

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5月31日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791501

研究課題名（和文） 前立腺癌高発現タンパク質に対する新規分子標的治療の開発

研究課題名（英文） Development of novel molecular target therapy using high expression protein in prostate cancer.

研究代表者 鎌田 裕子（KAMATA YUKO）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60433984

研究成果の概要（和文）：

本研究では、前立腺癌に対する新たな治療法の開発をめざし、新規前立腺癌高発現タンパク質が新たな分子標的となるかどうかを検討することを目的とした。今回検討した3つの候補のなかでは、前立腺癌特異性、前立腺癌細胞の増殖抑制効果から、Minichromosome maintenance complex component 5(MCM5)が最も有望な標的分子であることが明らかとなった。さらに新たに癌特異性の高いペプチドワクチンの候補を発見した。今後、これらの解析を進め、より抗腫瘍効果が高い治療法の開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：

To development novel molecular target therapy for prostate cancer, we evaluated prostate cancer specificity and tumor growth suppression effect of three candidate protein, which expressed higher in prostate cancer compared with adjacent non-cancerous area. It was suggest that Minichromosome maintenance complex component 5 was the most promising target. Moreover, another novel candidate of peptide vaccine was identified with analysis of mass spectrometry in prostate cancer cell lines. They might be a novel molecular target of prostate cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：腫瘍学、分子標的薬、ペプチドワクチン

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、欧米では罹患率、致死率とも非常に高い悪性腫瘍である。本邦においても高齢化や生活様式、食生活の欧米化に伴い急速に増加しており、新たな治療法の開発は急務である。

近年、癌の分子生物学的研究の発展により、癌の増殖、進展に重要な機能を持つ特定の分子を標的にした分子標的薬が開発され、大きな成果を挙げている。しかし、これらの標的分子は、癌細胞以外の細胞でも発現しているものも多く、より癌特異性の高い標的分子の発見が必要とされている。

分子標的薬には、低分子化合物を中心とした様々なものが考えられているが、その1つとして、最近、nmサイズの微細な粒子（ナノ粒子）が開発されている。これは、磁性をもつものや蛍光を発するものなどいろいろな特性を持つ粒子で、複数の抗体や薬剤を結合させることも可能であり、臨床応用が期待されている。

また、癌細胞が特異的に発現するタンパク質を抗原とした宿主の免疫の賦活化を目的としたペプチドワクチン療法も新たな分子標的治療として注目を浴びている。

我々は、SND1は62例中60例（97%）と前立腺組織で高頻度に発現し、また、癌部で非癌部と比べて高発現していること、さらに、SND1の発現を抑制すると前立腺癌細胞の増殖が抑制されることを報告した（Kuruma H. *et al.* Am J Pathol. 2009;174:2044）。また、Minichromosome maintenance complex component 5（MCM5）や Glucosidase, alpha; neutral AB(GANAB)も前立腺癌で高発現することがわかってきた。このような癌で高発現するタンパク質は、前立腺癌特異的な分子標的治療の新たなターゲットとなる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、前立腺癌高発現タンパク質である SND1、MCM5、GANAB を抑制する siRNA や miRNA 発現プラスミド、それぞれの遺伝子に対する抗体をナノ粒子に結合させ、その抗腫瘍効果を判定することにより前立腺癌の新たな分子標的薬となりうるかどうかを検討することを第一の目的とする。また、SND1、MCM5、GANAB に対するペプチドワクチンを作製し、その抗腫瘍効果を判定し、新たなペプチドワクチンを開発することを第二の目的とする。さらに、これらの結果から、どの分子が前立腺癌の分子標的として最も有効であるかを明らかにし、最終的にはこのような新規治療の臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

SND1、MCM5、GANAB の mRNA 発現は前立腺癌培養細胞（LNCaP、PC3、DU145）から抽出した RNA、正常組織由来の RNA（Stomach: Human Stomach Total RNA、他: Human Total RNA Master Panel II、Clontech）を用いて行った。cDNA を合成後、リアルタイム PCR にて各遺伝子および内部標準遺伝子として 18S ribosomal RNA の発現を測定した。各遺伝子の発現は、18S ribosomal RNA の発現で補正したものを評価した。

前立腺癌細胞の HLA に結合するペプチドの探索は、LNCaP 細胞と札幌医科大学病理学教室鳥越俊彦先生、札幌医科大学泌尿器科田中先生より分与していただいた LNCaP 細胞に HLA-A*2402 を発現させた細胞（HLA-A24）を用いて行った。細胞を回収後、クエン酸リン酸 Buffer で HLA に結合するペプチドを回収し、質量分析計によりペプチドを同定した。

このペプチドが由来するタンパク質の mRNA 発現を各種癌細胞（前立腺癌細胞: PC3、LNCaP、DU145、膀胱癌細胞: T24、5637、TCCSUP、膵臓癌細胞: BxPC-3、MIA Paca-2、卵巣癌細胞: SKOV-3、Hac-2、OV-1063（東京慈恵会医科大学産婦人科矢内原臨先生より分与）、JHOC-5、JHOC-9、子宮内膜癌細胞: Ishikawa（東京慈恵会医科大学産婦人科佐々木先生より分与）、乳癌細胞: MCF7、BT-20 から抽出した RNA と正常組織由来の RNA（Stomach: Human Stomach Total RNA、他: Human Total RNA Master Panel II、Clontech、Bladder: Firstchoicehuman bladder total RNA、Ambion、Ovary、Breast、Pancreas: MVP total RNA、Agilent technologies）を用いて行った。cDNA を合成後、リアルタイム PCR にて各遺伝子および内部標準遺伝子として 18S ribosomal RNA の発現を測定し、比較 Ct 法により PC3 の発現を 1 としたときのそれぞれの発現を評価した。

4. 研究成果

本研究では、SND1、MCM5、GANAB といった前立腺癌高発現分子が新規分子標的となるかどうかを明らかにすることを目的としている。そこで、これらの分子の mRNA 発現を前立腺癌細胞株ならびに様々な正常組織でのこれらの分子の mRNA 発現を調べ、その疾患特異性を解析した。

3 つの候補タンパク質とも前立腺癌細胞で高発現を認めた（図 1）。SND1 の前立腺癌細胞での平均は、0.90 で、正常組織では 0.25 であった。正常組織での発現は、特に前立腺や小脳、精巣などでみられた（図 1、a）。MCM5

発現の前立腺癌細胞での平均は、0.87 で正常組織では 0.1 であった。正常組織での発現は、前立腺では低いものの、精巣や胸腺では発現を認めた (図 1、b)。GANAB 発現の前立腺癌細胞での平均は、0.93 で正常組織では 0.2 であった。正常組織では、前立腺や精巣、腎臓、甲状腺で発現を認めた (図 1、c)。3 つの候補タンパク質のなかでは、正常組織での発現は MCM5 が最も低く、分子標的として有用と考えられた。精巣ではヒト白血球型抗原 (HLA) クラス I 分子の発現がないことが知られており、ペプチドワクチン療法においては、標的分子が精巣で発現していても標的とはならないため、細胞は傷害されないと考えられる。そのため、MCM5 は胸腺での発現は認められるもののペプチドワクチンの標的分子としても有用な可能性が高いと考えられた。

次に、これらの 3 つのタンパク質を抑制するために、SND1、MCM5、GANAB に対する miRNA 発現プラスミドを作製し、LNCaP 細胞でそのノックダウン効果をリアルタイム PCR で確認した。SND1、MCM5 では mRNA 発現は 50% 以下に抑えられた。このときの細胞増殖抑制効果を検討したところ、SND1 ではコントロールと比べて増殖抑制効果は得られなかったが、MCM5 ではコントロールと比べ約 20% の増殖が抑制された。MCM5 を分子標的とすることにより、前立腺癌の増殖を抑制する可能性があると考えられた。

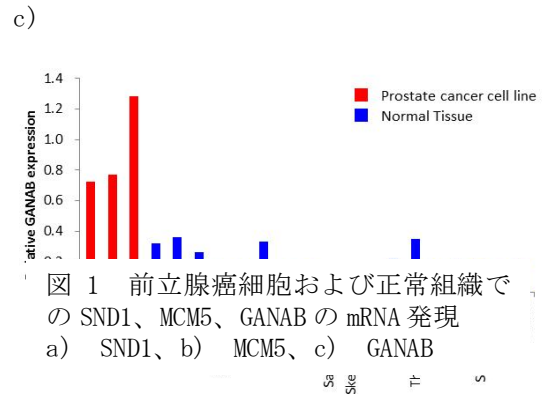
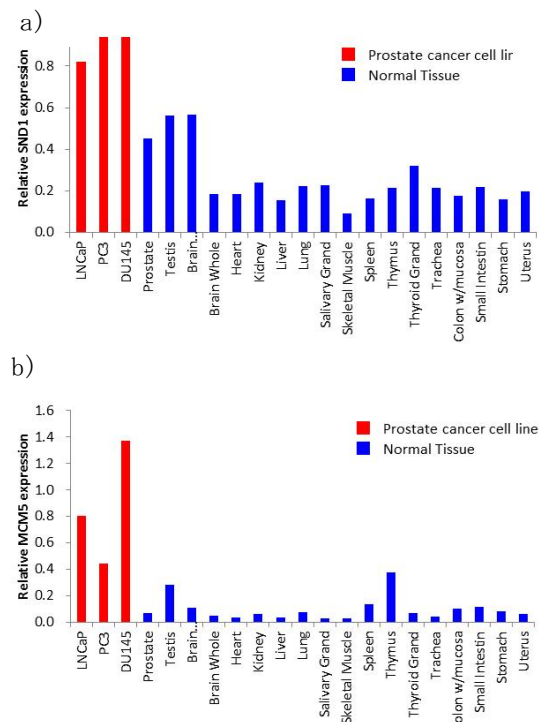


図 2 前立腺癌細胞および正常組織での新規ペプチドワクチン候補タンパク質の mRNA 発現

たが、その他の臓器での発現は、非常に弱かった。さらに、他の組織由来の癌細胞での発現を検討したところ、膀胱癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮内膜癌由来の癌細胞でも、発現の多少はあるものの発現が認められ、前立腺癌特異的な分子標的というよりは、様々な癌での分子標的となる可能性が示された。

本研究では、新規前立腺癌高発現タンパク質である SND1、MCM5、GANAB タンパク質の正常組織内での発現を検討し、MCM5 が最も特異性が高く、分子標的として有効であることが示唆された。また、この MCM5 の発現を前立腺癌細胞で抑制することにより、癌細胞の増殖も抑制される傾向が認められたことから、MCM5 は前立腺癌の新たな分子標的として有用な可能性があると考えられた。今後、その抑制効果をより高めることにより、前立腺癌の増殖抑制効果を増加させることができるかどうか検討するだけでなく、運動能や、浸潤能など様々な抗腫瘍効果を評価し、新規分子標的としての有効性を評価していく予定である。また、今回の研究から、新たなペプチドワクチン候補が複数発見され、そのうちの1つは、癌細胞特異性が高く、有望な候補であると考えられる。ペプチドワクチン療法は、近年新たな癌治療法として非常に注目されているが、その種類は限られており、すべての癌に対して有効であるとは言えない。今回見つかった新規ペプチドワクチン候補は、前立腺癌で発見されたものではあるが、様々な臓器由来の癌細胞でも発現しており、各種癌に対する新たなペプチドワクチンとなる可能性がある。今後、様々な癌での組織内での発現やペプチドワクチンの抗腫瘍効果を調べ、臨床応用を目指す。

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1件)

- ① Funamizu N, Kamata Y, Misawa T, Uwagawa T, Lacy CR, Yanaga K, Manome Y. Hydroxyurea decreases gemcitabine resistance in pancreatic carcinoma cells with highly expressed ribonucleotide reductase. Pancreas. 査読有、41 巻、2012、107-113.
DOI: 10.1097/MPA.0b013e318224b5fb

[学会発表] (計4件)

- ① M. Kihara, N. Tanaka, M. Otsuji, T. Kimura, Y. Kamata, T. Yamamoto, S. Egawa, T. Nishimura. PROSTATE CANCER (PCA) STAGE-RELATED PROTEINS FOR

TARGET DISCOVERY. HUP0 2011 10th World Congress. 2011 年 9 月 5 日、Geneva, Switzerland

- ② 木原誠、田中直樹、尾辻真紀子、木村高弘、鎌田裕子、山本順啓、潁川晋、西村俊秀、加藤治文、個別化医療へ向けた FFPE 組織からの前立腺癌新規マーカーの探索、第20回日本癌病態治療研究会、2011 年 6 月 18 日、東京
- ③ 木原誠、田中直樹、尾辻真紀子、和田計也、荻原淳、木村高弘、鎌田裕子、山本順啓、潁川晋、西村俊秀、前立腺癌FFPE組織を用いた新規マーカーの探索、第61回日本電気泳動学会(JES)シンポジウム、第7回日本臨床プロテオーム研究会(JSCP)、2011 年 5 月 10 日、山口
- ④ 鎌田裕子、木村高弘、山本順啓、車英俊、鷹橋浩幸、佐々木裕、三木淳、三木健太、潁川晋、前立腺癌マーカー候補タンパク質発現の検討、第69回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 24 日、大阪

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 裕子 (KAMATA YUKO)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60433984

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし