

学位論文（博士）

Novel bone microenvironment model of  
castration-resistant prostate cancer with  
chitosan fiber matrix and osteoblasts

(キトサンナノ繊維細胞培養基材を用いた、新規の  
去勢抵抗性前立腺癌骨微小環境モデルの作成)

氏名 佐本 征弘

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 泌尿器科学講座

令和3年10月

## 目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	3～4
3. 目的	4
4. 方法	4～7
(1) 対象	4
(2) 方法	4～6
(3) 解析	6～7
5. 結果	7～9
6. 考察	9～10
7. 結語	10
8. 謝辞	10
9. 参考文献	10～14

## 1. 要旨

前立腺癌細胞と骨芽細胞の相互作用は、前立腺癌骨転移の発生に不可欠である。近年、新規のアンドロゲン受容体標的薬 (ARAT) が、転移性去勢未治療前立腺癌 (mCNPC) や非転移性去勢抵抗性前立腺癌 (nmCRPC) に対して承認されているが、これらの薬剤と骨微小環境や腫瘍との関係を調べることは極めて重要である。今回、我々は去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) の骨微小環境を模倣した新規の *in vitro* 3次元微小環境モデルを確立し、アンドロゲン受容体標的薬の薬剤感受性と、アビラテロンとデュタステリドの併用療法の有効性を評価した。キトサンナノ繊維で表面をコートした細胞培養基材を用いて、GFPを導入したC4-2細胞 (CRPC細胞株) とRFPを導入したヒト骨髄由来間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞を共培養し、去勢抵抗性前立腺癌の骨微小環境を模倣した。骨芽細胞とC4-2細胞の増殖はCell3 iMager duos (SCREEN) を用いて生細胞のまま解析し、骨芽細胞を維持したまま、最大30日間C4-2細胞の持続的な増殖を観察できた。また、骨芽細胞と共培養したC4-2細胞では、TGF- $\beta$ の発現が増加し、上皮間葉転換 (EMT) が促進されたことから、アンドロゲン受容体標的薬に対する抵抗性が示された。このモデルを用いて、各薬剤のIC50と、アビラテロンとデュタステリドの併用効果を評価した。アビラテロンとデュタステリドの併用療法は、それぞれの単剤投与と比較して、C4-2細胞の増殖を相乗的に抑制し、これは、ARアゴニストである3-keto-5 $\alpha$ -abirateroneの減少によるものと考えられた。我々の新規骨微小環境モデルは、前立腺癌の薬剤感受性の評価に有用であり、今後このモデルは、前立腺癌の微小な骨転移から臨床的な骨転移に至るまでの未知のメカニズムの解析に役立つ可能性がある。

## 2. 研究の背景

先進国では前立腺癌患者が増加の一途をたどっており、発展途上国での平均寿命が延びるにつれ、前立腺癌は世界的にさらに大きな健康問題として浮上してくることが予想される(1)。前立腺癌は、無症状で緩徐に進展することが多く、転移のない限局性前立腺癌であれば比較的予後良好(2)で、放射線療法または根治的前立腺摘除術によって治癒の可能性がある。しかし、根治的前立腺摘除術を受けた患者の13%において、骨髄吸引液から播種性の腫瘍細胞 (サイトケラチン陽性細胞) が検出されたという報告もあり(3)、がんの初期段階ですでに潜在的な骨転移が生じていることが示唆されている。限局性前立腺癌とは対照的に、転移性前立腺癌の男性は生存率が低く、5年生存率は約30%、生存期間の中央値は約3年とされる(4,5)。局所進行性または転移性前立腺癌の段階では、アンドロゲン除去療法 (ADT) が治療の柱となるが、ほとんどの患者はADTに対して抵抗性を示し、18~36ヵ月後には去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) へと進行する(6,7)。転移臓器の中では骨が最も頻度が多く、進行した前立腺癌患者の90%以上が、亡くなる24ヵ月より以前に骨転移を起こす(8)。骨転移は疼痛を生じ、患者のQOLを悪化させることにつながる。骨転移の発生メカニズムを理解した上での骨転移管理が重要であり、これまでも骨の微小環境を模倣した *in vitro* モデルがいくつか報告されている(9,10)。

近年、新規のアンドロゲン受容体標的薬 (ARAT) が、転移性去勢未治療前立腺癌 (mCNPC) や非転移性去勢抵抗性前立腺癌 (nmCRPC) に対して承認されている。なかでもアビラテロン (CYP17A1 lyase/hydrolase 阻害剤) は副腎や腫瘍内でのアンドロゲン合成を阻害し、CRPC患者の生存期間を延長する(11)。アビラテロンは、3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 (3 $\beta$ HSD1)によってDelta-4アビラテロン(D4A)に

代謝され、アビラテロンとその代謝物の中で最も大きな抗腫瘍活性を発揮する。しかし、D4A は  $5\alpha$ -reductase によって 3-keto- $5\alpha$  アビラテロンに代謝され、この 3-keto- $5\alpha$  アビラテロンはアンドロゲン活性を持ち、前立腺癌の進行を促進する。 $3\beta$ HSD1 や  $5\alpha$ -reductase の活性には患者によって個人差がある。近年、CRPC 治療薬として、アビラテロンとデュタステリド ( $5\alpha$ -reductase 阻害薬) の併用療法が注目されている (12)。デュタステリドは前立腺肥大症の治療薬として承認されており、 $5\alpha$ -reductase (1 型と 2 型) の二重阻害により前立腺体積を減少させるが、REDUCE 試験では前立腺癌発生のリスク低減効果が報告されている (13)。アビラテロンとデュタステリドの併用療法は、血清中の D4A 濃度を上昇させ、3-keto- $5\alpha$  アビラテロンの濃度を低下させる (12)。しかし、D4A を含むこれらの薬剤の骨微小環境への影響は不明であり、これを解明することは、骨微小環境と腫瘍との関連を調べる上で極めて重要である。以上のことから、我々は、骨微小環境を正確に反映する新しい *in vitro* 薬剤感受性試験モデルを確立した。

### 3. 目的

本研究では、CRPC の骨微小環境を模倣した新規の *in vitro* 3次元微小環境モデルを構築し、TGF- $\beta$ をはじめとするこれまでに報告のある因子を再現しているかどうか検討した。さらに、このモデルを用いて、骨微小環境における ARAT の薬剤感受性およびアビラテロンとデュタステリドの併用療法の有効性を評価した。

### 4. 方法

#### (1) 対象

ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP C4-2 細胞は American Type Culture Collection から購入した。ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs) は PromoCell から購入した。C4-2 細胞は、10% ウシ胎児血清 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を添加した RPMI-1640 培地 (Life Technologies) で培養。hMSCs は Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 (PromoCell) で培養し、加湿インキュベーター (5%CO<sub>2</sub>) で維持した。いずれの培地にも 100 U / ml ペニシリン、および 100  $\mu$ g / ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) を添加した。細胞の増殖を非侵襲的に定量化するために、蛍光タンパク質 (GFP および RFP) を細胞内に導入した。レンチウイルスを用いて C4-2 細胞には GFP 遺伝子を、hMSCs には RFP 遺伝子を導入した。また、hMSCs を骨芽細胞に分化させる際に、Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation medium (PromoCell) を使用した。培地は 3~4 日ごとに交換し、2 週間培養した。骨芽細胞への分化は 10%ホルマリン液で固定し、1%アリザリンレッド S (Sigma-Aldrich) で染色して細胞外カルシウムの沈着を確認し、BCIP/NBT (Sigma-Aldrich) で染色してアルカリホスファターゼ活性を確認した。

#### (2) 方法

### 去勢抵抗性前立腺癌 骨微小環境モデルの作製

RFP を導入した hMSCs をキトサンナノ繊維で表面をコートした細胞培養基材 (北海道曹達株式会社) に撒いた後 ( $5\times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>)、Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 で培養した。細胞が 100% confluency になった時点で、培地を Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation medium に変更し (Day0)、その後 14 日間培

養して骨芽細胞に分化させた。Day14に GFP を導入した C4-2 細胞 ( $1.5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>) を加え、骨芽細胞と共培養を開始した。Day15 に培地をアンドロゲン除去培地に変更した。アンドロゲン培地は、フェノールレッドフリーの RPMI-1640 培地 (Life Technologies) に、5%チャコール/デキストラン処理牛胎児血清 (HyClone) を添加したものを使用した。いずれの培地にも 100 U / ml ペニシリン、および 100  $\mu$ g / ml ストレプトマイシンを添加し、培地の交換は 3~4 日ごとに行った。微小環境モデルにおける C4-2 細胞および骨芽細胞の増殖は Cell3 iMager duos (SCREEN Holdings Co., Ltd.) を用いて 3 日ごとに定量化した。

### 骨微小環境モデルを用いた薬剤感受性試験

薬剤感受性試験では、4 種類の ARAT (エンザルタミド、アパルタミド、ダロルタミド、アビラテロン)、D4A (AR アンタゴニスト作用を持つアビラテロン代謝物)、デュタステリド (5 $\alpha$ -reductase 阻害薬) を使用し、すべての薬剤は Selleckchem から購入した。経時的な薬剤感受性試験では、Day15 からエタノールに溶解した各薬剤を 5  $\mu$ M の濃度で培地に添加し、薬剤は培地を交換するたびに添加した。用量反応曲線では、Day15 にエタノールに溶解した各濃度の薬剤を培地に添加した。薬剤曝露時間は 48 時間とし、抗増殖効果は各薬物の 0.01  $\mu$ M の結果と比較して判定した。アビラテロンとデュタステリドの併用治療の判定で用いた Combination index (CI) は CompuSyn software を用いて算出した (CI=1; 相加効果, CI<1; 相乗効果, CI>1; 拮抗効果) (14)。

### Total RNA の抽出と mRNA 発現解析

Total RNA は、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて、メーカーのプロトコールに従って抽出した。RNA の質と量は、NanoDrop Lite spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc) を用いて測定した。RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen) を用いて total RNA から First-strand cDNA を合成した。EMT 関連遺伝子の発現は RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) (Qiagen) を用いて解析し、骨形成関連遺伝子は RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Osteogenesis (Qiagen) を用いて解析した。AR と PSA の発現は TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems Inc) を用いて解析した。本研究で使用した TaqMan MGB probe は以下の通りである。AR (Hs00171172\_m1)、PSA (Hs02576345\_m1、GAPDH (Hs02758991\_g1)。定量的リアルタイム PCR は、プロトコールに従い Applied Biosystems StepOnePlus (Applied Biosystems) を用いて行った。RNA の発現解析は、StepOnePlus ソフトウェア (バージョン 2.2.2; Applied Biosystems) を用いて解析し、GAPDH の発現レベルで正規化した。RNA の発現量は、 $2^{-\Delta\Delta CT}$  法 (15) を用いて測定した。

### ウェスタンブロット解析

細胞サンプルを RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology Inc.) に回収し、BCA Protein Assay Kit (Takara Bio Inc.) を用いてタンパク質濃度を測定した。各サンプル (20  $\mu$ g) を SDS-PAGE で電気泳動・分離し、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写した。0.05% Tween-20 を含む TBS 液 (TBST) に 5% 脱脂乳を加え、ブロッキングした後、膜を各一次抗体と 4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。使用した一次抗体は以下の通りである。N-カドヘリン (1/500 希釈)、E-カドヘリン (1/1,000 希釈)、Snail

(1/1,000 希釈)、TGF- $\beta$  (1/1,000 希釈)、GAPDH (1/2,000 希釈) は Cell Signaling Technology のものを使用した。AR (1/1,000 希釈) は Abcam から購入した。TBST で洗浄した後、膜を HRP-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1/5,000 希釈; Abcam) と室温で 1 時間インキュベート。さらに TBST で洗浄後、ECL detection system (Amersham Imager 600; GE Healthcare Life Sciences) を用いて測定した。

### **Magnetic-activated cell sorting (MACS)**

共培養した細胞サンプルから、MACS® (Miltenyi Biotec) を用いて、ポジティブセレクションにより高純度の C4-2 細胞を分離した。共培養細胞 ( $1 \times 10^7$  cells) を遠心分離 ( $200 \times g$  4 分) した後、 $100 \mu\text{l}$  の MACS buffer (2mM EDTA と 0.5%FBS を含む PBS) に再懸濁した。Biotin anti-human PSMA (FOLH1) antibody ( $10 \mu\text{l}$ ; BioLegend) を加え、 $4^\circ\text{C}$  で 5 分間インキュベートした後、細胞を 2ml の MACS buffer で洗浄し、再び  $200 \times g$  で 4 分間遠心分離した。細胞ペレットを  $200 \mu\text{l}$  の MACS buffer と  $20 \mu\text{l}$  の anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec) に再懸濁した。 $4^\circ\text{C}$  で 15 分間インキュベートした後、2ml の MACS 緩衝液で洗浄し、 $200 \times g$  で 4 分間遠心分離した。細胞ペレットを  $500 \mu\text{l}$  の MACS buffer に再懸濁し、磁場中の LS MACS カラム (Miltenyi Biotec) に滴下した。通過した細胞を回収し、カラムを  $500 \mu\text{l}$  の MACS buffer で 3 回洗浄した。カラムを磁気スタンドから外し、PSMA 陽性細胞を 5ml の MACS buffer で溶出した。この PSMA 陽性細胞と通過した細胞をフローサイトメトリーで分析した。

### **Flow cytometry analysis**

allophycocyanin (APC)-conjugated anti-human PSMA (FOLH1) antibody (BioLegend) を使用した。フローサイトメトリーデータは、CytoFLEX (Beckman Coulter) によって取得し、FlowJo ソフトウェア (FlowJo, LLC) を用いて解析した。

### **Liquid chromatography-electrospray ionization-time-of-flight/mass spectrometry analysis**

C4-2 細胞と骨芽細胞を 24 時間共培養し、15 日目にエタノールに溶解したアビラテロン単剤またはアビラテロンとデュタステリドを併用して、 $5 \mu\text{M}$  の濃度で培地に溶解した。17 日目と 28 日目 (薬剤添加後 2 日目と 13 日目) に細胞懸濁液を回収し、抗 PSMA 抗体を用いた MACS® により C4-2 細胞を分離した。C4-2 細胞 ( $1 \times 10^5$  個) を  $200 \times g$  で 5 分間遠心分離して PBS で洗浄した。その後、同じ条件で 2 回洗浄した。細胞ペレットを  $50 \mu\text{l}$  の 70%アセトニトリルで溶解した後、 $17,4000 \times g$  で 5 分間、 $4^\circ\text{C}$  で遠心分離した。得られた上清を回収し、80%メタノールで 1/20 に希釈した後、液体クロマトグラフィー (LC) -エレクトロスプレーイオン化 (ESI) -飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) で分析した。LC システムには、Nexera SFC/SFE-HPLC システム (島津製作所) を使用し、ESI-TOF/MS システムは Impact II (Bruker Daltonics) を使用した。上澄み液中のアビラテロンおよびアビラテロン代謝物 (D4A、3-keto-5 $\alpha$ -abiraterone、3 $\alpha$ -OH-5 $\alpha$ -abiraterone、3 $\beta$ -OH-5 $\alpha$ -abiraterone) の濃度は、各化合物のプロトン化した分子イオンの質量値を用いて測定した。

### (3) 解析

すべてのデータは平均値±標準偏差で示した。Student's t-test (2群) または ANOVA (2群以上) を用いて比較し、ANOVA 後の post-hoc test として Tukey test を用いた。薬剤の組み合わせによる効果判定は、CompuSyn (Combosyn Inc) を用いて算出した。統計解析は JMP (Pro. 13 ; SAS Institute, Inc.) を用いて行った。P 値は両面評価とし、統計的有意性はすべての検定において  $P < 0.05$  とした。

## 5. 結果

### キトサンナノ繊維細胞培養基材を用いた、去勢抵抗性前立腺癌骨微小環境モデル

前立腺癌の骨微小環境モデルを作成するために、前立腺癌細胞と骨芽細胞をキトサンナノ繊維細胞培養基材上で共培養し、その特性を調べた。使用した培養基材では、平均直径が 200 nm のキトサン繊維が 3 次元構造を持って網目状に基材の底面に固定されており、細胞は 3 次元の形態を持って増殖することができる。去勢抵抗性前立腺癌の骨転移微小環境を再現するために、去勢抵抗性前立腺癌の細胞株である C4-2 細胞を用いた。C4-2 細胞は、de novo 変異による腫瘍内ステロイド生成により、AR の活性化とシグナル伝達を維持している (17, 18)。骨芽細胞は、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) から特殊な培地を用いて分化させた。hMSC が骨芽細胞に分化したことは、アリザリンレッド S 染色とアルカリホスファターゼ染色で確認した (Fig. S1)。共培養後の C4-2 細胞と骨芽細胞を別々に定量するために、C4-2 細胞には GFP を、hMSC には RFP を、レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入した。GFP が C4-2 細胞に導入されたか、RFP が hMSC に導入されたかは、フローサイトメトリーで評価した (Fig. S2)。Fig1-A が骨微小環境モデルの模式図である。GFP を導入した C4-2 細胞と RFP を導入した hMSC から分化した骨芽細胞をキトサンナノ繊維細胞培養基材で共培養した。共培養を開始してから 24 時間後にアンドロゲンフリーの培地に変更し、去勢抵抗性前立腺癌の骨転移環境を反映させた。C4-2 細胞と骨芽細胞の増殖は、Cell13 iMager duos (SCREEN) を用いて生細胞のまま定量化し、骨芽細胞を維持したまま最大 30 日間 C4-2 細胞の持続的な増殖を観察できた (Fig1-B)。15 日目、32 日目、46 日目の蛍光画像では、C4-2 細胞がコロニーを形成しながら増殖している様子を観測し、骨芽細胞と物理的に接触していた (Fig1-C)。骨芽細胞との共培養の効果についても検討すると、単培養と比較して骨芽細胞との共培養では、C4-2 細胞の成長が有意に促進されたが (t-test,  $P < 0.01$ , 52 日目)、C4-2 細胞の形態に明らかな違いは見られなかった (Fig. S3)。

### 骨微小環境モデルを用いた薬剤感受性試験

このモデルを用いて、アンドロゲン受容体標的薬 (ARAT) と D4A (AR アンタゴニスト作用を持つアビラテロン代謝物) の薬剤感受性を評価した。まず C4-2 細胞の成長曲線を比較した (Fig2-A)。18 日目から 25 日目まで成長阻害に有意差が認められ (ANOVA,  $P < 0.01$ )、28 日目の評価でエンザルタミド (t-test,  $P < 0.01$ )、アパルタミド ( $P < 0.01$ )、ダロルタミド ( $P < 0.01$ )、アビラテロン ( $P < 0.01$ )、D4A ( $P < 0.01$ ) を添加した群でコントロール群と比較して有意な成長阻害が認められた。また、エンザルタミドとアパルタミドの間 ( $P = 0.195$ )、ダロルタミドとアビラテロンの間 ( $P = 0.118$ ) を除き、すべての薬剤間で増殖抑制効果に有意差が認められた。次に、C4-2 細胞に対する各薬剤の用量反応曲線を比較した (Fig2-B)。10~100  $\mu\text{M}$  の濃度で、ARAT 間で増殖抑制効果

に有意差が認められた (ANOVA,  $P < 0.01$ )。用量反応曲線から算出した各薬剤の 50% 阻害濃度 (IC50) を Table I に示す。各薬剤の IC50 値を比較したところ、エンザルタミドとアパルタミドの間 ( $P = 0.982$ )、ダロルタミドとアビラテロンの間 ( $P = 0.106$ ) を除き、各薬剤間で有意差を認め (t-test,  $P < 0.05$ )、この結果は、先に示した成長曲線での薬剤効果と同様であった (Fig2-A)。また、C4-2 細胞単独で培養した場合と、骨芽細胞と共培養した場合、いずれの薬剤でも骨芽細胞との共培養によって薬剤の増殖抑制効果が低下した (Fig2-C)。

### 骨芽細胞との共培養による C4-2 細胞の mRNA・タンパク質の発現変化の解析

このモデルを用いて、C4-2 細胞を骨芽細胞と共培養したときに生じる mRNA およびタンパク質の発現変化を調べた。共培養した細胞懸濁液から、Magnetic cell sorting 法 (MACS®; Miltenyi Biotec) により、高純度の C4-2 細胞を分離した。これは、抗 PSMA 抗体が C4-2 細胞に特異的に結合することを利用したポジティブセレクションで行い、C4-2 細胞が特異的に分離されていることは、フローサイトメトリーで確認した (Fig. S4)。共培養した細胞懸濁液から分離した C4-2 細胞と、単培養した C4-2 細胞の mRNA 発現を RT-PCR で比較した (Fig3-A)。TGF- $\beta$  と EMT 関連遺伝子に着目したのは、これらの分子が骨微小環境における腫瘍細胞の生存と発達の促進因子として重要な役割を果たしていることを示唆する証拠が蓄積されているからである。TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2) の mRNA の発現は、共培養の方が単培養よりも有意に高かった。同様に、EMT 関連遺伝子 (TWIST1, Snail2, N-cadherin) の発現も、共培養の方が単培養よりも有意に高かった。また、AR および PSA (AR の下流遺伝子) の発現は、骨芽細胞との共培養で有意に高かった。共培養した細胞懸濁液から分離した C4-2 細胞と単培養した C4-2 細胞のタンパク質発現をウエスタンブロッティングで比較した (Fig3-B)。各遺伝子の mRNA とタンパク質の発現には、同一の発現パターンが見られた。また、共培養における骨芽細胞刺激因子の mRNA 発現を調べたところ、bone morphogenetic protein 2 (BMP2) および血管内皮増殖因子 (VEGF-A, VEGF-B) の mRNA 発現は、共培養の方が単培養よりも有意に高かった (Fig. S5)。

### アビラテロンとデュタステリド併用治療の抗腫瘍効果

このモデルを用いて、骨微小環境におけるアビラテロンとデュタステリドの併用療法の治療効果を評価した。まず GFP を導入した C4-2 細胞の増殖曲線を、アビラテロン単剤、デュタステリド単剤、および両剤の併用で比較した (Fig4-A)。アビラテロンとデュタステリドの併用治療は、それぞれの単剤と比較して、腫瘍の増殖を有意に抑制した (ANOVA,  $P < 0.01$ , 46 日目)。次に、C4-2 細胞に対する各薬剤の用量反応曲線を比較し (Fig4-B)、この効果が相加的なものか相乗的なものかを検討するため、Chou and Talalay median effect principal (14) に従って、combination index (CI) 値を算出した。アビラテロンとデュタステリドの併用によって、C4-2 細胞の増殖を相乗的に抑制した (Fig4-C)。次に、アビラテロン単独、またはアビラテロンとデュタステリドで処理した C4-2 細胞におけるアビラテロン代謝物の濃度を調べた。C4-2 細胞は、17 日目および 28 日目 (薬剤添加後 2 日目および 13 日目) の細胞懸濁液から分離した。C4-2 細胞をアセトニトリルで溶解し、その上清を LC-ESI-TOF/MS で分析した。検出した各薬剤の濃度を Table II に示す。17 日目、デュタステリドの併用により、3-keto-5 $\alpha$ -abiraterone (t-test,  $P < 0.05$ ) および 3 $\beta$ -OH-5 $\alpha$ -abiraterone ( $P < 0.01$ )



の濃度が有意に低下した。28 日目には、デュタステリドの併用により、3-keto-5 $\alpha$ -abiraterone の濃度が減少する傾向にあり (P=0.06)、3 $\beta$ -OH-5 $\alpha$ -abiraterone も有意に減少した (P<0.01)。これらの結果から、アビラテロンとデュタステリドの併用療法は、AR アゴニストとして作用する 5 $\alpha$ -abiraterone の濃度を低下させることで、より強力な腫瘍増殖抑制効果を発揮することが示唆された。CRPC 患者を対象としたアビラテロンとデュタステリド併用療法の第 2 相試験 (16) では、アビラテロンとデュタステリドの併用により PSA が低下した有効例では、血清 3-keto-5 $\alpha$ -abiraterone 濃度の低下が認められ (Fig. S6)、微小環境モデルの結果と同様の結果が得られた。

## 6. 考察

近年、生体内の微小環境を模倣したナノ繊維製の足場を用いた *in vitro* 培養モデルが報告されている (19, 20)。ポリスチレン製培養皿で培養した細胞と比較して、こうした三次元構造を持った足場で培養した細胞はコロニーを形成し、生体に近い形態や機能を長期間維持すること期待できる。今回我々が用いたキトサンナノ繊維は、骨組織の修復・再生のための足場として注目されている。キトサンナノ繊維製の足場を用いた骨芽細胞の長期培養によって、骨形成に関連するオステオポンチンやオステオカルシン、アルカリホスファターゼの発現を runt-related transcription factor 2 を介して制御することにより、骨芽細胞の増殖と成熟を促進することが報告されている (21)。そこで、我々はキトサンナノ繊維製の足場に骨芽細胞と前立腺癌細胞を共培養することで、より生体に近い条件での長期培養が可能になるのではないかと考えた。

前立腺癌の骨転移成立には、原発巣からの癌細胞の遊離、血液やリンパ液を介しての細胞の移動、骨組織への付着、そして骨転移部位での腫瘍の発生という多段階のプロセスを経る。ここでは、前立腺癌細胞と骨芽細胞の相互作用が不可欠であり (22, 23)、前立腺癌細胞は、骨芽細胞が豊富な骨の領域に優先的に移動するという特徴がある (24, 25)。骨の中で前立腺癌細胞と骨芽細胞が物理的に接触すると、破骨細胞を介して骨の構造が破壊され、前立腺癌細胞と骨芽細胞の成長サイクルが相互に促進されるようになる (26)。また、骨吸収によって骨基質から多数の因子が排泄されると、癌細胞の生存と転移の進行がさらに促進される。この現象は、「feed forward cycle」または「vicious cycle」として知られており、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) が、骨微小環境における腫瘍細胞の生存と発達の促進因子として重要な役割を果たしている (27)。TGF- $\beta$  のシグナル伝達は、癌発達の初期段階では癌抑制因子として働くが、進行した段階では、浸潤・転移を促進する上皮間葉転換 (EMT) を引き起こす (28)。また、癌微小環境に発現した TGF- $\beta$  は、免疫細胞や内皮細胞などの他の細胞種にも影響を与え、免疫抑制や血管新生を引き起こし、腫瘍細胞の転移を促進する (29)。

本研究では、CRPC の骨微小環境を模倣した新しい微小環境モデルを構築し、骨芽細胞と共培養した C4-2 細胞では、TGF- $\beta$  の発現が亢進し、EMT が促進されていた。これは過去の報告 (30, 31) でも支持されており、我々のモデルの妥当性を示している。TGF- $\beta$  の発現が亢進することで、C4-2 細胞の増殖が促進され、薬剤耐性を促す (32, 33)。また、骨芽細胞との共培養により、AR とその下流遺伝子である PSA の発現が増加することが示された。TGF- $\beta$  は AR のアップレギュレーションや去勢抵抗性の獲得に関与しており (34)、共培養によるアンドロゲン受容体標的薬への抵抗性や薬剤感受性試験での感度の違いの原因になっていると考えられた。また、骨芽細胞との共培養によって、骨芽細胞刺激因子である BMP2 (bone morphogenetic protein 2) や血管内皮増

殖因子 (VEGF-A、VEGF-B) の発現が増加することが示された (35)。これらの結果から、我々のモデルは、前立腺癌細胞と骨芽細胞の相互作用の分子メカニズムの理解や、骨転移治療のための新しい分子標的の検出に有用であると考えられた。さらに、アビラテロンとデュタステリドの併用治療は、C4-2 細胞の増殖抑制に相乗効果をもたらした。これは、AR アゴニストとして作用する 3-keto-5 $\alpha$ -abiraterone が減少したことに起因すると考えられた。これらの結果は、アビラテロンとデュタステリドの併用が、他のアンドロゲン受容体標的薬よりも臨床的に強力な前立腺癌治療薬となる可能性を示している。

近年、生検などから採取した腫瘍細胞で形成したスフェロイドやオルガノイドを用いた患者特異的な 3 次元培養モデルが注目を集めている (36, 37)。患者組織由来のオルガノイドは、治療戦略の決定や有効性の予測のために、治療前の薬剤スクリーニングに使用されている。今回の我々の研究の発展として、患者由来の前立腺癌組織のオルガノイドと骨芽細胞を共培養した 3 次元モデルを作成することができれば、今後のテーラーメイド医療に貢献する可能性がある。

今回の検討の limitation は、骨の微小環境において重要な因子である破骨細胞がモデルに含まれていないことである。破骨細胞は骨の構造を破壊し、前立腺癌細胞と骨芽細胞の成長サイクルを促進させる働きがある。しかし、前立腺癌の骨転移は溶骨性ではなく造骨性であるため、破骨細胞の欠如はこのモデルにとってそれほど重要ではないかもしれない。またもう一つの limitation として、in vivo 研究がないことが挙げられる。前立腺癌骨転移のマウスモデルが報告されており (38)、今後はマウスモデルを用いた検討を行いたい。

## 7. 結語

今回、我々は去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) の骨微小環境を模倣した新規の in vitro 3 次元微小環境モデルを確立した。本モデルは、前立腺癌の薬剤感受性の評価に有用であり、今後このモデルは、前立腺癌の微小な骨転移から臨床的な骨転移に至るまでの未知のメカニズムの解析に役立つ可能性がある。

## 8. 謝辞

研究の構想・設計にあたり、ご指導を頂いた松山豪泰先生、松本洋明先生、平田寛先生、上野耕司先生、萩中淳先生、堀山志朱代先生、玉田耕治先生に感謝致します。

## 9. 参考文献

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA and Jemal A: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 68: 394-424, 2018.
2. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P, Davis M, Peters TJ, Turner EL, Martin RM, et al: 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy

- for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med* 375: 1415-1424, 2016.
3. Weckermann D, Polzer B, Ragg T, Blana A, Schlimok G, Arnholdt H, Bertz S, Harzmann R and Klein CA: Perioperative activation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *J Clin Oncol* 27: 1549-1556, 2009.
  4. National Cancer Institute. SEER Cancer Stat Facts: prostate cancer, 2020. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>.
  5. Sweeney CJ, Chen YH, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, Wong YN, Hahn N, Kohli M, Cooney MM, et al: Chemohormonal therapy in metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *N Engl J Med* 373: 737–746, 2015.
  6. Wadosky KM and Koochekpour S: Molecular mechanisms underlying resistance to androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Oncotarget* 7: 64447–64470, 2016.
  7. Sumanasuriya S and Bono JD: Treatment of advanced prostate cancer-A review of current therapies and future promise. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8: a030635, 2018.
  8. Pezaro C, Omlin A, Lorente D, Rodrigues DN, Ferraldeschi R, Bianchini D, Mukherji D, Riisnaes R, Altavilla A, Crespo M, et al: Visceral disease in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 65: 270-273, 2014.
  9. Shiirevnyamba A, Takahashi T, Shan H, Ogawa H, Yano S, Kanayama H, Izumi K and Uehara H: Enhancement of osteoclastogenic activity in osteolytic prostate cancer cells by physical contact with osteoblasts. *Br J Cancer* 104: 505-513, 2011.
  10. Antunes J, Gaspar VM, Ferreira L, Monteiro M, Henrique R, Jerónimo C and Mano JF: In-air production of 3D co-culture tumor spheroid hydrogels for expedited drug screening. *Acta Biomater* 94: 392-409, 2019.
  11. Ryan CJ, Smith MR, Fizazi K, Saad F, Mulders PF, Sternberg CN, Miller K, Logothetis CJ, Shore ND, Small EJ, et al: Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naïve men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-

- controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 16: 152-160, 2015.
12. Li Z, Alyamani M, Li J, Rogacki K, Abazeed M, Upadhyay SK, Balk SP, Taplin ME, Auchus RJ and Sharifi N: Redirecting abiraterone metabolism to fine-tune prostate cancer anti-androgen therapy. *Nature* 533: 547-551, 2016.
  13. Andriole GL, Bostwick DG, Brawley OW, Gomella LG, Marberger M, Montorsi F, Pettaway CA, Tammela TL, Teloken C, Tindall DJ, et al: Effect of dutasteride on the risk of prostate cancer. *N Engl J Med* 362: 1192-1202, 2010.
  14. Chou TC and Talalay P: Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22: 27-55, 1984.
  15. Livak and Schmittgen: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
  16. Matsuyama H, Shiota M, Tashiro K, Kanji H, Horiyama S, Eto M, Egawa S, Haginaka J and Inoue R: Phase II study of the efficacy of Abiraterone acetate with Dutasteride for castration resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 39: 112-112, 2021.
  17. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA and Murphy GP: LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43: 1809-1818, 1983.
  18. Cai C, Chen S, Ng P, Bublely GJ, Nelson PS, Mostaghel EA, Marck B, Matsumoto AM, Simon NI, Wang H, et al: Intratumoral de novo steroid synthesis activates androgen receptor in castration-resistant prostate cancer and is upregulated by treatment with CYP17A1 inhibitors. *Cancer Res* 71: 6503-6513, 2011.
  19. Rajendran D, Hussain A, Yip D, Parekh A, Shrirao A and Cho CH: Long-term liver-specific functions of hepatocytes in electrospun chitosan nanofiber scaffolds coated with fibronectin. *J Biomed Mater Res A* 105: 2119-2128, 2017.
  20. Hussain A, Collins G, Yip D and Cho CH: Functional 3-D cardiac co-culture model using bioactive chitosan nanofiber scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 110: 637-647, 2013.
  21. Ho MH, Liao MH, Lin YL, Lai CH, Lin PI and Chen RM: Improving effects of chitosan

- nanofiber scaffolds on osteoblast proliferation and maturation. *Int J Nanomedicine* 9: 4293-4304, 2014.
22. Kimura Y, Matsugaki A, Sekita A and Nakano T: Alteration of osteoblast arrangement via direct attack by cancer cells: new insights into bone metastasis. *Sci Rep* 7: 44824, 2017.
23. Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM and Guise TA: Molecular biology of bone metastasis. *Mol Cancer Ther* 6: 2609-2617, 2007.
24. Wang N, Docherty FE, Brown HK, Reeves KJ, Fowles AC, Ottewell PD, Dear TN, Holen I, Croucher PI and Eaton CL: Prostate cancer cells preferentially home to osteoblast-rich areas in the early stages of bone metastasis: evidence from in vivo models. *J Bone Miner Res* 29: 2688-2696, 2014.
25. Klein CA: Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature* 501: 365-372, 2013.
26. Guise TA, Mohammad KS, Clines G, Stebbins EG, Wong DH, Higgins LS, Vessella R, Corey E, Padalecki S, Suva L, et al: Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res* 12: 6213s-6216s, 2006.
27. Weilbaecher KN, Guise TA and McCauley LK: Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer* 11: 411-425, 2011.
28. Klein CA: Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature* 501: 365-372, 2013.
29. Chiechi A, Waning DL, Stayrook KR, Buijs JT, Guise TA and Mohammad KS: Role of TGF-beta in breast cancer bone metastases. *Adv Biosci Biotechnol* 4: 15-30, 2013.
30. Pickup M, Novitskiy S and Moses HL: The roles of TGFβ in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 13: 788-799, 2013.
31. Juárez P and Guise TA: TGF-β in cancer and bone: implications for treatment of bone metastases. *Bone* 48: 23-29, 2011.
32. Montanari M, Rossetti S, Cavaliere C, D'Aniello C, Malzone MG, Vanacore D, Di Franco

- R, La Mantia E, Iovane G, Piscitelli R, et al: Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer: an overview. *Oncotarget* 8: 35376-35389, 2017.
33. Nakazawa M and Kyprianou N: Epithelial-mesenchymal-transition regulators in prostate cancer: Androgens and beyond. *J Steroid Biochem Mol Biol* 166: 84-90, 2017.
34. Shiota M, Itsumi M, Takeuchi A, Imada K, Yokomizo A, Kuruma H, Inokuchi J, Tatsugami K, Uchiumi T, Oda Y, et al: Crosstalk between epithelial-mesenchymal transition and castration resistance mediated by Twist1/AR signaling in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 22: 889-900, 2015.
35. Fizazi K, Yang J, Peleg S, Sikes CR, Kreimann EL, Daliani D, Olive M, Raymond KA, Janus TJ, Logothetis CJ, et al: Prostate cancer cells-osteoblast interaction shifts expression of growth/survival-related genes in prostate cancer and reduces expression of osteoprotegerin in osteoblasts. *Clin Cancer Res* 9: 2587-2597, 2003.
36. Elbadawy M, Abugomaa A, Yamawaki H, Usui T, Sasaki K: Development of Prostate Cancer Organoid Culture Models in Basic Medicine and Translational Research. *Cancers (Basel)* 12: 777, 2020.
37. Bartucci M, Ferrari AC, Kim IY, Ploss A, Yarmush M and Sabaawy HE: Personalized Medicine Approaches in Prostate Cancer Employing Patient Derived 3D Organoids and Humanized Mice. *Front Cell Dev Biol* 4: 64, 2016.
38. Kuchimaru T, Kataoka N, Nakagawa K, Isozaki T, Miyabara H, Minegishi M, Kadonosono T and Kizaka-Kondoh S: A reliable murine model of bone metastasis by injecting cancer cells through caudal arteries. *Nat Commun* 30: 2981, 2018.

**Table I.**

IC<sub>50</sub>-values of androgen receptor-axis-targeted agents in the bone microenvironment model.

Drugs	IC <sub>50</sub> , $\mu$ M
Enzalutamide	50.85 $\pm$ 1.90
Apalutamide	51.02 $\pm$ 1.98
Darolutamide	35.14 $\pm$ 1.26
Abiraterone	38.85 $\pm$ 5.38
$\Delta$ 4 Abiraterone	10.47 $\pm$ 4.87

**Table II.**

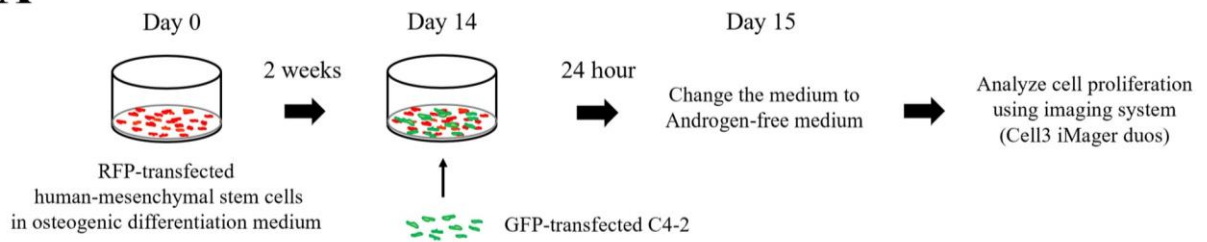
Intracellular concentrations of abiraterone and each metabolite.

<b>A, Day 17</b>			
Metabolite	Abiraterone	Abiraterone + Dutasteride	P-value
Abiraterone, ng/ml	346.60 $\pm$ 68.99	351.73 $\pm$ 48.41	NS
$\Delta$ 4 Abiraterone, ng/ml	4.54 $\pm$ 1.14	3.08 $\pm$ 0.38	NS
3-keto-5 $\alpha$ -Abiraterone, ng/ml	3.24 $\pm$ 0.91	0.91 $\pm$ 0.73	0.01
3 $\beta$ -OH-5 $\alpha$ -Abiraterone, ng/ml	8.63 $\pm$ 0.43	0.99 $\pm$ 0.73	<0.01
<b>B, Day 28</b>			
Metabolite	Abiraterone	Abiraterone + Dutasteride	P-value
Abiraterone, ng/ml	1,228.76 $\pm$ 81.91	2,125.07 $\pm$ 145.86	<0.01
$\Delta$ 4 Abiraterone, ng/ml	8.04 $\pm$ 1.71	7.20 $\pm$ 0.15	NS
3-keto-5 $\alpha$ -Abiraterone, ng/ml	2.97 $\pm$ 0.81	1.73 $\pm$ 0.77	0.06
3 $\beta$ -OH-5 $\alpha$ -Abiraterone, ng/ml	24.90 $\pm$ 1.86	2.20 $\pm$ 0.63	<0.01

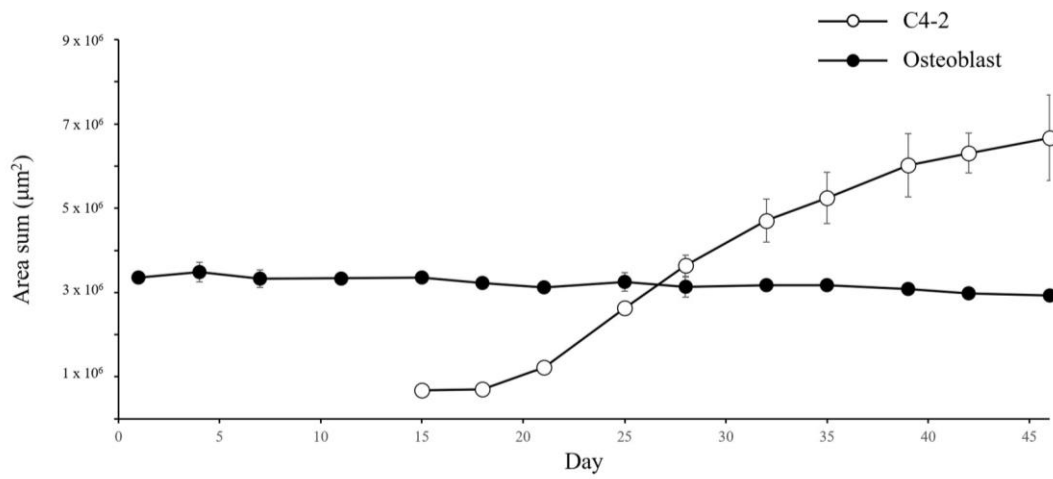
The values are presented as mean  $\pm$  SD. NS, Not Significant.

Figure 1

**A**



**B**



**C**

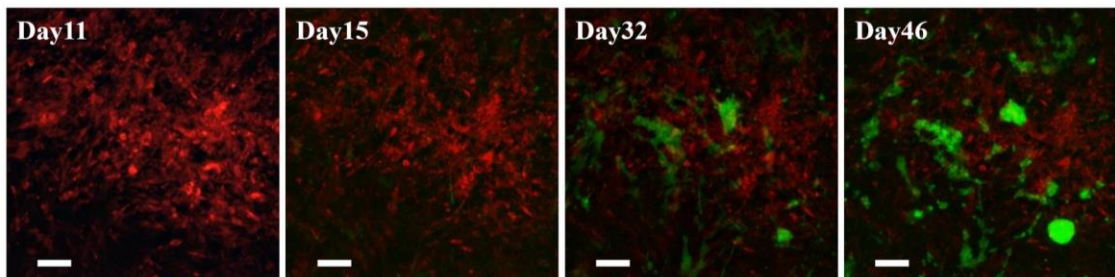




Figure 2

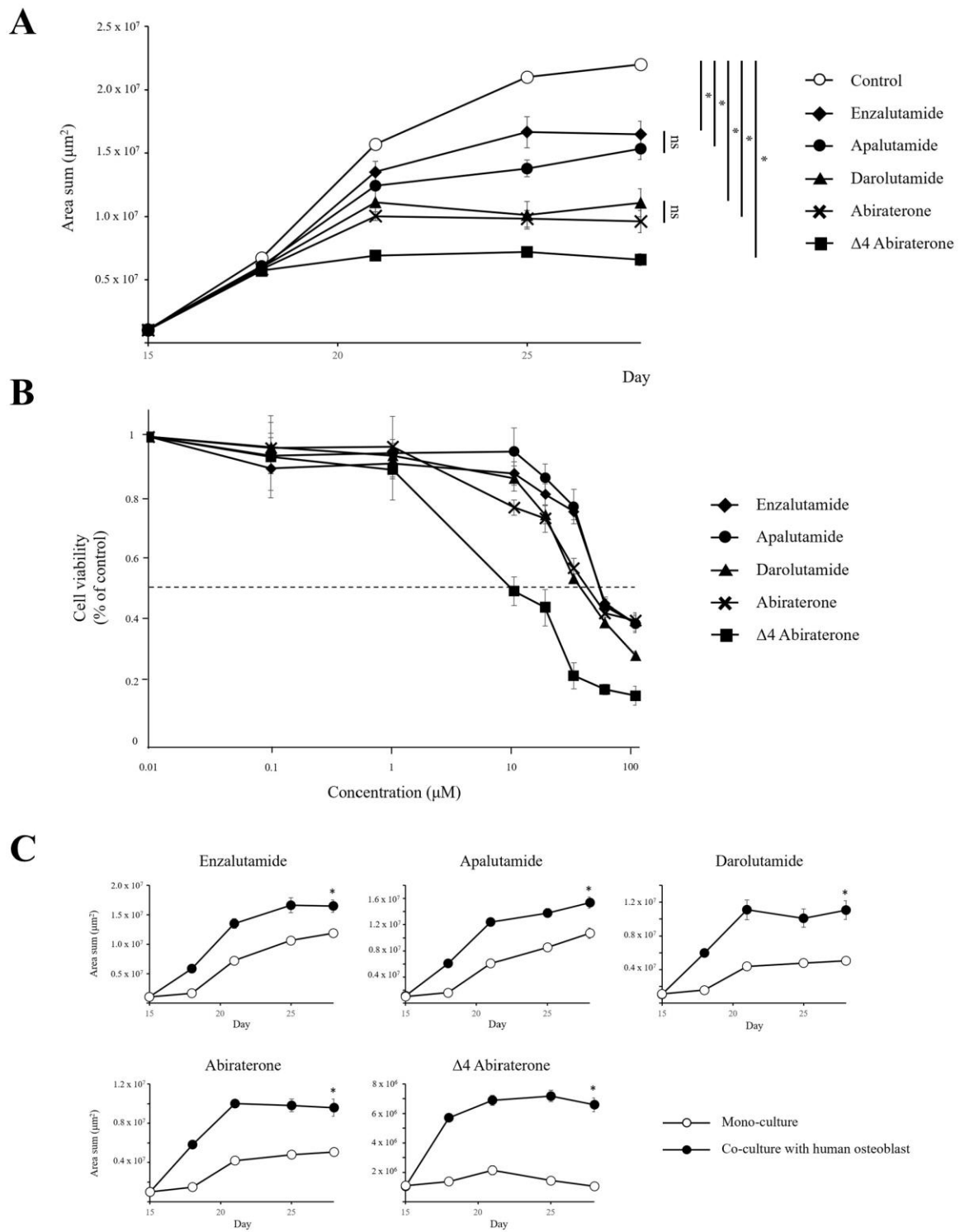


Figure 3

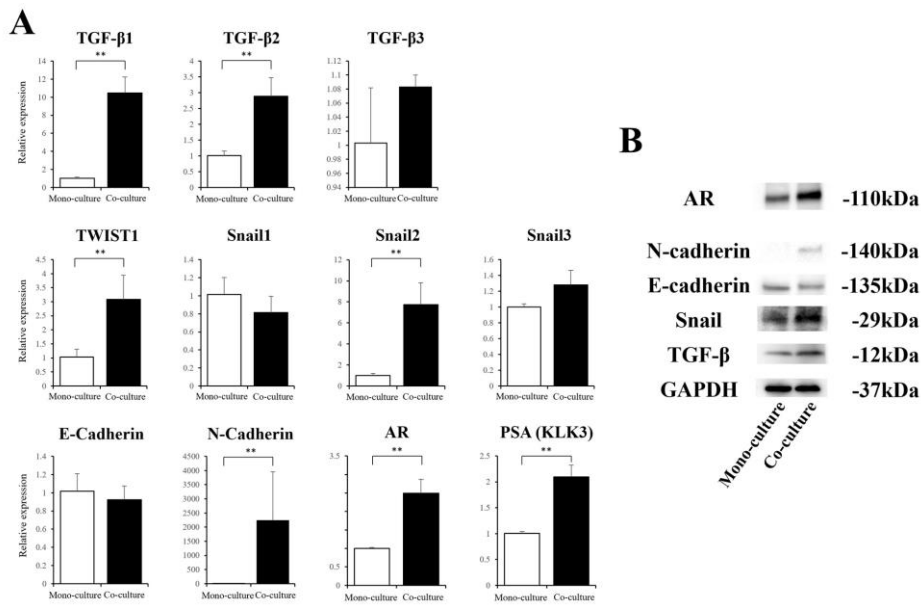


Figure 4

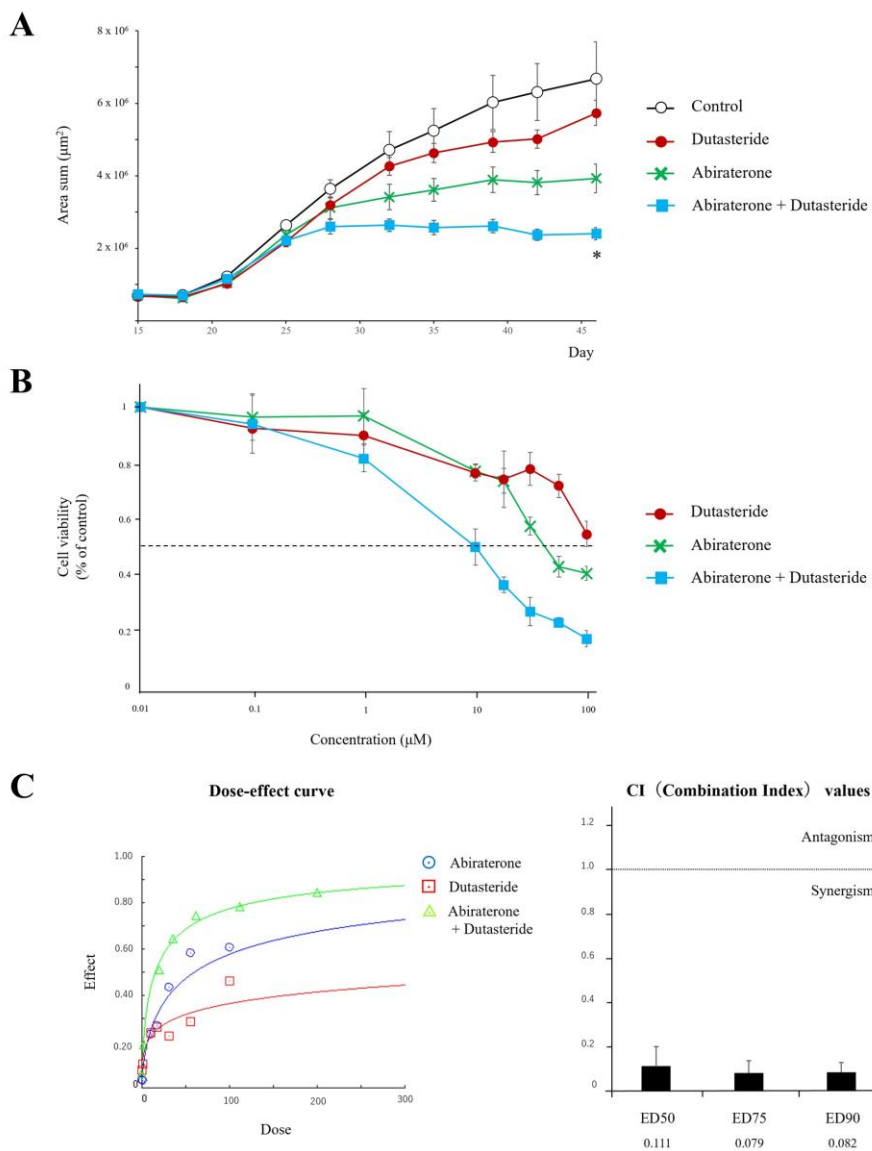


Figure S1

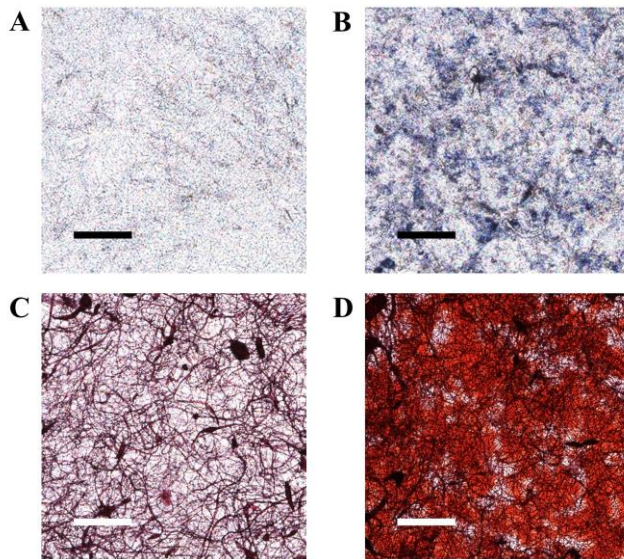


Figure S2

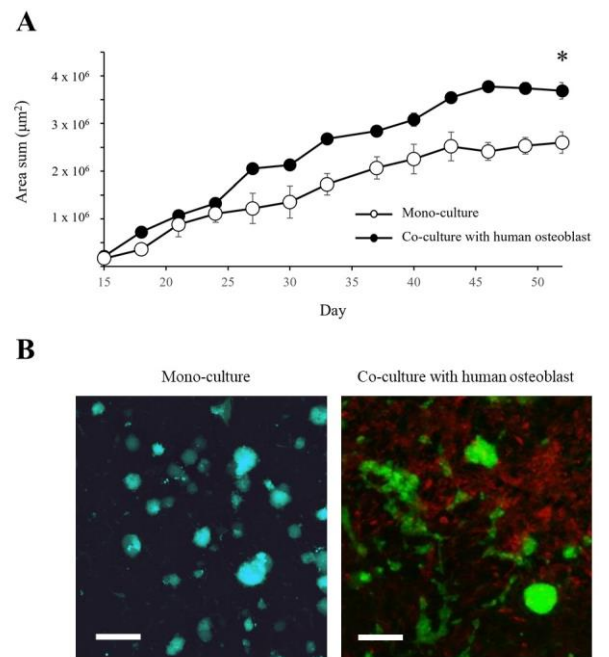


Figure S3

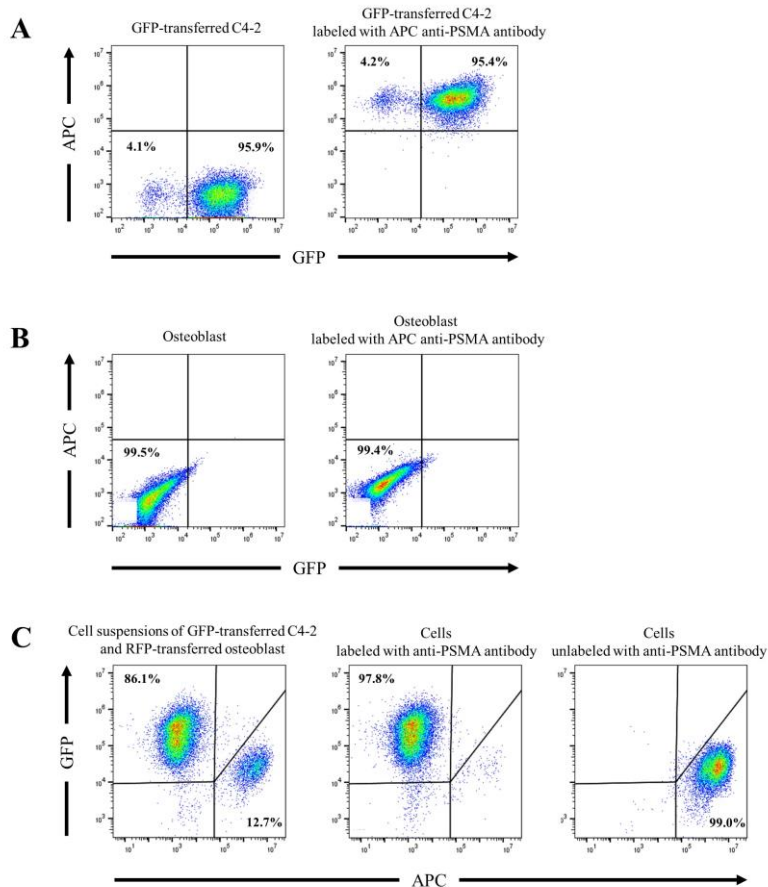


Figure S4

