

平成 22 年 2 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19791101  
 研究課題名（和文） 前立腺癌の進展・転移における基底膜分解酵素活性の分子機序の解明と臨床応用  
 研究課題名（英文） Solution and clinical application of the molecular mechanism of basal membrane degrading enzyme activity in progression / the metastasis of the prostate cancer  
 研究代表者  
 神谷 直人（KAMIYA NAOTO）  
 千葉大学・大学院医学研究院・助教  
 研究者番号：40436431

## 研究成果の概要（和文）：

前立腺癌骨転移における MMPs を介する分子機序の解明及び骨転移症例に対するバイオマーカーとしての MMP の臨床的有用性について検討した。前立腺局所の MMPs の発現強度に対する評価として、FIZ (film *in situ* zymography)、Zymography (GZG)、免疫組織化学を施行 (IHC)。治療前血清 MMP-2/9 を測定し、各種臨床病理学的パラメータならびに前立腺局所でのゼラチナーゼ活性との相関を比較検討した。前立腺癌の骨転移には MMP-2 が強く関与しており、前立腺局所における MMP-2 活性ならびに血清 MMP-2 値は、バイオマーカーとして有用であることが示めされた。

## 研究成果の概要（英文）：

MMP-2 was strongly associated with the bone metastases of prostate cancer, and it was suggested that the gelatinolytic activity of MMP-2 in the prostatic focus and serum levels of MMP-2 were useful as biomarker.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：

前立腺、骨転移、MMP、Film *in situ* zymograph、zymography

## 1. 研究開始当初の背景

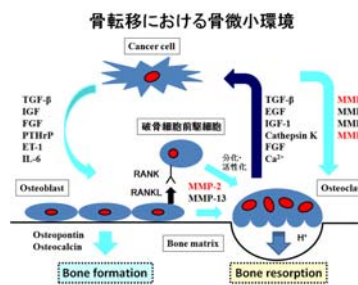
前立腺癌は、欧米諸国において男性で最も罹患率の高い癌であり、死亡率も肺癌に次いで第 2 位の癌である。本邦においても生活の欧米化、急速な高齢化、前立腺特異抗原(PSA)

検査の普及に伴い、増加の一途である。近年、PSA による検診等スクリーニングの普及に伴い、早期前立腺癌症例が増加している中で、骨・リンパ節転移の原発巣として発見される前立腺癌も少なくない。再発症例・転移を認

める進行前立腺癌症例に対する治療法は、内分泌療法が選択されることが多いが、内分泌療法も治療効果期間は永遠に続くわけではなく、内分泌抵抗性癌になることが多い。現在、内分泌抵抗性癌に対する新規治療法への取り組みもされているが、治療に難渋しているのが現状である。そのため、今後も増加していくと予想される前立腺癌に対する適切な治療法、診断法を確立することは、患者の予後改善・QOL の向上・近年増加の一途である医療費の削減等の観点からも急務であると考えられる。

## 2. 研究の目的

前立腺癌の転移部位は、約 70~80%が骨であり、その殆どにおいて造骨性病変を示す。骨形成（造骨）性変化が中心の前立腺癌においても骨吸収（溶解）性変化は、極めて重要である。我々の検討では、骨吸収性マーカーである血清 ICTP 及び TRAP-5b と骨形成性マーカーである血清 BAP 値は前立腺癌骨転移症例において上昇していた。中でも、血清 ICTP は優れた予後予測マーカーになることを証明した。溶骨性病変部において骨破壊の中心的役割を担うのは、破骨細胞である。骨転移における骨微小環境について図 1 に示す。破骨細胞は、H<sup>+</sup>を放出し、酸性環境を構築することで、ヒドロキシアパタイトを脱灰する。間質細胞の RANKL (Receptor activator of NF-κB ligand) は、PTHrP (Parathyroid hormone-related protein) により産生を促され、RANK (Receptor activator of NF-κB) と結合して破骨細胞の分化を促進し、溶骨性病変を活性化する。我々は、破骨細胞活性マーカーである血清 OPG (Osteoprotegerin) と RANKL 値を測定し、血清 OPG は優れた骨転移および予後予測マーカーになることを証明した。現在、論文は海外雑誌に投稿中である。破骨細胞は、MMP (Matrix metalloproteinase) -9 を分泌し、骨芽細胞から MMP-2・13 等が分泌される。さらに MMP-2・9 は、TGF (Transforming growth factor) -β を活性化し、TGF-β が前立腺癌細胞の増殖を刺激し、PTHrP 産生を促す(図 1)。(図 1)



このように、骨破壊のプロセスにおいて MMPs や RANKL 等は、骨転移と密接な関

係があり、癌増殖の過程において他の病巣と比較して骨転移巣における MMPs の役割は、極めて重要であると考えられる。MMPs は、亜鉛イオンを活性部位に持つプロテアーゼの一群である。その中でも MMP-2・MMP-9 は、基底膜のIV型コラーゲン分解に関与するゼラチナーゼであり、血管新生の際に基底膜分解などを通じて癌の進展・転移に大きく関与していることが明らかになっている。また、MMP 阻害剤の投与により腫瘍縮小効果も報告されている。前立腺癌に対する治療経過中の再発は、通常まず、PSA の上昇により診断される。しかし、本研究者らも報告しているが、PSA 上昇を伴わない場合も認められる。臨床学的には、PSA 以外に直腸診所見・病理学的所見・画像診断等各種パラメータで再発予測をしている。骨転移における腫瘍マーカーはいくつか報告されているが、その中でも MMPs は、有用なマーカーであると考えられる。本研究者は、既に FIZ (film *in situ* zymography) という近年開発された手法を用いて、腎細胞癌・膀胱癌の切除標本におけるゼラチナーゼ活性の前立腺局所での強さが、癌の進達度・異型度・転移の有無・生命予後などと密接な関係を持つことをいち早く報告している。実際に当手法を用いた研究を行っている施設は、日本及び世界でも少ない。本研究において骨転移を伴う前立腺癌患者の前立腺癌生検標本におけるゼラチナーゼ活性の測定が、骨転移へ及ぼす影響を検討する。また、前立腺組織中のゼラチナーゼ活性と血中 MMP-2・MMP-9 濃度と関連があるかを検討し、前立腺癌に対する治療後の再発予測マーカーとして MMP が有用であるかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1)FIZ を用いた前立腺癌組織（骨転移症例・非骨転移症例）と前立腺非癌症例における局所ゼラチナーゼ活性の測定・定量化・局在の同定および再発・転移の有無、生存率など種々の予後因子との解析を施行する。前立腺生検にて採取した前立腺凍結組織を 4 μm 厚に薄切し、7%ゼラチンコーティングしたプレパラート上で、incubation した後、局所におけるゼラチナーゼ活性の強度を評価する。また、MMP 阻害剤であるフェナントロリン含有 7%ゼラチンコーティングしたプレパラート上に前立腺凍結組織を 4 μm 厚に薄切し、incubation した後、MMP 活性が抑制されるか検討する。また、zymogram にて前立腺凍結組織における MMP-2・MMP-9 の活性、蛋白レベルでの発現を評価し、FIZ におけるゼラチナーゼ活性が主に MMP-2・MMP-9 によるものであるかどうか検証する。FIZ における最大の利点であるゼラチナーゼ活性に対する局在の同定には、同凍結組織に

対して MMP-2・MMP-9 の免疫組織化学を施行し比較検討する。

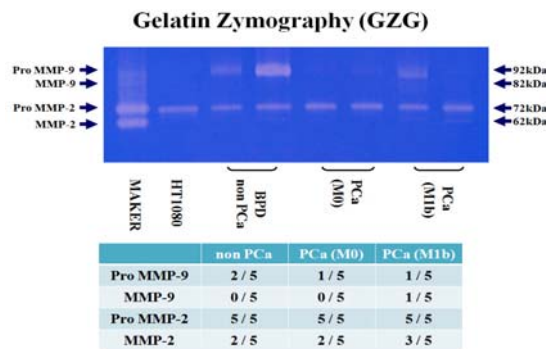
(2)前立腺癌局所ゼラチナーゼ活性と血中ゼラチナーゼ濃度の解析

MMP 活性測定システムを使用し、治療前血清 MMP-2・MMP-9 濃度を測定し、前立腺癌組織における MMP-2・MMP-9 活性強度と相関するかを検討する。また、各種血清 MMP 濃度と前立腺癌症例における再発・転移の有無、生存率など種々の予後因子との相関を評価する。

4. 研究成果

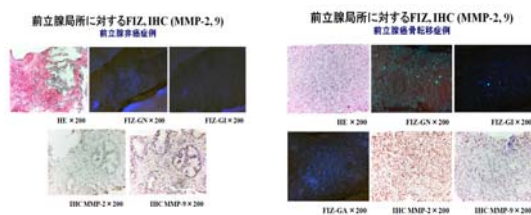
前立腺癌骨転移巣に対し、MMP-2 および MMP-9 の免疫組織化学の結果、骨転移巣では MMP-2・MMP-9 何れも強い染色認めた。FIZ・zymography・免疫組織化学の結果、前立腺局所でのゼラチナーゼ活性は、MMP-2 が強く関与していることが示された(図2)。前立腺癌骨転移症例では、非骨転移症例と比較して、前立腺局所において MMP-2 の強い活性を認めた(図3,4)。

(図2)



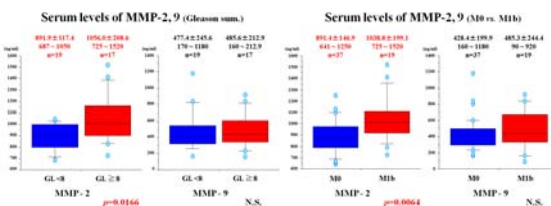
(図3)

(図4)



血清 MMP-2 値は、癌の悪性度と高い症例では有意に高値であった(図4)。骨転移症例では非骨転移症例と比較して有意に高値であり、骨転移の広がりとも相関を認めた(図5,6)。一方、MMP-9 に関しては、zymography・免疫組織化学・血清値とも有意差を認めなかった。(図5)

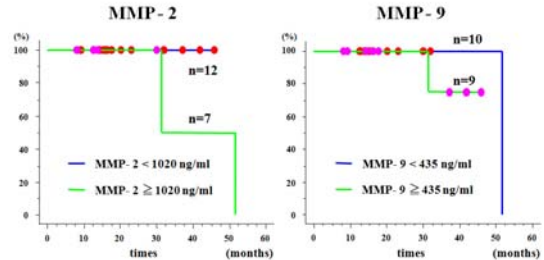
(図6)



骨転移症例には血清 MMP-2 値高値群では予後不良である事が示唆された(図7)。

(図7)

Cause-specific survival curves in M1b prostate cancer patients with serum MMP-2 and MMP-9



以上より、前立腺癌の骨転移には MMP-2 が強く関与しており、前立腺局所における MMP-2 の活性ならびに血清 MMP-2 値は、前立腺癌骨転移に対するバイオマーカーとして有用であることが示唆された。現在、本研究に対する英文論文を作成中であり、近日投稿予定である。

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6件)

- ① Suzuki H, Kamiya N, et al. Bone and Men's Health. Bisphosphonate therapy for prostate cancer. Clin Calcium, 査読なし, 20, 2010, 258-266.
- ② Kamiya N, Suzuki H, et al. Implications of Serum Bone Turnover Markers in Prostate Cancer Patients With Bone Metastasis. Urology, 査読あり, 2010, In press
- ③ Komaru A, Kamiya N, et al. Implications of Body Mass Index in Japanese Patients with Prostate Cancer Who Had Undergone Radical Prostatectomy. Jpn J Clin Oncol, 査読あり, 2010, Epub ahead of print
- ④ Imamoto T, Suzuki H, et al(11人中8番目). Association between serum sex hormone levels and prostate cancer: effect of prostate cancer on serum testosterone levels. Future Oncol, 査読あり, 5, 2009, 1005-1013.
- ⑤ Imamoto T, Suzuki H, et al(10人中7番目). External Validation of a Nomogram Predicting the Probability of Prostate Cancer Gleason Sum Upgrading Between Biopsy and Radical Prostatectomy Pathology Among Japanese Patients. Urology, 査読あり, 2009, Epub ahead of print

- ⑥Utsumi T, Kawamura K, et al(11人中4番  
目). External validation and  
head-to-head comparison of Japanese and  
Western prostate biopsy nomograms using  
Japanese data sets. Int J Urol, 16, 2009,  
416-419.

〔学会発表〕(計6件)

- ① 神谷直人、鏡視下副腎摘出術を施行した  
副腎褐色細胞腫患者におけるBMIの意  
義、第23回日本E&E学会、2009年11  
月13日、グランドプリンスホテル新高  
輪国際館パミール
- ② 神谷直人、前立腺癌に対する待機療法  
の検討、第74回日本泌尿器科学会東部  
総会、2009年10月29日、松本文化会館
- ③ 神谷直人、前立腺癌骨転移症例にお  
ける血清骨代謝マーカーの臨床学的意  
義、第47回日本癌治療学会学術集  
会、2009年10月24日、パシフィコ  
横浜
- ④ 神谷直人、下大静脈浸潤を呈した  
右副腎腫瘍の2例、第21回日本内分  
泌外科学会総会、2009年5月29日、  
岡山コンベンションセンター
- ⑤ 神谷直人、前立腺癌骨転移症例にお  
ける血清骨代謝マーカーの臨床学的  
意義、第97回日本泌尿器科学会総  
会、2009年4月18日、岡山コン  
ベンションセンター
- ⑥ 神谷直人、前立腺癌の骨転移にお  
ける基底膜分解酵素(MMPs)を介  
する分子機序の解明とオーダーメ  
イド治療への応用、第97回日本  
泌尿器科学会総会、2009年4月  
16日、岡山コンベンションセン  
ター

〔図書〕(計1件)

- ①鈴木啓悦、神谷直人、他、中外医学社、EBM  
泌尿器疾患の治療 2009、54-60

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神谷 直人 (KAMIYA NAOTO)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：40436431

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：