

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 25 年 4 月 17 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21791483

研究課題名（和文） 前立腺癌の神経周囲浸潤の責任分子の同定

研究課題名（英文） Identification of perineural invasion inducing factors in prostate cancer

研究代表者

岡本 亜希子（OKAMOTO AKIKO）

弘前大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：60436037

研究成果の概要（和文）：前立腺癌は神経に沿って浸潤すると考えられており、神経浸潤（perineural invasion：PNI）を伴う前立腺癌は再発しやすいが、PNIに関する分子機構は解明されていない。本研究では、PNI に関与する神経細胞側の責任分子を同定することを目的として、神経細胞によって分泌される因子の解析と神経細胞表面分子の解析を行った。結果：(1) ラット由来神経細胞株 PC12 と前立腺癌細胞株 DU145 の共培養にて遊走能、浸潤能の亢進が認められた。(2) 脳由来神経細胞の初代培養：Human Neuron が高濃度に分泌するサイトカインとして SDF-1 が同定された。(3) DU145 cDNA ライブラリーを作成し、Phage display 法による Human Neuron の細胞表面結合分子のスクリーニングを行った結果、Integrin- α 6 が同定された。今後更なる解析が必要である。

研究成果の概要（英文）：Perineural invasion (PNI) has been demonstrated to be one of the major mechanisms of extension of prostate cancer from the prostatic parenchyma to the periprostatic soft tissue. Patients with PNI have higher risk of recurrent disease. However, the mechanisms of PNI are not well known. Here, we investigated PNI inducing factors and surface molecules on human neuron cells. Results: Motility and invasion activity of DU145 (Prostate cancer cell line) were increased when co-cultured with neuroendocrine cell line PC12 (pheochromocytoma of the rat adrenal medulla). SDF-1 was identified as cytokine from human primary neuron (HN) cells. Because prostate cancer expresses CXCR4, and CXCR4 is reported as a receptor of SDF-1, SDF-1 in neuron and CXCR4 in prostate cancer has potential to induce PNI in prostate cancer. Surface protein screening of HN cells using the DU145 cDNA phage display library, which allows displaying recombinant DU145 tumor proteins on the surface of T7 phage, showed integrin α 6 as a candidate of PNI inducing molecule. Further analyses are necessary to identify the PNI inducing factors in prostate cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	290,000	870,000	3,770,000

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：前立腺癌、神経浸潤、分子機構

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の進展形式には、**perineural invasion (PNI)**、血行性、リンパ管性の3つの経路が知られている。PNIは特に被膜外浸潤に関与する主要な要因とされている。前立腺癌のスクリーニングが一般化し、より早期の前立腺癌が発見され、治療の対象になる傾向が強くなっている現状では、前立腺癌をコントロールする上で局所進展・局所再発の**key event**であるPNIの分子メカニズムを解明することは臨床的にも大きな意義がある。前立腺癌細胞と神経細胞の接着は前立腺癌進展の**gate way**と考えられているものの、その分子機構は解明されていない。本研究によってPNIに関与する分子が同定されれば、前立腺癌の局所進展に関する重要な知見が得られる。当該分子を標的にする予後因子と治療法の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、PNIに関与する責任分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

当初、末梢神経由来のヒト Schwann 細胞 (ScienCell) での実験系を予定していたが、ドナー確保が難しく入手困難であったため、ラット由来の神経系細胞株 PC12 とヒト脳由来の初代培養 Human neuron (HN) を用いて実験を行った。前立腺癌細胞株として DU145 を用いた。

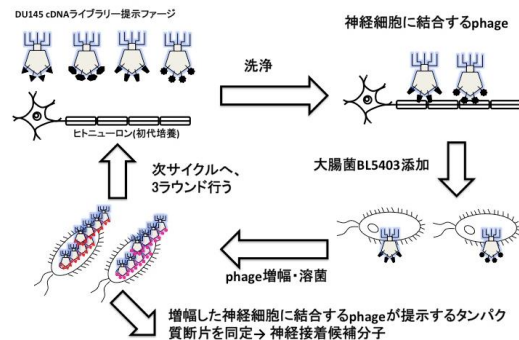
(1) 前立腺癌にて前立腺全摘除術を施行した51例のパラフィン標本を用いて、免疫染色にて前立腺癌の悪性度指標の1つである C2GnT1 の発現と神経浸潤(pn+)との関連について検討した。また、多変量解析にて pn+症例の前立腺癌術後の PSA 再発について検討した。

(2) 前立腺癌細胞と神経系細胞の共培養によるケモタキシス実験。トランスウエルチャンバーを用いて、前立腺癌細胞株 DU145 (5×10^4) を上層に、PC12 を下層に敷き、ケモタキシスアッセイとインベーションアッセイを施行。一定時間経過後の移動細胞数、浸潤細胞数をカウントした。

(3) 初代培養 HN 細胞を用いて、神経から放出されるサイトカインを測定した。細胞数は 1×10^6 /T25 flask とし FGF、VEGF、

HGF、TGFb、NGFb、SDF-1、EDF など主要な Growth factor を測定した。

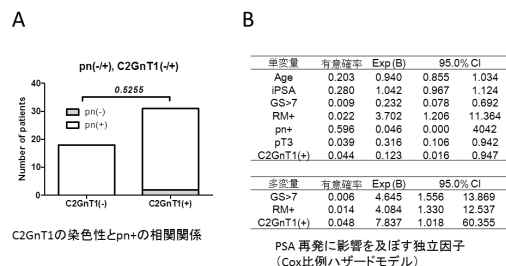
(4) Phage display 法による神経細胞結合分子のスクリーニング：神経細胞と前立腺癌細胞の接着分子を同定するため、DU145 cDNA ライブラリーの作成を行った。DU145 の mRNA を抽出し、ランダムプライマーで mRNA の全ての領域から逆転写し、種々の大きさの cDNA を合成した。得られた cDNA 断片を T7 ファージの外殻タンパク質の c 末端にクローニングすると、ファージの外殻に、クローニングされた DU145 細胞のタンパク質断片が提示される。このファージを初代培養 HN 細胞に付着させ、神経細胞に特異的に結合する DU145 由来の分子を特定した。



4. 研究成果

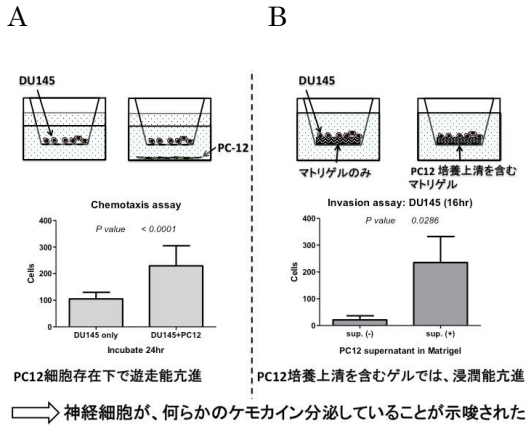
(1) 前立腺癌にて前立腺全摘除術を施行した51例のパラフィン標本を用いて C2GnT1 による免疫組織化学染色と pn+の相関関係を検討したが、C2GnT1 染色陽性と pn+に有意な相関関係は認められなかった (Fig.1A)。また、術後 PSA 再発との相関を Cox 比例ハザードモデルを用いて解析した結果、pn+は単変量解析では PSA 再発の説明因子として選択されたが、多変量解析では PSA 再発の説明因子として選択されなかった (Fig.1B)。

Fig.1



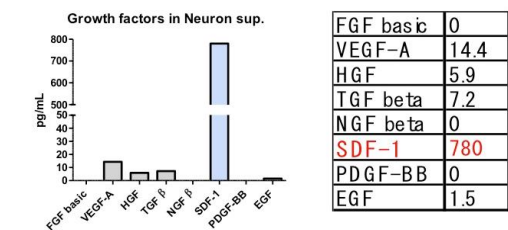
(2) PC12 と DU145 の共培養による遊走能実験、浸潤能実験では、遊走能、浸潤能ともに亢進し、神経細胞によるケモタキシスが示唆された (Fig.2A, B)。何らかの遊走因子の存在が考えられた。サイトカイン、成長因子等の因子を検討したが、ラット-ヒト間の異種細胞間の実験であるため、その解析はヒト脳由来の初代培養 HN で施行した。

Fig.2



(3) 初代培養 HN 細胞を用いて、神経から放出されるサイトカインを測定した結果、ヒトニューロンは SDF-1 (CXCL12) を多量に分泌することが明らかになった (Fig.3)。SDF-1 は、細胞遊走因子ケモカインとして知られ、好中球などの遊走に関与し、レセプターは CXCR4、CXCR7 が知られているが、神経浸潤している前立腺癌細胞は CXCR4 を発現していることが報告されている。(Sun Y.X. et al., 2003)

Fig.3



ヒトニューロンは、SDF-1 (CXCL12) が高値
 ・細胞遊走因子 chemokineとして知られ、好中球などの遊走に関与
 ・レセプターはCXCR4、CXCR7など

(4) DU145 細胞株の cDNA を Phage display 法を利用してヒトニューロンに接着する前立腺癌細胞側の候補分子の予備スクリーニングを行った (Fig.3)。その結果、有力候補分子としてラミニン結合性

Integrin $\alpha 6$ (CD49 antigen-like family member F) が同定された。この分子は、神経周囲浸潤している前立腺癌細胞において発現していることが既に報告されている (Sroka IC. J Cell Physiol. 224:283-288, 2010) が、神経細胞に接着している直接的な証拠は存在しない。各予備実験の結果から、Fig.4 のような仮説が想定された。

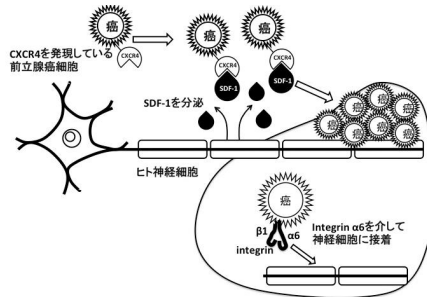


Fig.4

以上の結果をもとに、今後は以下のような検討を計画している。

- (1) 前立腺癌細胞株 cDNA ライブラリーを提示する Phage を利用した Phage display 法により前立腺癌細胞、神経細胞におけるリガンドとレセプターについて検索する。
- (2) 前立腺癌細胞株とヒト神経細胞 (初代培養あるいは、iPS 細胞より誘導) の共培養で発現が亢進する遺伝子のマイクロアレイ解析を行う。また共培養により分泌される各種ケモカインの測定を行う。
- (3) 前立腺全摘標本を用いた免疫組織化学的検討によって記タンパク質の局在、ケモカインの分泌と PNI に関する臨床的意義を明らかにする。
- (4) 責任分子の過剰発現、ノックダウン細胞を調製し、in vitro および in vivo PNI マウスモデルを用いて前立腺癌細胞の増殖とアポトーシスへの影響を調査する。また責任分子に対する抗体による Inhibition Assay により責任分子が前立腺癌細胞と神経細胞の接着に直接関与するかどうかを検討する。

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 11 件)

1. Hatakeyama S, Yamamoto H, Okamoto A, Imanishi K, Tokui N, Okamoto T, Suzuki Y, Sugiyama N, Imai A, Kudo S, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Kamimura N, Saitoh H, Funyu T,

- Ohyama C: Effect of an Oral Adsorbent, AST-120, on Dialysis Initiation and Survival in Patients with Chronic Kidney Disease. *Int. J Nephrol.* 査読有 Article ID376128, 1-7, 2012. doi:10.1155/2012/385274.
2. Hashimoto Y, Okamoto A, Imai A, Yoneyama T, Hatakeyama S, Yoneyama T, Koie T, Kaminura N, Ohyama C: Biochemical outcome of small-volume or insignificant prostatecancer treated with radical prostatectomy in Japanese population. *Int. J. Clin. Oncol.* 査読有 17:119–127, 2011 doi:10.1007/s10147-011-0267-6.
 3. Hashimoto Y, Imanishi K, Okamoto A, Sasaki A, Saitoh H, Wada R, Yamamoto H, Koie T, Ohyama C: An aggressive signet ring cell carcinoma of the prostate in a Japanese man. *Case Rep Oncol.* 査読有 4: 517–520, 2011 doi: 10.1159/000334081.
 4. Hatakeyama S, Toikawa T, Okamoto A, Yamamoto H, Imanishi K, Okamoto T, Tokui N, Suzuki Y, Sugiyama N, Imai A, Hashimoto Y, Kudo S, Yoneyama T, Koie T, Kamimura N, Saitoh H, Funyu T, Ohyama C: Efficacy of SMART Stent Placement for Salvage Angioplasty in Hemodialysis Patients with Recurrent Vascular Access Stenosis. *Int J Nephrol.* 査読有 Article ID464735, 1-6, 2011 doi: 10.4061/2011/464735.
 5. Hashimoto Y, Imanishi K, Tokui N, Okamoto T, Okamoto A, Hatakeyama S, Yoneyama T, Koie T, Kamimura N, Ohyama C: Carboplatin-gemcitabine combination chemotherapy upregulates AKR1B10 expression in bladder cancer. *Int J Clin Oncol.* 査読有 18: 177-182, 2011. doi: 10.1007/s10147-011-0363-7.
 6. Hatakeyama S, Kyan A, Yamamoto H, Okamoto A, Sugiyama N, Suzuki Y, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Yamada S, Saito H, Arai Y, Fukuda M, Ohyama C: Core 2 N-acetylglucosaminyltransferase-1 (C2GnT-1) expression induces aggressive potential of testicular germ cell tumor. *Int J Cancer.* 査読有 127:1052–1059, 2010. doi: 10.1002/ijc.25117.
 7. Sutoh M, Hashimoto Y, Yoneyama T, Yamamoto H, Hatakeyama S, Koie T, Okamoto A, Yamaya K, Saitoh H, Funyu T, Nakamura T, Sato T, Ohyama C, Tsuboi S: Invadopodia formation by bladder tumor cells. *Oncology Research.* 査読有 19:85–92, 2010
 8. 橋本安弘, 百瀬昭志, 岡本亜希子, 山本勇人, 畠山真吾, 岩瀬郁哉, 米山高弘, 古家琢也, 神村典孝, 大山 力:前立腺全摘除術標本における腫瘍体積とPSA再発との関連について. *泌尿器科紀要* 査読有 56:91–94, 2010
 9. Okamoto A, Yamamoto H, Imai A, Hatakeyama S, Iwabuchi I, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Kamimura N, Mori K, Yamaya K, Ohyama C: Protein profiling of post-prostatic massage urine specimens by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to discriminate between prostate cancer and benign lesions. *ONCOLOGY REPORTS.* 査読有 21:73–79. 2009
- [学会発表] (計 34 件)
1. Yoneyama To, Tobisawa Y, Mori K, Hatakeyama S, Yamamoto H, Okamoto T, Okamoto A, Ishimura H, Yoneyama Ta, Koie T, Kamimura N, Ohyama C : Detection of prostate cancer associated α 2,3 sialyated free PSA in serum is more higher specificity than conventional PSA test. EAU (European Association of Urology) 2013 平成 25 年 3 月 15-19 日 ミラノ、イタリア
 2. Yamamoto H, Hatakeyama S, Sugiyama N, Suzuki Y, Okamoto A, Imai A, Yoneyama Ta, Hashimoto Y, Koie T, Nigawara T, Terui K, Sakihara S, OhyamaC : Anti-hypertensive effect of laparoscopic adrenalectomy (LA) for the patients with primary aldosteronism (PA) is limited despite of the accurate determination of responsible lesion by adrenal venous sampling (AVS). EAU (European Association of Urology) 2013 平成 25 年 3 月 15-19 日 ミラノ、イタリア
 3. Yoneyama Ta, Hagiwara K, Oikawa M, Suzuki Y, Sugiyama N, Tobisawa Y, Yoneyama To, Okamoto A, Yamamoto H, Imai A, Hatakeyama S, Mori K, Hashimoto Y, Koie T, Ohyama C : Sequential chemotherapy with Gemcitabine plus Carboplatin followed by additional Docetaxel for aged patients with advanced upper-tract urothelial cancer. EAU (European Association of Urology)

- 2013 平成 25 年 3 月 15-19 日 ミラノ、アタリア
4. Yoneyama Ta, Hagiwara K, Oikawa M, Suzuki Y, Sugiyama N, Tobisawa Y, Yoneyama To, Okamoto A, Yamamoto H, Imai A, Hatakeyama S, Mori K, Hashimoto Y, Koie T, Ohyama C : Sequential chemotherapy with Gemcitabine + Carboplatin followed by additional Docetaxel for aged patients with advanced bladder cancer. EAU (European Association of Urology) 2013 平成 25 年 3 月 15-19 日 ミラノ、イタリア
 5. 畠山真吾, 岡本亜希子, 山本勇人, 今井篤, 米山高弘, 古家琢也, 神村典孝, 大山 力 : RALP と同じポートポジションでのロボット支援腹腔鏡下膀胱全摘除術 (RALC) 第 26 回日本泌尿器内視鏡学会総会 平成 24 年 11 月 24 日 仙台市(仙台国際センター)
 6. 古家琢也, 岡本亜希子, 山本勇人, 畠山真吾, 米山高弘, 橋本安弘, 大山 力 : ロボット支援腹腔鏡下根治的前立腺全摘除術初期 20 例の成績 第 26 回日本泌尿器内視鏡学会総会 平成 24 年 11 月 24 日 仙台市(仙台国際センター)
 7. Yoneyama Tohru, Tobisawa Y, Mori K, Hatakeyama S, Yamamoto H, Okamoto A, Ishimura F, Yoneyama Takahiro, Koie T, Kamimura N, Ohyama C : Detection of prostate cancer-associated N-glycan on free PSA by Luminex bead-based immunoassay : A novel prostate cancer screening method with higher specificity than conventional PSA test. Glycobiology Meeting 2012 平成 24 年 11 月 11-14 日 サンディエゴ、アメリカ
 8. 古家琢也, 萩原和久, 成田琢磨, 及川真亮, 鈴木裕一朗, 杉山尚樹, 米山 徹, 飛澤悠葵, 盛 和行, 岡本亜希子, 山本勇人, 今井 篤, 畠山真吾, 米山高弘, 橋本安弘, 大山 力 : 当科におけるロボット前立腺全摘除術の成績. 第 37 回青森県泌尿器科研究会 平成 24 年 11 月 10 日 青森市 (青森グランドホテル)
 9. 古家琢也, 三塚浩二, 成田伸太郎, 米山高弘, 川村貞文, 岡本亜希子, 山本勇人, 今井 篤, 畠山真吾, 橋本安弘, 柝木達夫, 羽瀧友則, 荒井陽一, 大山 力 : ハイリスク前立腺癌に対する LHRH+エストラムスチンの有用性-プロペンシテイスコア解析 第 50 回 日本癌治療学会学術集会 平成 24 年 10 月 25-27 日 横浜市 (パシフィコ横浜)
 10. 岡本亜希子, 畠山真吾, 米山美穂子, 米山 徹, 村澤洋美, 岩村大径, 飛澤悠葵, 山本勇人, 米山高弘, 橋本安弘, 古家琢也, 神村典孝, 大山 力 : 前立腺癌の遊走能と湿潤脳における神経細胞の役割について. 第 77 回日本泌尿器科学会東部総会平成 24 年 10 月 17-19 日 文京区 (東京ドームホテル)
 11. 米山高弘, 佐藤天童, 三上穰太郎, 福士謙, 飛澤悠葵, 米山 徹, 岡本亜希子, 山本勇人, 今井 篤, 畠山真吾, 古家琢也, 神村典孝, 大山 力 : 高リスク前立腺癌に対するネオアジュバント内分泌化学療法後のロボット支援前立腺全摘除術の経験. 第 77 回日本泌尿器科学会東部総会 平成 24 年 10 月 17-19 日 文京区 (東京ドームホテル)
 12. 今井 篤, 藤田尚紀, 福士 謙, 三上穰太郎, 佐藤天童, 村澤洋美, 山本勇人, 岡本亜希子, 畠山真吾, 米山高弘, 古家琢也, 神村典孝, 大山 力 : 前立腺癌に対する小線源療法後の下部尿路症状に対する $\alpha 1$ ブロッカーの効果. 第 77 回日本泌尿器科学会東部総会 平成 24 年 10 月 17-19 日 文京区 (東京ドームホテル)
 13. 山本勇人, 岩村大径, 小島由太, 佐藤天童, 村澤洋美, 岡本亜希子, 今井 篤, 畠山真吾, 米山高弘, 古家琢也, 神村典孝, 大山 力 : 前立腺全摘除術後の下部尿路症状の経時的変化に関する検討 : 第 77 回日本泌尿器科学会東部総会 平成 24 年 10 月 17-19 日 文京区 (東京ドームホテル)
 14. Koie T, Okamoto A, Yamamoto H, Tobisawa Y, Yoneyama Tohru, Mori K, Hatakeyama S, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Y, Kamimura N, Ohyama C : Safty and Efficacy of Neoadjuvant Gemcitabine plus Carboplatin Followed by Immediate Cystectomy in Patients with Muscle-Invasive Bladder Cancer. 第 32 回国際泌尿器科学会総会 (SIU) 平成 24 年 9 月 30 日-10 月 4 日 福岡市 (福岡国際会議場)
 15. Hatakeyama S, Yamamoto H, Murasawa H, Okamoto A, Imai A, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Y, Koie T, Kamimura N, Ohyama C : Type of androgen deprivation therapy affects metabolic condition and adipose tissue distribution. 第 32 回国際泌尿器科学会総会 (SIU) 平成 24 年 9 月 30 日-10 月 4 日 福岡市 (福岡国際会議場)

16. 福士 謙, 岩村大径, 小島由太, 佐藤天童, 山本勇人, 岡本亜希子, 今井 篤, 畠山真吾, 石村大史, 米山高弘, 古家琢也, 神村孝典, 大山 力: 前立腺癌骨転移との鑑別に難渋した骨パジェット病の 1 例. 第 246 回日本泌尿器科学会東北地方会平成 24 年 9 月 29 日 福島市 (コラッセふくしま)
17. Koie T, Okamoto A, Yamamoto H, Tobisawa Y, Yoneyama T, Mori K, Hatakeyama S, Yoneyama T, Hashimoto Y, Kamimura N, Ohyama C : Neoadjuvant gemcitabine plus carboplatin followed by immediate with muscle-invasive bladder cancer: A propensity score analysis. 第 107 回米国泌尿器科学会 (AUA) ; アトランタ, USA, 19-13 May 2012.
18. Hatakeyama S, Kyan A, Yamamoto H, Okamoto A, Sugiyama N, Suzuki Y, Imanishi K, Okamoto T, Kudo S, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Kamimura N, Ohyama C: Core 2 N-acetylglucosaminyltransferase-1 (C2GnT-1) expression induces aggressive potential of testicular germ cell tumor. 25th Annual EAU Congress Barcelona, Spain, 16-20, April 2010.
19. Hatakeyama S., Lee SH., Yamamoto H, Okamoto A, Okamoto T, Imanishi K, Suzuki Y, Sugiyama N, Kudo S, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Kamimura N, Ohyama C, Fukuda M: Core3 O-Glycan Synthase Suppresses Tumor Formation and Metastasis of Prostate Carcinoma PC3 cells through Down-regulation of Integrin Complex. 25th Annual EAU Congress Barcelona, Spain, 16-20, April 2010.

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 亜希子 (OKAMOTO AKIKO)
弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号 : 60436037

(2)研究分担者 : なし

()

研究者番号 :

(3)連携研究者 : なし

()

研究者番号 :