

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592046

研究課題名（和文） CAST 法による前立腺癌の分泌・膜蛋白検索と診断・治療への応用

研究課題名（英文） Identification and translational research of transmembrane and secretory proteins in prostate cancer

研究代表者 松原 昭郎 (MATSUBARA AKIO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10239064

研究成果の概要（和文）：前立腺癌細胞株とヒト正常前立腺組織から CAST ライブラリーのスクリーニングにより、前立腺癌に特異的な膜貫通タンパクもしくは分泌タンパクをコードする候補遺伝子群を同定、そのうち CDON と NBL1 は前立腺癌において正常前立腺組織に比較して特に高発現が認められた。これらの蛋白は前立腺癌の標的分子となりうる可能性が示唆され、DSC2 については尿路上皮癌の扁平上皮癌化のマーカーであることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We identified candidate genes that encode transmembrane proteins present in PCa from the screening of Escherichia coli ampicillin secretion trap (CAST) libraries. Further investigations revealed that CDON and NBL1 were expressed much more highly in PCa, suggesting that these molecules have a high potential as a therapeutic target for PCa. Furthermore, we conclude that DSC2 is a useful immunohistochemical marker for separation of squamous differentiation of urothelial carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：CAST 法，分泌蛋白，前立腺癌，膜蛋白

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の診断・治療標的の候補を見いだす試みは過去にいくつかなされてきたものの、い

れの手法においても限界があることが知られており、あらたな手法による前立腺癌の key molecule 検索が期待されてきた。CAST

(Escherichia coli ampicillin secretion trap) 法はシグナル配列や膜貫通ドメイン配列の同定法として開発されており、蛋白の網羅的解析における迅速性、効率性、低コスト性はFergusonらによって実証されている。このように CAST 法を用いることによって、ヒト前立腺癌の新たな癌特異的蛋白の同定が可能となり、泌尿器癌の CAST 法を用いた体系的蛋白発現解析による診断・治療開発研究は国内外で全くなされておらず、本研究は、これまでにない新しい腫瘍マーカーならびに新しい治療法の開発につながると期待された。

2. 研究の目的

近年、我が国の前立腺癌罹患率および死亡率は急激に上昇しており、その対策が急務とされている。本研究は、最近開発された細胞表面膜蛋白および分泌蛋白を網羅的に効率良く同定する CAST 法を用いて、包括的に前立腺癌の癌特異的膜蛋白/分泌蛋白を同定し、新たな診断・治療標的の候補を見出す事を目的とする。本研究は新しい腫瘍マーカーの開発や再燃癌に対する新規治療法開発に発展するものと期待される。

3. 研究の方法

- 1) ヒト前立腺組織からの RNA 抽出と cDNA 合成、CAST library の作成
組織診断が確定した前立腺癌組織から AGPC(Trizol)法を用いて RNA を抽出する。抽出した RNA は変性アガロースゲル上で移動し、degrade していないことを確認の上、実験を進める。症例の血清 PSA 値、病期、グリーソングレードを参考に 3 症例の RNA を混合し、二組の RNA を用意する(PC A RNA、PC B RNA)。Poly A RNA に精製後、1 µg を用いて BamHI site を含むランダムプライマーで cDNA を合成、EcoRI site を適合した

cDNA を BamHI で消化する。

- 2) CAST library からアンピシリン耐性株のクローニング
1)で調整した cDNA を pCAST に ligation する。二組の pCAST library(PC A、PC B)でコンピタントセルをトランスフォームし、アンピシリン含有 LB 培地に接種する。
- 3) 耐性株から pCAST の抽出と塩基配列決定
コロニーをピックアップ後カナマイシン含有 1.5ml LB 液体培地で培養。プラスミドはスピナラムで精製後、βラクタマーゼ遺伝子内のプライマーを用いてシークエンスする。
- 4) 塩基配列の解析
得られた塩基配列はNCBI BLAST等でデータベース解析する。既知遺伝子についてはコードする蛋白の機能、細胞内局在、ドメイン情報を UniGene 等から収集し、これまでに前立腺癌のマーカーとしての報告の有無などをデータベース上で検索する。新規遺伝子の場合、PSORTII、SMART、SignalP などのデータベースを用いて、signal sequence と transmembrane domain を解析する。
- 5) RT-PCR
前述までの過程で得られた分泌蛋白・膜蛋白で前立腺癌マーカーあるいは治療標的の候補遺伝子については、200bp 以下の PCR 産物が得られるプライマーをデザインする。10 症例の前立腺癌組織、正常組織を用意し(可能であれば同一個体の癌・正常組織対を用意する)、定量 PCR を行う。装置は当施設の DNA Engine Opticon 2 System を使用予定であり、新規に用意する必要はない。PCR 反応は SYBR Green quantitative PCR mix を用いる予定である。ハウスキーピング遺伝子として β アクチン、GDPDH、rRNA など複数の遺伝子を試

みて、前立腺組織に適したものを内因性コントロールとする。測定は3回繰り返し、 $\Delta \Delta Ct$ を求める。得られた結果により、癌組織の25%まで高発現する遺伝子、25~50%まで高発現する遺伝子、50~75%まで高発現する遺伝子、75%以上において高発現が認められる遺伝子の4つのカテゴリーに分類する。また癌組織のポジティブコントロールとしてPSAを用い、感度、特異度を比較し、候補遺伝子のマーカーとしての評価を行う。

6) 免疫染色と抗体産生

前立腺癌で高発現が明らかとなった遺伝子で、既知遺伝子として研究が行われており、抗体が入手可能なもののうち、未だ前立腺癌で報告がないものについては、免疫染色を行い、組織中での蛋白量をPSAとコントロールとして比較する。抗体の入手が困難なものについては、データベースから得られる遺伝子配列、アミノ酸配列を基にペプチドを用いた抗体を作成する。

7) 血中での検出

候補遺伝子のうち、シグナル配列を有することが予測され、分泌蛋白と考えられ、Tissue distribution の分析結果から組織特異性が高いと考えられるものについては、血中での検出を試みる。

8) ヒト前立腺癌細胞株を用いた in vitro での増殖への関与

前立腺組織特異的に過剰発現する、分泌蛋白・膜蛋白はその増殖に関与している可能性が高いと考えられる。各遺伝子に対するsiRNAをデザインし、ノックダウンアッセイを行い、増殖への関与を検討する。組織特異性が高ければ高いほど、治療応用時、有害事象が低く抑えられることが期待される。In vitro の系で増殖抑制効果が得られた場合、

ヌードマウスを用いた xenograft で効果を確認する。

9) 他の癌腫での検討

いくつかの腫瘍マーカーや、治療標的は他の癌腫においても有用であることが多い。前立腺組織のCAST法で得られた、候補遺伝子について、他の泌尿器癌での発現の有無についてもRT-PCRを用いて検討を行う。

4. 研究成果

CAST法を用いることにより、前立腺癌に特異的な膜貫通タンパクもしくは分泌タンパクをコードする候補遺伝子群を同定した。平成21年度に同定した膜蛋白CDONは学会報告の後、Pathobiology 78:277-84, 2011に掲載された。平成22年度に同定した分泌蛋白NBL1は多くの学会で報告し、現在論文投稿中である。さらに平成23年度に同定した膜蛋白TMEM50Bは前立腺癌の進行とともに発現が減弱し、細胞株でsiRNAを用いた発現抑制で増殖と浸潤が増加することを確認し、学会報告を行った。さらにCAST法は特に膜蛋白質の同定に有効であり、前立腺癌のCAST法で同定した膜蛋白質を他の泌尿器癌(腎癌、膀胱癌)で発現解析をした結果、膜蛋白質DSC2は尿路上皮癌の扁平上皮への分化に特異的で診断マーカーとして有用であることを明らかにし、学会報告と論文作成(Histopathology 59: 710-721, 2011)を行った。腎癌では膜蛋白TSPAN8発現がstageとhistological gradeの進行と強い相関を示し、その発現は予後不良と相関することを示した。CAST法は新規膜蛋白・分泌蛋白の同定に非常に有効な方法であり、CAST法により多くの治療標的と診断マーカーが同定された。これらが臨床の現場で治療と診断の改善に繋がることを期待している。

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2 件)

1. Hayashi T, Ohara S, Teishima J, Matsubara A, Yasui W, Identification of transmembrane protein in prostate cancer by the *Escherichia coli* ampicillin secretion trap: expression of CDON is involved in tumor cell growth and invasion, *Pathobiology*, 査読有, 78, 2011, 277-284. DOI:10.1159/000329588

2. Hayashi T, Ohara S, Teishima J, Matsubara A, Yasui W, Desmocollin 2 is a new immunohistochemical marker indicative of squamous differentiation in urothelial carcinoma, *Histopathology*, 査読有, 59, 2011, 710-721, DOI:10.1111/j.1365-2559.2011.03988.x.

[学会発表] (計8 件)

1. Hayashi T, Ohara S, Teishima J, Matsubara A, Yasui W, Identification of transmembrane protein in prostate cancer by the *Escherichia coli* ampicillin secretion trap: expression of CDON is involved in tumor cell growth and invasion, The 2011 Annual Meeting of the American Urological Association, 15 May, 2011, Washington D.C. USA

2. Hayashi T, Ohara S, Teishima J, Matsubara A, Yasui W, DSC2 is a new immunohistochemical marker indicative of squamous cell carcinoma component in urinary bladder cancer and a value of prognostic factor, The 2011 Annual Meeting of the American Urological Association, 15 May, 2011, Washington D.C. USA

3. 林哲太郎, 大原慎也 亭島 淳, 松原昭郎,

安井 弥, 扁平上皮癌成分を伴う膀胱癌の新規診断マーカーDSC2 とその予後因子としての意義, 第 99 回日本泌尿器科学会総会, 2011. 4. 24, 名古屋市

4. 林哲太郎, 大原慎也, 松原昭郎, 安井 弥, CAST法を用いた前立腺癌の新規膜蛋白・分泌蛋白の解析:前立腺癌における TMEM50B の発現の意義, 第 100 回日本病理学会総会, 2011. 4. 29, 横浜市

5. 林哲太郎, 大原慎也, 松原昭郎, 安井 弥, 腎細胞癌における TSPAN8 の発現の意義, 第 100 回日本病理学会総会, 2011. 4. 30, 横浜市

6. 林哲太郎, 大原慎也, 亭島 淳, 安井 弥, 松原昭郎, CAST法を用いた前立腺癌の分泌蛋白の検討: NBL 1 の発現は前立腺癌に特異的である, 2011. 10. 3, 名古屋市

7. Hayashi T, Ohara S, Teishima J, Matsubara A, Yasui W, The search for novel genes encoding secreted and transmembrane proteins in prostate cancer by the *Escherichia coli* ampicillin secretion trap, 第 63 回日本泌尿器科学西日本総会, 2011. 11. 12, 久留米市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 昭郎 (Matsubara Akio)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 10239064

(2) 研究分担者

安井 弥 (Yasui Wataru)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 40191118

亭島 淳 (Teishima Jun)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：20397962

井上 省吾 (Inoue Shogo)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：90457177

林 哲太郎 (Hayashi Tetsutaro)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60612835