

機関番号：18001

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591849

研究課題名 (和文) RM2 が規定するハプトグロビンベータ鎖の前立腺癌細胞における機能的役割

研究課題名 (英文) Functional role of haptoglobin- β chain defined by RM2 in prostate cancer cells

研究代表者

齋藤 誠一 (SAITO SEIICHI)

琉球大学・医学研究科・教授

研究者番号：80235043

研究成果の概要 (和文)：

これまでにわれわれは、モノクローナル抗体RM2は悪性度を反映して前立腺癌細胞に対する反応が高くなること、そして、ハプトグロビンベータ鎖が前立腺癌に対するRM2の反応性を担っていることを示してきた。そこで、本研究では「RM2が規定するハプトグロビンベータ鎖はどのような機能的役割を果たしているか」を明らかにすることを目的とした。

まず、前立腺癌細胞をモノクローナル抗体RM2で処理したところ、足場依存性および非依存性増殖能の低下、アポトーシスの増加、運動能および浸潤能の低下が観察された。さらに、5-AzaやPBAにより前立腺癌細胞を処理したところ、RM2が規定するハプトグロビンベータ鎖の発現低下とともに、悪性形質に関連したシグナル伝達分子の発現レベルの変化が観察された。一方、がん抑制に関与するシグナル伝達分子はその発現が増加していた。これらの結果は、RM2が規定するハプトグロビンベータ鎖がシグナル伝達分子と密接に関わることにより、前立腺癌細胞の悪性形質発現に関与することを示唆している。以上より、RM2により処理した前立腺癌細胞のシグナル伝達分子を調べた結果、RM2が規定するハプトグロビンベータ鎖は、Ras→Akt pathway、Src & FAK pathwayのほか広くシグナル伝達分子の発現レベルに影響を及ぼしていることが示唆された。

以上の結果から、RM2が規定するハプトグロビンベータ鎖は上位にあるシグナル伝達分子へ関与している可能性が考えられた。RasやSTAT3の発現レベルが変化したことから、それらを制御しうる可能性のある分子として、EGFRが考えられた。LNCaP, PC3, DU145のcell lysateをRM2で免疫沈降し、抗EGFR抗体で検出したところ、3種類の前立腺癌細胞株すべてにおいて、バンドが検出された。さらにRM2により、これら3種類の細胞株を刺激すると、EGFRの細胞内への移動が増加することが示された。これらの結果から、RM2が規定するハプトグロビンベータ鎖は、EGFRとの相互作用を通して、Ras→Akt pathwayを刺激し、STAT3の発現を上昇させ、悪性形質発現に関与しているが、RM2により相互作用がブロックされることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We have demonstrated that reactivity of prostate cancer cells to monoclonal antibody RM2 reflected the malignant potential of prostate cancer cells and haptoglobin-beta chain in prostate cancer cells carries the reactivity to RM2. In this project, we aimed to elucidate the functional roles of haptoglobin-beta chain defined by RM2.

In the prostate cancer cell lines treated with monoclonal antibody RM2, decrease of anchorage-dependent and -independent proliferation, increased apoptosis and decreased motility and invasive capacity were observed. In the prostate cancer cell lines treated with 5-Aza or PBA, decreased expression of haptoglobin-beta chain defined by RM2 and changes of expression level of signal transduction molecules toward decreased malignant phenotype. These results indicate that haptoglobin-beta chain defined by RM2 is involved in the malignant phenotype by interaction with the signal transduction molecules. It was demonstrated that many signaling pathways such as Ras-Akt, Src-FAK etc. were affected by haptoglobin-beta chain defined by RM2.

From the results described above, it was assumed that haptoglobin-beta chain defined by RM2 might affect the upper level of signaling transduction. Changes in expression level of Ras and STAT3 suggest that EGFR is a candidate molecule. After immunoprecipitation of lysates of prostate cancer cells with RM2, the bands were detected by anti-EGFR antibody in all three lines, *i. e.*, LNCaP, PC3 and DU145. Further, treatment of cancer cells with RM2 induced intracytoplasmic movement of EGFR. These results indicate that haptoglobin-beta chain defined by RM2 stimulated Ras-Akt pathway and increased expression level of STAT3 through interaction with EGFR, leading to induction of the malignant phenotype, whereas interaction of haptoglobin-beta chain defined by RM2 with EGFR was blocked by monoclonal antibody RM2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：泌尿器科学

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：前立腺癌、ハプトグロビンベータ鎖、RM2

1. 研究開始当初の背景

これまでにわれわれは、モノクローナル抗体RM2は悪性度を反映して前立腺癌細胞に対する反応が高くなること、そして、RM2が規定するハプトグロビンベータ鎖は、前立腺癌に対するRM2の反応性のほとんどを担っていることを示してきた。

2. 研究の目的

RM2が規定するハプトグロビンベータ鎖の機能的役割を解析すること

3. 研究の方法

前立腺癌細胞株を用いたハプトグロビンベータ鎖の機能解析

4. 研究成果

平成20年度：前立腺癌細胞をモノクローナル抗体RM2で処理することにより、正常前立腺細胞PrEC、前立腺癌細胞株LNCaP, PC3, DU145におけるhaptoglobin-beta鎖のmRNA levelは、PC3 > DU 145 > LNCaP > PrECの順に低く、PrECはわずかな発現レベルであった。RM2が反応する

haptoglobin-beta鎖の蛋白レベルは、PC3 = DU 145 = LNCaPであり、PrECでは反応がみられなかった。5-AzaやPBAのepigenetic drugを用いて前立腺癌細胞株を処理すると、増殖能が低下するとともにhaptoglobin-beta鎖のmRNA levelが低下した。さらに、RM2で処理したところ、足場依存性および非依存性増殖能ともに低下した。この増殖能の低下の要因を調べるため、Annexin Vで観察したところ、3種類の癌細胞いずれも有意（9%-PC3, 16%-LNCaP, 17%-DU145、それぞれ増加）にアポトーシスが増加していた。Matrigel chamberを用いて浸潤能をみたところ、75% (PC3)-90% (DU145)の割合で浸潤能の低下が見られた。また、PC3を用いてWound healing motility assayにて運動能を見たところ、RM2により有意に運動能が抑制され、F-actinの発現が減少していた。シグナル伝達分子の発現変化をみるため、5-AzaやPBAにて処理したところ、RM2が規定するhaptoglobin-beta鎖が減少するとともに、FAK, RhoA, ERK-2, STAT-3レベルが

減少し、p38, C/EBPaレベルが増加していた。

以上、RM2が規定する haptoglobin-beta鎖は、シグナル伝達分子の変化とともに前立腺癌細胞株の悪性形質の発現に関連していることが示唆された。増殖能の低下、足場依存性および非依存性増殖能の低下、アポトーシスの低下、運動能および浸潤能の低下が観察された。さらに、5-AzaやPBAにより前立腺癌細胞を処理したところ、RM2が規定するハプトグロビンベータ鎖の発現低下とともに、悪性形質に関連したシグナル伝達分子は発現レベルの低下がみられ、がん抑制に関与するシグナル伝達分子はその発現が増加していた。これらの結果は、RM2が規定するハプトグロビンベータ鎖がシグナル伝達分子と密接に関わることにより、前立腺癌細胞の悪性形質発現に関与することを示唆している。

平成21年度：RM2により処理した前立腺癌細胞のシグナル伝達分子をある程度網羅的に調べた。その結果、まず注目すべきものとして、RasおよびAkt発現低下がPC3, DU145において観察された。その他、SrcおよびFAKの発現低下がLNCaP, PC3で認められた。また、LNCaP, PC3, DU145でBcl-2の発現レベルが低下し、STAT3の発現レベルも低下した。一方、がん抑制に関与するp16は発現レベルの増加が観察された。以上から、RM2が規定するハプトグロビンベータ鎖は、Ras→Akt pathway, Src & FAK pathwayのほか広くシグナル伝達分子の発現レベルに影響を及ぼしていることが示唆された。

平成22年度：以上の結果から、上位にあるレセプターへのRM2の関与が考えられたため、RM2が規定するハプトグロビンベータ鎖と相互作用する可能性のある分子について研究した。

RasやSTAT3の発現レベルが変化したことから、それらを制御しうる可能性のある分子として、EGFRが考えられた。LNCaP, PC3, DU145のcell lysateをRM2で免疫沈降し、抗EGFR抗体で検出したところ、3種類の前立腺癌細胞株すべてにおいて、バンドが検出された。すなわち、RM2が規定するハプトグロビンベータ鎖がEGFRと相互作用をしていることが示唆された。さらにRM2により、これら3種類の細胞

株を刺激すると、EGFRの細胞内への移動が増加することが示された。PC3, DU145におけるEGFRの細胞内への移動は、

RM2刺激後、5minでピークになるのに対して、LNCaPにおけるそれは30minでピークになるという違いが見られた。これらの結果から、RM2が規定するハプトグロビンベータ鎖は、EGFRとの相互作用を通して、Ras→Akt pathwayを刺激し、STAT3の発現を上昇させ、悪性形質発現に関与しているが、RM2により相互作用がブロックされることが示唆された。

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15件)

1. Matsumura E, Ashikari A, Saito S, et al. [A case of interstitial pneumonia during gemcitabine and cisplatin chemotherapy for locally advanced bladder cancer]. Hinyokika Kyo. 2011 Feb;57(2):81-5. Japanese. (査読・有)
2. Woottisin S, Hossain RZ, Saito S, et al. Effects of Orthosiphon grandiflorus, Hibiscus sabdariffa and Phyllanthus amarus extracts on risk factors for urinary calcium oxalate stones in rats. J Urol. 2011, 185(1):323-8. (査読・有)
3. Kawasaki Y, Ito A, Saito S, et al. Ganglioside DSGb5, preferred ligand for Siglec-7, inhibits NK cell cytotoxicity against renal cell carcinoma cells. Glycobiology 2010. 20:1373-1379. (査読・有)
4. Matsumura E, Tasaki S, Saito S, et al. [A case report of transurethral resection of eroding urethral mesh after a tension-free vaginal tape procedure]. Hinyokika Kyo. 2010 Nov;56(11):655-7. Japanese. (査読・有)
5. Matsumura E, Oshiro Y, Saito S, et al. [A case of complicated perioperative management of radical nephrectomy in a patient with a drug-eluting stent]. Hinyokika Kyo. 2010, 56(5): 265-8. Japanese. (査読・有)
6. 長谷川陽子、齋藤誠一、他6名：RM2を用いた前立腺癌画像診断法開発のための基

- 礎的研究. 西日本泌尿器科 2010, 72: 55-56. (査読・有)
7. 齋藤誠一、松村英理、他2名: 腎・泌尿器癌-基礎・臨床研究のアップデート III. 腎盂尿管癌 基礎研究: 腎盂尿管癌の発症・進展メカニズム 日本臨牀 2010, 68: 379-383. (査読・無)
8. Kimura T, Saito S, Ochiai A, et al. Targeting of bone-derived insulin-like growth factor-II by a human neutralizing antibody suppresses the growth of prostate cancer cells in a human bone environment. Clin Cancer Res. 2010 Jan 1;16(1):121-9. (査読・有)
9. Kadekawa K, Miyazato M, Saito S, et al. Renal cell carcinoma originating in a renal cyst in a 12-year-old girl. J Pediatr Surg. 2009 Dec;44(12):e5-7. (査読・有)
10. Yachantha C, Hossain RZ, Saito S, et al. Effect of potassium depletion on urinary stone risk factors in Wistar rats. Urol Res. 2009 Dec;37(6):311-6. (査読・有)
11. Namiki S, Litwin MS, Saito S, Arai Y. Association of lower urinary tract symptoms with sexual dysfunction: a cross-cultural study between Japanese and American men with localized prostate cancer. BJU Int. 2009 Oct;104(8):1071-6. (査読・有)
12. Kawamorita N, Saito S, Ishidoya S, Ito A, Saito H, Kato M, Arai Y. Radical prostatectomy for high-risk prostate cancer: biochemical outcome. Int J Urol. 2009 Sep;16(9):733-8. (査読・有)
13. Maeda H, Saito S, Ochiai A et al. Prostate-specific antigen enhances bioavailability of insulin-like growth factor by degrading insulin-like growth factor binding protein 5. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Apr 10;381(3):311-6. (査読・有)
14. Namiki S, Ishidoya S, Ito A, Saito S, Arai Y. Quality of life after radical prostatectomy in Japanese men: a 5-Year follow up study. Int J Urol. 2009 Jan; 16(1): 75-81. (査読・有)
15. Kaiho Y, Ito A, Ishidoya S, Saito S,

Arai Y. Nerves at the ventral prostatic capsule contribute to erectile function: initial electrophysiological assessment in humans. Eur Urol. 2009 Jan; 55(1): 148-54. (査読・有)

[学会発表] (計0件)

[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

齋藤 誠一 (SAITO SEIICHI)
 琉球大学・医学研究科・教授
 研究者番号: 80235043

(2) 研究分担者

伊藤 明宏 (ITO AKIHIRO)
 東北大学・病院・講師
 研究者番号: 70344661

(3) 連携研究者

()

研究者番号: