

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

Mechanism of castration-resistant acquisition
via 3-O-sulfated heparan sulfate in prostate cancer

18D5601 太田隼人 指導教員 西原祥子

SYNOPSIS

Androgen deprivation therapy is commonly administered to suppress the growth of prostate cancer. However, despite this treatment, certain cells continue growing independently of hormones, leading to the development of castration-resistant prostate cancer (CRPC). Prostate cancer proliferates through androgen receptor (AR) signaling. However, in the case of CRPC, signaling pathways other than AR signaling are involved in the proliferation. Sulfated glycosaminoglycans function as co-receptors to promote ligand binding to receptors in signaling pathway, but their specific role in CRPC has remained unclear. In this study, we used the human prostate cancer cell line C4-2, which can proliferate under both hormone-dependent and hormone-independent conditions, as CRPC model. We have found that when hormones were depleted, epidermal growth factor (EGF) triggers the activation of EGFR-ERK1/2 signaling through 3-O-sulfated heparan sulfate (3-OS HS) in C4-2 cells. By suppressing the expression of *HS3ST1* in C4-2 cells, we were able to inhibit the activation of EGFR-ERK1/2 signaling and hormone-independent growth. Furthermore, treatment with gefitinib, an EGFR inhibitor, significantly suppressed the growth of xenografted C4-2 tumors in castrated mice. In summary, our study has revealed a mechanism of castration-resistant acquisition via 3-OS HS in prostate cancer. These findings contribute to our understanding of CRPC and pave the way for potential therapeutic approaches targeting this mechanism.

Keywords: heparan sulfate, castration-resistant prostate cancer, HS3ST1, EGFR signaling, molecularly targeted drug

1. 序論

前立腺がんは男性の間で非常に罹患率の高いがんである(1)。前立腺がんは、アンドロゲンがアンドロゲン受容体(AR)に結合し、ホルモン依存的にシグナル伝達が行われることで増殖する(2)。そのため、去勢などのアンドロゲン除去療法(ADT)が治療として行われる。しかしながら、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 に耐性を持った前立腺がんは去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)と呼ばれ、現在のところ CRPC に対する効果的な治療法は確立されていない。CRPC におけるホルモン非依存的な増殖は、特に Epidermal Growth Factor 受容体(EGFR)シグナルの活性化が原因であることが報告されている(3, 4)。しかし、CRPC における EGFR シグナル増強の詳細なメカニズムは、ほとんど明らかになっていない。

細胞内シグナル伝達は、細胞膜上の受容体とリガンド分子が結合することによって引き起こされる。リガンド分子が受容体に結合するために、共受容体が必要な場合が多い。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、シグナル伝達に関わるリガンド分子の共受容体として重要な役割を担う。GAG の中でもヘパラン硫酸(HS)は、Fibroblast Growth Factor (FGF)、Wnt、Bone Morphogenic Protein (BMP4)、および Hedgehog などの共受容体として、様々な細胞でシグナル伝達を調節することが報告されている(5-8)。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。そして、様々な硫酸基転移酵素が二糖繰り返し構造に段階的に硫酸基を転移する(9)。初めに、*N*-deacetylase/*N*-sulfotransferases (NDSTs)による GlcNAc の *N*-硫酸化が行われる。次に、一部の GlcA 基は GlcA C5-epimerase (GLCE)によってイズロン酸(DoA)に異性化される。Heparan Sulfate 2-*O*-sulfotransferase (HS2ST)は、GlcA および DoA 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(10)。

本研究は、前立腺がん細胞が去勢抵抗性を獲得する機構、すなわち、ホルモン依存的増殖から CRPC のホルモン非依存的増殖に切り替わる分子メカニズムの解明を目的とした。ホルモン存在下およびホルモン非存在下の両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 を用いて実験を行い、CRPC において、HS3ST1 が合成する 3-*O*-硫酸化 HS (3-OS HS)が EGFR-ERK1/2 シグナルの活性化に必要であるという新たな去勢抵抗性獲得機構を明らかにした。

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%

Fetal Bovine Serum (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% Charcoal Stripped Serum (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、Stealth siRNA オリゴ(siRNA-1; HSS115087, Invitrogen) と 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。ネガティブコントロール siRNA を細胞に導入し、それぞれの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)を使用した。RNA-seq 解析では、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。

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% CO₂ 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で一次抗体反応後、室温で二次抗体反応を行った。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。

フローサイトメトリー

2×10⁵ 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。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。

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。一次抗体を 4°Cで一晩反応後、二次抗体を室温で 60 分間反応させた。LSM 700 共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss)を使用して観察した。

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 (2×10⁷ 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、0 mg/kg、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。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×W²)/2 の式で計算した。摘出した腫瘍を 10% 緩衝ホルマリンで固定し、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 heparitinase-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-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)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(12, 13)。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(13, 14)。

3. 結果

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

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 の親細胞である LNCap 細胞と、C4-2 細胞を FBS 含有培地および CSS 含有培地で培養した。その結果、ホルモンが除去された CSS 含有培地では、LNCap 細胞は死滅したが、C4-2 細胞は増殖することができた。CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞は、AR を発現しているが、AR シグナルの標的遺伝子である PSA の mRNA 発現量が減少していた。この結果は、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 含有培地において、C4-2 細胞が AR 非依存的なシグナル経路を介して増殖しているかを明らかにするために、FBS および CSS 含有培地で培養した

C4-2細胞において様々なシグナルの活性を比較した。EGF と heparin binding EGF (HB-EGF)で細胞を刺激したとき、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞において、リン酸化 ERK1/2 の発現量が顕著に増加した。また、RNA-seq 解析から *FOS* や *FOSL1* などの ERK 標的遺伝子も CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞で増加することがわかった。これらの事実から、ホルモン非存在下の C4-2 細胞において、EGF と HB-EGF をリガンドとして、EGFR-ERK1/2 シグナルが活性化することが明らかになった。

ホルモン非存在下で C4-2 細胞では HS3ST1 が合成する 3-OS HS 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。シグナル伝達においてリガンドの共受容体として機能する HS に着目した。RNA-seq、リアルタイム PCR、免疫染色の結果から、HS の GlcNS の 3 位に硫酸基を転移する HS3ST1 の発現が、ホルモン非存在下で、転写レベルおよびタンパク質レベルで劇的に上昇することがわかった。

さらに、HS3ST1 が合成する 3-OS HS を認識する Antithrombin III を用いたフローサイトメトリー解析を行い、細胞表面 3-OS HS の発現量が、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞で有意に増加することを示した。3-OS HS を含む硫酸化 GAG を認識するレクチンである Cochlin ($\Delta vWA2$) (15)も用いたところ、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞へのレクチンの結合が増した。さらに、陰イオン交換 HPLC 解析によって、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞において、3-OS HS を含む構造が増加していることが明らかになった。これらの結果から、ホルモン非存在下の C4-2 細胞において、HS3ST1 とその合成物である 3-OS HS の発現量が増加することが分かった。

また、HS3ST1 は C4-2 細胞だけでなく、ヒトの肺における転移性 CRPC でも発現していた (千葉大学との共同研究)。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。

HS3ST1 が合成する 3-OS HS は、ホルモン非存在下における C4-2 細胞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 の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。*HS3ST1* KD C4-2 細胞では、*HS3ST1* の発現抑制と共に、細胞表面の 3-OS HS の発現が減少した。この時、KD 細胞の増殖速度は、コントロール細胞と比較して有意に低下した。これらの結果から、HS3ST1 が合成する 3-OS HS は C4-2 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

CSS 含有培地で培養した *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。EGF および HB-EGF で *HS3ST1* KD 細胞を刺激すると、リン酸化 ERK1/2 の発現が有意に減少した。この

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。さらに、フローサイトメトリーと共焦点レーザー顕微鏡による解析を行い、*HS3ST1* KD 細胞の細胞表面への EGF と HB-EGF の結合が減少したことを明らかにした。これらの結果から、ホルモン非依存的な増殖において、3-OS HS が EGF と HB-EGF の共受容体として EGFR-ERK1/2 シグナルを活性化することが分かった。

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。PC3 細胞は C4-2 とは異なり、AR を発現しない CRPC 細胞株である。CSS 含有培地で培養した PC3 においても *HS3ST1* の KD を行い、EGF と HB-EGF で刺激をした。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。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。

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 は非小胞性肺がんの治療でよく使用される抗がん剤である。FBS および CSS 含有培地に gefitinib (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ 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。FBS 含有培地における C4-2 細胞に対する gefitinib の IC_{50} は 3.67 μ M であったが、CSS 含有培地における IC_{50} は 0.33 μ M であった。

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。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。その結果、CSS 含有培地で培養した C4-2 細胞を使用した場合と、去勢したヌードマウスを使用した場合に gefitinib の効果がより大きく、腫瘍の成長を効果的に抑制することが明らかになった。これらの事実から、ホルモンを除去した条件下の腫瘍への gefitinib の効果が大きく、CRPC のホルモン非依存的な増殖は EGFR シグナルに依存していることが証明された。

4. 考察・結論

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 (図 1)。HS に強く結合することが知られている HB-EGF に加えて、EGF も 3-OS HS を介して EGFR シグナルを活性化することは、特に重要である。HB-EGF とは異なり、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(16, 17)。しかし、本研究では新たに、3-OS HS を介して EGF が EGFR シグナルを活性化することを示した。

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、ホルモン依存的および非依存的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(18-20)。一方で、ホルモン非依存的増殖をする 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(21)。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、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。

AR は、標的遺伝子の転写を活性化するだけでなく、Polycomb repressive complex 2 (PRC2) の構成分子 EZH2 などの特定の分子と相互作用することで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(22-25)。当研究室の最近の研究では、マウス ES 細胞において PRC2 によって複数の糖鎖転移酵素の発現が制御されていることを明らかにしており、前立腺がん細胞においても HS 合成に関与する糖鎖転移酵素と硫酸基転移酵素が特定の分子によって制御されているかどうかを ChiP-Atlas のデータを用いて検討した(26,27)。その結果、AR と EZH2 がホルモン存在下で HS3ST1 のゲノム領域に結合し、HS3ST1 の発現を抑制していることが示唆された。CRPC における 3-OS HS を介した EGFR シグナルへの切り替わりは、AR の転写抑制因子としての機能が HS3ST1 の発現を制御していることが鍵になっていると考えられた。

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(28,29)。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薬である gefitinib が CRPC の治療に効果的であることを示した。前立腺がんに対するホルモン除去療法とともに 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が予防されることが期待される。

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。さらに、シグナルの切り替えの重要な因子として HS3ST1 によって合成される 3-OS HS を同定した。これらの知見は、今後の CRPC の治療法の確立に貢献すると考える。

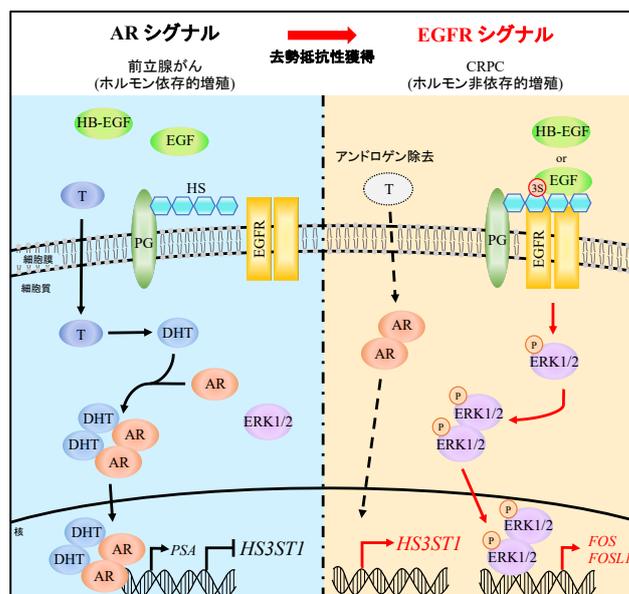


図 1. 3-OS HS を介した去勢抵抗性獲得機構

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

5. 参考文献

- (1) Siegel, R.L. *et al.* (2019) *CA Cancer J Clin.* 69, 7-34.
- (2) Lu, S. *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57, 4511-4516.
- (3) Pignon, J.C. *et al.* (2009) *Cancer Res.* 69, 2941-2949.
- (4) Imada, K. *et al.* (2013) *Clin Cancer Res.* 19, 4638-4650.
- (5) Sasaki, N. *et al.* (2008) *J Biol Chem.* 283, 3594-3606.
- (6) Sasaki, N. *et al.* (2009) *PLoS One.* 4, e8262.
- (7) Ohkawara, B. *et al.* (2002) *Curr Biol.* 12, 205-209.
- (8) Zhang, F. *et al.* (2007) *Biochemistry.* 46, 3933-3941.
- (9) Kusche-Gullberg, M. *et al.* (2003) *Curr Opin Struct Biol.* 13, 605-611.
- (10) Soares da Costa, D. *et al.* (2017) *Annu Rev Biomed Eng.* 19, 1-26.
- (11) Akita, S. *et al.* (2020) *Lymphat Res Biol.* 18, 455-463.
- (12) Mizumoto, S. *et al.* (2012) *Methods Mol Biol.* 836, 99-115.
- (13) Kinoshita, A. *et al.* (1999) *Anal Biochem.* 269, 367-378.
- (14) Mourier, P.A.J. (2020) *Molecules.* 25, 5553.
- (15) Murakami, K. *et al.* (2023) *Biochem J.* 480, 41-56.
- (16) Aviezer, D. *et al.* (1994) *Proc Natl Acad Sci USA.* 91, 12173-12177.
- (17) Higashiyama, S. *et al.* (1993) *J Cell Biol.* 122, 933-940.
- (18) Cai, C. *et al.* (2009) *Cancer Res.* 69, 5202-5209.
- (19) Höti, N. *et al.* (2020) *Cancers (Basel).* 12, 468.
- (20) Hakariya, T. *et al.* (2006) *Biochem Biophys Res Commun.* 342, 92-100.
- (21) Mandel, A. *et al.* (2018) *Mol Med.* 24, 34.
- (22) Wang, Q. *et al.* (2007) *Mol Cell.* 27, 380-392.
- (23) Yu, J. *et al.* (2010) *Cancer Cell.* 17, 443-454.
- (24) Cai, C. *et al.* (2011) *Cancer Cell.* 20, 457-471.
- (25) Zhao, J.C. *et al.* (2012) *Genome Res.* 22, 322-331.
- (26) Pecori, F. *et al.* (2021) *Sci Rep.* 11, 1276.
- (27) Oki, S. *et al.* (2018) *EMBO Rep.* 19, e46255.
- (28) Naito, S. *et al.* (2008) *Jpn J Clin Oncol.* 38, 365-372.
- (29) Nozawa, M. *et al.* (2015) *Int J Clin Oncol.* 20, 1026-1034.