

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04971

研究課題名(和文) イメージング質量分析による前立腺癌の脂質・ステロイド代謝に関する研究

研究課題名(英文) Lipid and steroid metabolism and prostate cancer using imaging mass-spectrometry

研究代表者

鈴木 和浩 (Suzuki, Kazuhiro)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80312891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,700,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌はアンドロゲン依存性であり、基質である脂質は前立腺癌の増殖に重要な役割をもつ。今回、イメージング質量分析による手法を用いて、前立腺組織における男性ホルモンおよびコレステロールの局在および質量分布を検討した。テストステロン、ジヒドロテストステロン、コレステロールはそれぞれ異なる質量もつが、マススペクトロメリーによって同時に定量が可能であった。組織所見との対比も可能であり有用な手法であることを確認した。さらに、コレステロール代謝を制御するHMG-CoA還元酵素阻害剤であるスタチンによる前立腺癌細胞増殖抑制を、LDL受容体の変化ならびにAnnexin A10分子の変化から説明した。

研究成果の概要(英文)：Prostate cancer is an androgen-dependent cancer. Lipid, which is a substrate of androgen, plays an important role on prostate cancer proliferation. In this study, we studied the localization and mass-distribution of testosterone, dihydrotestosterone and cholesterol in prostate cancer tissues using the imaging mass-spectrometry. Testosterone, dihydrotestosterone and cholesterol have their own molecular weights, and these molecules were able to be quantified by mass-spectrometry. Simultaneous histological analyses were feasible, and imaging mass-spectrometry would be considered as efficient. We also studied the role of statin, inhibitor of HMG-CoA reductase, on prostate cancer proliferation. We found that LDL receptor and annexin A10 were involved in the regulation of prostate cancer proliferation under control of statin.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 脂質 ステロイド

1. 研究開始当初の背景

我々は、前立腺癌のバイオロジーを脂質代謝の点から検討し、これまで中性脂肪に富むレムナントリポプロテインや、コレステロールを主体とする LDL および HDL が前立腺癌増殖と関連することを見いだしてきた (Sekine Y, et al, Clin Chim Acta 2007, Cancer Epidemiol 2009, Mol Cancer Res 2010, Prostate 2011)。前立腺癌細胞に発現する LDL 受容体がコレステロール代謝およびスタチンの感受性と関係している点も重要な点である (Furuya Y, et al AACR-Advances in Prostate Cancer Research 2011, Florida)。さらに、コレステロール合成を制御するメバロン酸経路の鍵となるスクアレン合成酵素をコードする遺伝子、farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1(FDFT1)のプロモータに存在する SNP,rs2645298 が家族性前立腺癌の発症リスクと関連していることを association study から見いだした。FDFT1 の遺伝子発現を亢進させる遺伝子型 (AA genotype) およびスクアレン合成酵素活性が前立腺癌細胞増殖を有意に亢進させる (Fukuma Y, Matsui H, et al Prostate Cancer Prostatic Dis 2012)。これらの知見は、コレステロールを中心とした脂質代謝が前立腺癌増殖と密接に関連していることを示唆している。

一方、前立腺癌の最大の生理学的特徴である男性ホルモン依存性は、去勢抵抗性前立腺癌の発症メカニズムの理解と新規ホルモン製剤の開発から新たな局面を迎えている。我々は前立腺組織内のステロイドホルモン濃度の微量定量法を確立し、前立腺全摘組織のみならず、針生検組織でも定量可能とした (Arai, et al Steroids 2011, Andrology 2013, Shibata Y, et al Andrology 2013)。液体クロマトグラムに質量分析計をタンデムに組み合わせ合わせた LC-MS/MS を用いて解析を行った。Mass-spectrometry はイオン化された分子を同時に測定できるため、同一の挙動を示すステロイドホルモンは一括測定が可能となる。さらに、内部標準物質との比較からリカバリーを考慮することなく正確な定量が可能であるメリットがある。臨床的に、診断時の組織内アンドロゲンプロフィールとホルモン療法の反応性を他施設共同研究で行った。前立腺組織内は DHT が有意なアンドロゲンであるが、癌組織内では T が優位な方向にシフトし、T/DHT 比が高くなっていくことが判明した。さらに初期ホルモン療法後に去勢抵抗性前立腺癌となる症例では T/DHT 比が有意に高いことが判明した

(Shibata Y, et al Andrology 2013)。去勢抵抗性癌組織ではステロイドホルモン代謝酵素である AKR1C3、HSD3B2、5 還元酵素 type1/II が発現していることも確認している (Arai S et al Andrology 2013)。前立腺癌はそのバイオロジーの点からステロイドホルモンおよびコレステロールを中心とした脂質による増殖の調節を受けており、ステロイドホルモンがコレステロールから合成される点からも、両者は密接に関連している。我々のこれまでの検討の弱点は細胞培養を中心とした脂質代謝の解析、そして、LC-MS/MS を使用したステロイドホルモンの解析はホモジェネートを使用した局在検討の欠如であった。この点を解決するため、イメージング質量分析による脂質・ステロイドホルモン・代謝酵素の局在および定量を検討することを計画した。群馬大学大学院医学系研究科大学院教育支援センター共同利用機器部門に導入された質量分析計 (Ultraflex Xtreme, ブルカー・ダルトニクス社) によって、イメージング質量分析を行う。

2. 研究の目的

前立腺組織におけるステロイド代謝を総合的に検討するため、イメージング質量分析を行なう。さらに、前立腺における脂質代謝とステロイドおよびその受容体の役割を検討することを目的とした

3. 研究の方法

(1) イメージング質量分析による前立腺組織の評価

サンプルはヒト前立腺癌細胞である PC-3 のヌードマウス皮下移植モデルによって形成した腫瘍を用いた。評価用封じ込め剤で固定し、薄切切片をマトリックス処理した。DHB_nsh04(30g/L in 50%MeOH, 0.2%TFA) を使用し、N2 による処理を 1 次圧 13/12.8MPa、2 次圧 0.4MPa で行なう。真空度は次表のような条件であった。

| | 前 | 後 |
|----------------|---------|---------|
| Lock Rough | 1.9e+00 | 1.8e+00 |
| Source Rough | 1.9e+00 | 1.8e+00 |
| Source High | 1.5e-7 | 2.5e-7 |
| Analyzer Rough | 1.9e+00 | 1.9e+00 |
| Analyzer High | 8.6e-8 | 8.7e-8 |

キャリブレーションスタンダードは Peptide Calibration Standard II (Bruker, 8222570) を使用。FlexControl Method として PR:0-2kD.Par で測定範囲が 200-3500Da で可能。レーザーの条件は下記とした。

| | | |
|-------------------|-----------------------------|-----------------|
| レーザーパワー | 初期値:21% | 調節後:65% |
| Detector Gain | 初期値:3.5x(2381V) | 調節後:5.0x(2445V) |
| Mass Control List | Peptide Calib Standard mono | |

| | | |
|------------|-------------------|--|
| Zoom Range | ± 0.5 % | |
| Mode | Cubic Enhancer | |

質量分析系の条件は、AutoXecute Method, 200 の Sum up、PMF/FMSS method、100 μm の raster width、Regions Pane を、Measurement region 2、Positions:9700、Time estimate 2.59h とした。Edit Mass Filter Parameter として下記のパラメータを設定した。

| Name | Center Mass (Da) | Mass range | Export spectrum | Export Image |
|------|------------------|------------|-----------------|--------------|
| Cho | 386.3549 | ± 0.25% | | |
| DHT | 290.2246 | ± 0.25% | | |
| T | 288.2089 | ± 0.25% | | |

(2)脂質・ステロイドと前立腺癌、前立腺肥大症の基礎研究

1) HMG-CoA 阻害剤による脂質代謝制御と前立腺癌増殖

前立腺癌細胞 LNCaP および PC-3 における LDL 受容体の発現と増殖能を MTS アッセイで評価し、細胞内のコレステロール濃度と LDL 受容体の発現の関係を検討した。また、HMG-CoA 阻害剤と meclofenamic acid の併用による PC-3 細胞の増殖抑制効果を前立腺組織内ステロイド代謝酵素である AKR1C3 の点から検討した。

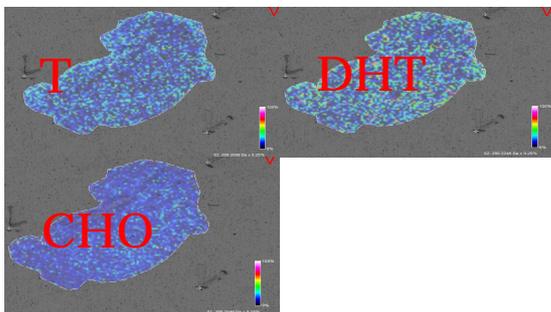
2) HMG-CoA 阻害剤処理による網羅的遺伝子発現解析の評価から Annexin A10 をターゲットとして前立腺癌細胞増殖との関係を検討した。

3) 前立腺肥大症治療薬による組織内ステロイドホルモン濃度を LC-MS/MS による定量から検討した。

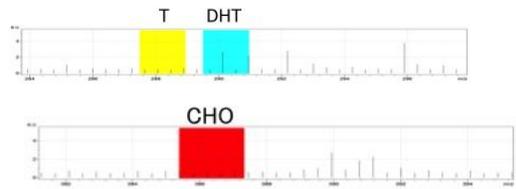
4. 研究成果

(1) イメージング質量分析による前立腺組織の評価

全体の分子イメージからテストステロン (T)、DHT (ジヒドロテストステロン)、CHO (コレステロール) にターゲット (分子量による) としてイメージを構成する。



さらに、各ステロイドの分子量と量の関係から次のようなスペクトル像を得ることが可能。



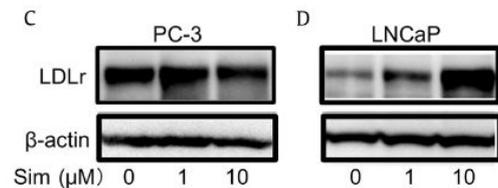
上のスペクトラム像から T、DHT、CHO の定量が可能となり、組織図の対比から局在の評価ができることとなった。

(2) 脂質・ステロイドと前立腺癌、前立腺肥大症の基礎研究

1) LNCaP, PC-3 細胞には LDL 受容体 (LDLr) が Western blot および PCR で存在を確認した。シンバスタチンによって LNCaP 細胞では LDLr は発現が亢進したが、PC-3 細胞では亢進せず、脂質代謝機構が破綻していた。これを反映して細胞内のコレステロール濃度は、PC-3 細胞では用量依存的に減少し、LNCaP 細胞では不変であった。こうした点からスタチンによる前立腺癌細胞増殖機構の一つに LDLr の制御があげられることを示した。

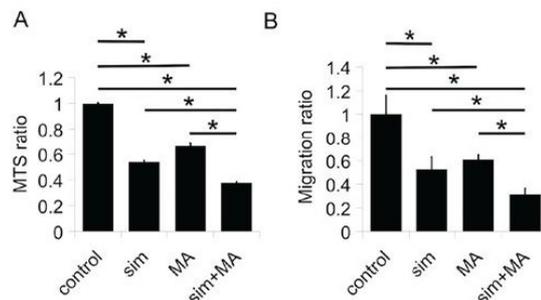
(PC-3, LNCaP における LDLr 発現)

また、シンバスタチンは細胞内コレステロールを減少させるが、AKR1C3 を有意に増加させ



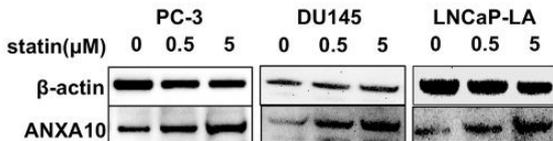
た。siRNA による AKR1C3 の発現抑制によりシンバスタチンによる細胞増殖抑制がみられた。Meclofenamic acid の併用はさらにその抑制効果を増強させた。

A は MTS による細胞増殖であり、シンバスタチンに meclofenamic acid を併用すると最も抑制される。B は遊走能の評価で同様である。2) シンバスタチンを PC-3 細胞に作用させた後の cDNA の変化から annexin A10 の発現が有意に亢進していた。本分子細胞増殖に関係するため、PC-3 以外の LNCaP および去勢抵抗性前立腺癌の性質をもつ LNCaP-LA での状況



を検討し、次のように、発現の亢進を認めた。

この分子は S100 カルシウム結合蛋白 A4 (S100A4) の発現を抑制することを前立腺

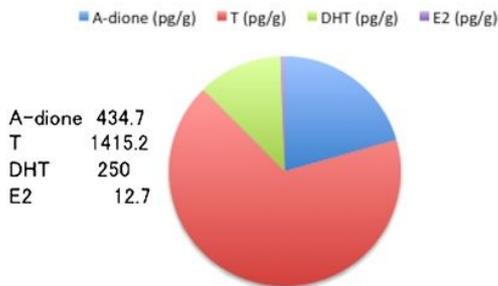


癌細胞でも確認し、スタチンの細胞増殖抑制の一つの要因である可能性を示した。

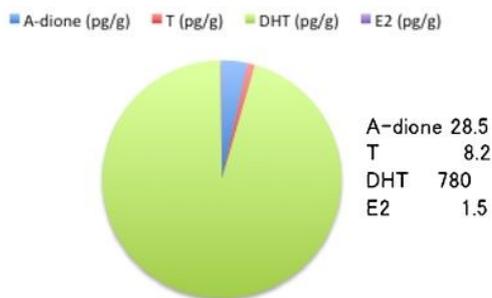
3) 前立腺肥大症治療薬による組織内ステロイドホルモン濃度は、5 還元酵素阻害剤(5ARI)およびステロイド性アンチアンドロゲン(AA)で変化するが、ヒト前立腺癌組織での濃度の差を検討した。LC-MS/MSの技法を用いた微量同時測定を行った。

下記に5ARIおよびAAによる組織内ホルモンの分布を示す。5ARIではテストステロンが有意であり、正常の状態から大きくことなる。一方、AAではDHT有意であり、生理的な状態の分布と割合は大きく変化せず、濃度の抑制がみられた。こうした結果は、長期に服用した際の前立腺組織への影響などが異なることを示唆している結果と考えられる。

Hormone component (DUTA)



Hormone component (CMA)



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Furuya Y, Sekine Y, Kato H, Miyazawa Y, Koike H, Suzuki K: Low-density lipoprotein receptors play an important role in the

inhibition of prostate cancer cell proliferation by statins. Prostate Int 査読有 4,2016,56-60 doi: 10.1016/j.prnil.2016.02.003

2. Sekine Y, Nakayama H, Miyazawa Y, Kato H, Furuya Y, Arai S, Koike H, Matsui H, Shibata Y, Ito K, Suzuki K: Simvastatin in combination with meclofenamic acid inhibits the proliferation and migration of human prostate cancer PC-3 cells via an AKR1C3 mechanism. Oncology Letters 査読有 15, 2018, 3167-3172. Doi: 10.3892/ol.2017.7721.

3. Miyazawa Y, Sekine Y, Kato H, Furuya Y, Koike H, Suzuki K: Simvastatin up-regulates annexin A10 that can inhibit the proliferation, migration, and invasion in androgen-independent human prostate cancer cells. Prostate 査読有 77,2017,337-349. Doi:10.1002/pros.23273.

4. Shibata Y, Arai S, Miyazawa Y, Shuto T, Nomura M, Sekine Y, Koike H, Matsui H, Ito K, Suzuki K: Effect of steroidal antiandrogen or 5-alpha-reductase inhibitor on prostate tissue hormone content. Prostate 査読有 77,2017,672-680. Doi:10:1002/pros.23315.

〔学会発表〕(計5件)

1. 宮澤慶行、関根芳岳、加藤春雄、古谷洋介、宮尾武士、栗原聡太、新田貴士、野村昌史、小池秀和、松井博、柴田康博、伊藤一人、鈴木和浩: Annexin A10を介したスタチンによる去勢抵抗性前立腺癌進展機構の解明 第104回日本泌尿器科学会総会 2016年

2. Miyazawa Y, Sekine Y, Kato H, Furuya Y, Koike H, Suzuki K: Simvastatin inhibits the proliferation, migration and invasion of androgen independent prostate cancer cells via up-regulation of Annexin A10. 米国泌尿器科学会 2016年

3. 柴田康博、新井誠二、宮澤慶行、栗原聡太、周東孝浩、関根芳岳、野村昌史、小池秀和、松井博、伊藤一人、鈴木和浩: 抗アンドロゲン剤および5 還元酵素阻害剤投与による前立腺組織内ホルモン構成への影響 第105回日本泌尿器科学会総会 2017年

4. 宮澤慶行、関根芳岳、加藤春雄、古谷洋介、小池秀和、鈴木和浩: Annexin A10を介したスタチンによる去勢抵抗性前立腺癌進展制御機構の解明 日本アンドロロジー学会第36回学術大会 2017年

5. 関根芳岳、宮澤慶行、中山紘史、新井誠二、小池秀和、松井博、柴田康博、伊藤一人、鈴木和浩: 去勢抵抗性前立腺癌におけるAR-V7とARの発現比の検討 日本アンドロロジー学会第36回学術大会 2017年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 和浩 (SUZUKI, Kazuhiro)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80312891

(2)研究分担者

伊藤 一人 (ITO, Kazuto)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00302472

関根 芳岳 (SEKINE, Yoshitaka)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00516374

松井 博 (MATSI, Hiroshi)
群馬大学・重粒子線医学推進機構・講師
研究者番号：40450374

柴田 康博 (SHIBATA, Yasuhiro)
群馬大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90344936

小池 秀和 (KOIKE, Hidekazu)
群馬大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90420091