov, K.A., Lytvynenko, R.A., Vitruk, Y.V., Gryzodub, O.P., Stakhovsky, E.A., & Kashuba, V.I. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. *Exp Oncol.* 39, 131–137 (2017).
45. Luo, Y.Z., He, P. & Qiu, M.X. FOSL1 enhances growth and metastasis of human prostate cancer cells through epithelial mesenchymal transition pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 22, 8609–8615 (2018).
46. Liu, J. & O' Leary, T. Heparan sulfate (glucosamine) 3-*O*-sulfotransferase 1–6 (HS3ST1–6). In *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes.* (ed. Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y. & Angata, T.) 1005–1014 (Springer Japan, 2014).
47. Wang, Q., Li, W., Liu, X.S., Carroll, J.S., Jänne, O.A., Keeton, E.K., Chinnaiyan, A.M., Pienta, K.J. & Brown, M. A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth. *Mol Cell.* 27, 380–392 (2007).
48. Yu, J., Yu, J., Mani, R.S., Cao, Q., Brenner, C.J., Cao, X., Wang, X., Wu, L., Li, J., Hu, M., Gong, Y., Cheng, H., Laxman, B., Vellaichamy, A., Shankar, S., Li, Y., Dhanasekaran, S.M., Morey, R., Barrette, T., Lonigro, R.J., Tomlins, S.A., Varambally, S., Qin, Z.S. & Chinnaiyan, A.M. An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell.* 17, 443–454 (2010).
49. Cai, C., He, H.H., Chen, S., Coleman, I., Wang, H., Fang, Z., Chen, S., Nelson, P.S., Liu, X.S., Brown, M. & Balk, S.P. Androgen receptor gene expression in prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor through recruitment of lysine-specific demethylase 1. *Cancer Cell.* 20, 457–471 (2011).
50. Zhao, J.C., Yu, J., Runkle, C., Wu, L., Hu, M., Wu, D., Liu, J.S., Wang, Q., Qin, Z.S. & Yu, J. Cooperation between Polycomb and androgen receptor during oncogenic transformation. *Genome Res.* 22, 322–331 (2012).
51. Pecori, F., Yokota, I., Hanamatsu, H., Miura, T., Ogura, C., Ota, H., Furukawa, J.I., Oki, S., Yamamoto, K., Yoshie, O. & Nishihara, S. A defined glycosylation regulatory network modulates total glycome dynamics during pluripotency state transition. *Sci Rep.* 11, 1276 (2021).
52. Zhao, Y., Wang, L., Ren, S., Wang, L., Blackburn, P.R., McNulty, M.S., Gao, X., Qiao, M., Vessella, R.L., Kohli, M., Zhang, J., Karnes, R.J., Tindall, D.J., Kim, Y., MacLeod, R., Ekker, S.C., Kang, T., Sun, Y. & Huang, H. Activation of P-TEFb by androgen receptor-regulated enhancer RNAs in castration-resistant prostate cancer. *Cell Rep.* 15, 599–610 (2016).

53. Zhao, J., Zhao, Y., Wang, L., Zhang, J., Karnes, R.J., Kohli, M., Wang, G. & Huang, H. Alterations of androgen receptor-regulated enhancer RNAs (eRNAs) contribute to enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*. 7, 38551–38565 (2016).
54. Kim, J., Lee, Y., Lu, X., Song, B., Fong, K.W., Cao, Q., Licht, J.D. Zhao, J.C. & Yu, J. Polycomb- and methylation-independent roles of EZH2 as a transcription activator. *Cell Rep*. 25, 2808–2820.e4 (2018).
55. Cai, C., Portnoy, D.C., Wang, H., Jiang, X., Chen, S. & Balk, S.P. Androgen receptor expression in prostate cancer cells is suppressed by activation of epidermal growth factor receptor and ErbB2. *Cancer Res*. 69, 5202–5209 (2009).
56. Höti, N., Lih, T.S., Pan, J., Zhou, Y., Yang, G., Deng, A., Chen, L., Dong, M., Yang, R.B., Tu, C.F., Haffner, M.C., Kay Li, Q. & Zhang, H. A comprehensive analysis of FUT8 overexpressing prostate cancer cells reveals the role of EGFR in castration resistance. *Cancers (Basel)*. 12, 468 (2020).
57. Hakariya, T., Shida, Y., Sakai, H., Kanetake, H. & Igawa, T. EGFR signaling pathway negatively regulates PSA expression and secretion via the PI3K–Akt pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 342, 92–100 (2006).
58. Mandel, A., Larsson, P., Sarwar, M., Semenas, J., Syed Khaja, A.S. & Persson, J.L. The interplay between AR, EGF receptor and MMP–9 signaling pathways in invasive prostate cancer. *Mol Med*. 24, 34 (2018).
59. Aviezer, D. & Yayon, A. Heparin-dependent binding and autophosphorylation of epidermal growth factor (EGF) receptor by heparin-binding EGF-like growth factor but not by EGF. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 12173–12177 (1994).
60. Higashiyama, S., Abraham, J.A. & Klagsbrun, M. Heparin-binding EGF-like growth factor stimulation of smooth muscle cell migration: dependence on interactions with cell surface heparan sulfate. *J Cell Biol*. 122, 933–940. (1993).
61. Thompson, S.A., Higashiyama, S., Wood, K., Pollitt, N.S., Damm, D., McEnroe, G., Garrick, B., Ashton, N., Lau, K. & Hancock, N. Characterization of sequences within heparin-binding EGF-like growth factor that mediate interaction with heparin. *J Biol Chem*. 269, 2541–2549. (1994).
62. Jain, P., Shanthamurthy, C.D., Leviatan Ben-Arye, S., Yehuda, S., Nandikol, S.S., Thulasiram, H.V., Padler-Karavani, V. & Kikkeri, R. Synthetic heparan sulfate ligands for vascular endothelial growth factor to modulate angiogenesis. *Chem Commun (Camb)*. 57, 3516–3519 (2021).
63. Huang, R.L., Chen, H.J., Chen, L.Y., Chao, T.K., Lin, W.Y., Liew, P.L., Su, P.H., Weng, Y.C., Wang, Y.C., Liao, C.C., Hsu, Y.W., Wang, H.C. & Lai, H. C. Epigenetic loss of heparan sulfate 3-*O*-sulfation



sensitizes ovarian carcinoma to oncogenic signals and predicts prognosis. *Int J Cancer*. 143, 1943–1953 (2018).

64. Ferguson, B.W. & Datta, S. Role of heparan sulfate 2-*O*-sulfotransferase in prostate cancer cell proliferation, invasion, and growth factor signaling. *Prostate Cancer*. 2011, 893208. (2011).
65. Vicente, C.M., Lima, M.A., Nader, H.B. & Toma, L. SULF2 overexpression positively regulates tumorigenicity of human prostate cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 34, 25 (2015).
66. de Moraes, G.F.A., Listik, E., Justo, G.Z., Vicente, C.M., and Toma, L. The glypican proteoglycans show intrinsic interactions with Wnt-3a in human prostate cancer cells that are not always associated with cascade activation. *BMC Mol Cell Biol*. 22, 26 (2021).
67. Savorè, C., Zhang, C., Muir, C., Liu, R., Wyrwa, J., Shu, J., Zhau, H.E., Chung, L.W., Carson, D.D. & Farach-Carson, M.C. Perlecan knockdown in metastatic prostate cancer cells reduces heparin-binding growth factor responses in vitro and tumor growth in vivo. *Clin Exp Metastasis*. 22, 377–390 (2005).
68. Shimada, K., Nakamura, M., De Velasco, M.A., Tanaka, M., Ouji, Y. & Konishi, N. Syndecan-1, a new target molecule involved in progression of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Sci*. 100, 1248–1254 (2009).
69. Brimo, F., Vollmer, R.T., Friszt, M., Corcos, J. & Bismar, T.A. Syndecan-1 expression in prostate cancer and its value as biomarker for disease progression. *BJU Int*. 106, 418–423 (2010).
70. Szarvas, T., Sevcenco, S., Módos, O., Keresztes, D., Nyirády, P., Kubik, A., Romics, M., Kovalszky, I., Reis, H., Hadaschik, B., Shariat, S.F. & Kramer, G. Circulating syndecan-1 is associated with chemotherapy-resistance in castration-resistant prostate cancer. *Urol Oncol*. 36, 312.e9–312.e15 (2018).
71. Naito, S., Tsukamoto, T., Koga, H., Harabayashi, T., Sumiyoshi, Y., Hoshi, S. & Akaza, H. Docetaxel plus prednisolone for the treatment of metastatic hormone-refractory prostate cancer: a multicenter Phase II trial in Japan. *Jpn J Clin Oncol*. 38, 365–372 (2008).
72. Nozawa, M., Mukai, H., Takahashi, S., Uemura, H., Kosaka, T., Onozawa, Y., Miyazaki, J., Suzuki, K., Okihara, K., Arai, Y., Kamba, T., Kato, M., Nakai, Y., Furuse, H., Kume, H., Ide, H., Kitamura, H., Yokomizo, A., Kimura, T., Tomita, Y., Ohno, K. & Kakehi, Y. Japanese phase I study of cabazitaxel in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Int J Clin Oncol*. 20, 1026–1034. (2015).
73. Abud, H.E., Chan, W.H. & Jardé, T. Source and impact of the EGF family of ligands on intestinal stem cells. *Front. Cell Dev. Biol*. 9, 685665 (2021).

74. Bishop, J.L., Thaper, D. & Zoubeidi, A. The multifaceted roles of STAT3 signaling in the progression of prostate cancer. *Cancers (Basel)*. 6, 829–859 (2014).
75. Sasaki, N., Shinomi, M., Hirano, K., Ui-Tei, K. & Nishihara, S. LacdiNAc (GalNAc  $\beta$  1–4GlcNAc) contributes to self-renewal of mouse embryonic stem cells by regulating leukemia inhibitory factor/STAT3 signaling. *Stem Cells*. 29, 641–650 (2011).