

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592336

研究課題名(和文) 自然炎症を基盤とした前立腺癌の進展におけるミッドカインの役割解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of Midkine in prostate cancer progression based on homeostatic inflammation

研究代表者

井川 掌 (TSUKASA, IGAWA)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：40295069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌の進展に関わる分子は多岐にわたるが、今回の研究で自然炎症に関連するとされるミッドカインに注目し、その役割について解析した。各種前立腺癌細胞株での発現を確認したところ、LNCaP細胞のみで確認することが出来た。次にLNCaP細胞を用いてミッドカインの発現変化を種々の条件下に検討したところ、ジヒドロテストステロンや上皮成長因子または酸化水素による酸化ストレス刺激により発現の増加が観察されたがそのレベルは最大でも1.5倍程度であった。以上より、前立腺癌におけるミッドカインの役割は存在するものの、おそらく単独では軽微であり、他の関連因子と合わせて検討する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the role of midkine (MK), which is thought to have relation to homeostatic inflammation, in the progression of prostate cancer. We first evaluated the expression level of MK in the various prostate cancer cell lines. Since LNCaP cell expressed MK protein, we used this cell line for the next analysis. The changes of MK expression in LNCaP cells after treated with Dihydrotestosterone, Epidermal Growth Factor or H2O2 revealed at most 1.5 time higher protein expression than that of treatment free control cells. Although MK may have some roles in the progression of prostate cancer, e.g. cell proliferation or oxidative stress response, this independent role may not be so important. Further study is required to understand the actual role of homeostatic inflammation in prostate cancer, combined with other molecules which related to MK function.

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 ミッドカイン 自然炎症 LNCaP細胞

1. 研究開始当初の背景

近年わが国における**前立腺癌**の増加が著しい。特に手術や放射線療法といった根治治療が可能で早期前立腺癌が多くを占め、将来的には前立腺癌死亡の減少につながることを期待される。しかし、内分泌療法を第1選択治療とする進行癌症例は現在も相当数が診断されており、去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)やホルモン不応癌の予後はいまだ不良である。超高齢化社会を迎えたわが国においては今後も前立腺癌に対する総合的な研究の推進と対策の確立が急務である。

我々のグループはこれまで継続して再燃・進行前立腺癌進展の分子メカニズムについて精力的に研究を進めてきた。その結果、受容体型チロシンキナーゼおよびチロシンフォスファターゼを中心とするアンドロゲン非依存性獲得機序を解明し、さらにはアンドロゲン非依存性増殖における IL-6 と p38MAPK の関与について報告した。しかしながら、これら単一の機序では疾患全体の理解は不可能なことは明らかであり、未知の生物学的変化の関与を常に予測し、探索していく必要がある。そこで我々は以下に述べる経緯で今回の研究を着想するに至った。

最近、動脈硬化性疾患や自己免疫疾患さらには癌など多くの疾患に共通する基盤病態として慢性炎症の役割が注目されている。この場合の炎症は感染症に伴う急性炎症とは異なり、比較的中長期にわたるストレス応答の遷延化のために、組織リモデリングを介して当該臓器の障害ひいては疾患を誘導すると考えられている。このような慢性炎症は自然炎症 (Homeostatic Inflammation) という概念として提唱されている。癌の発生と慢性炎症の関連については従来多くの研究がなされているが、癌の進展や治療抵抗性獲得など、より進んだ段階での慢性炎症の役割に関する研究はまだ緒に就いたばかりである。

我々は、治療などのストレス下で細胞死に陥った癌細胞から産生される種々の細胞内分子が、内因性リガンドまたは Danger Signal として細胞外に放出され、Toll 様受容体などのリガンドセンサーを介することによって様々な炎症性液性因子産生を惹起し、増殖や転移を促進する機序を想定した。さらに、この機序は内分泌療法施行後の去勢抵抗性前立腺癌でも作用しているのではないかと予測した。

一方、**ミッドカイン(MK)**は、わが国の門松らにより発見された分子量 13kDa の成長因子であり、癌、神経・心臓疾患、炎症性疾患

で多彩な生物学的機能を有している。特に癌との関わりにおいては、各進行段階での発現増加や抗アポトーシス作用が多くの癌腫で報告されている。前立腺癌においては、ヒト癌病変部と転移巣および cell line の C4-2 で MK 発現の上昇が確認されている。しかしながら、これらはいずれも最終的な output としての MK 発現変化をとらえたもので、アンドロゲン依存性変化と関連付けた MK の発現調節に切り込んだ研究ではない。

2. 研究の目的

前述の背景から我々は、MK が自然炎症において重要な機能を果たしていると予測し、前立腺癌のアンドロゲン環境変化 自然炎症 MK の3者を軸に再燃癌の進展メカニズムを解明することを着想した。本研究では、前立腺癌のアンドロゲン非依存性増殖・進展に関わる分子として、MK とその関連蛋白に注目し、種々の環境下に前立腺局所で展開する非感染性慢性炎症の際に発現する細胞反応における MK の役割について、細胞モデルや前立腺組織検体を用いて明らかにすることを主たる目的とした。

< 研究の具体的目的 >

ヒト前立腺癌細胞・組織を用いて MK の発現、存在様式について解析する。前立腺癌モデルを用いて MK と他の炎症関連分子との相互作用と癌進展への影響を調べる。

3. 研究の方法

- (1) 前立腺癌細胞における MK の発現確認
前立腺癌細胞株 (LNCaP, PC-3, DU145) での MK 発現・・・手法として Western Blotting, RT-PCR, Immunocytochemistry を用いる。さらに、LNCaP 細胞モデル (C-33, C-81 細胞) での発現量変化の検討も同様の手法を用いて検討し、アンドロゲン依存性と MK 発現の関連を解析した。
- (2) 各種ストレス刺激下での MK の発現変化と細胞挙動変化の解析
アンドロゲン除去下での MK 発現変化の解析・・・ステロイド除去環境で LNCaP 細胞を培養し、MK 発現の変化をアポトーシス関連分子と合わせて蛋白・RNA レベルで解析した。また、抗アンドロゲン薬や逆にアンドロゲンや増殖因子の添加による効果も検討した。その他のストレス刺激として、H₂O₂ 添加の影響も検討した。

4. 研究成果

(1) 前立腺癌細胞株におけるMK蛋白発現のWestern Blot解析:

LNCaP, PC-3, DU145の3種類の細胞を用いて、抗MK抗体2種類を用いて検討したところ、明瞭な発現が確認できなかったため、ポジティブ・コントロールとしてリコンビナントMKを使用したところ、S社抗体では検出できなかったが、E社抗体ではポジティブ・コントロールのバンドが蛋白量に比例して検出された。よって、以下の実験にはE社抗体を1次抗体として使用することとした。しかしながら、ポジティブ・コントロールに比較して、各Cell LineでのMK発現は極わずかであり、この条件での発現確認は困難であった。以上より、使用可能な1次抗体の選定ができたが、MK蛋白は少なくとも高発現はしていないことが推測された。またcell lineの種類によっても発現量に差があること、また何らかの増殖刺激で(特にLNCaP細胞に関して)その発現量が増加することが示唆された。

(2) 各種細胞処理後のMK発現解析:

通常培養条件下ではMKの発現の確認が困難であったため、LNCaP細胞をDihydro-Testosterone (DHT)またはEpidermal Growth Factor (EGF)で刺激した試料を用いて解析したところ、DHT、EGF処理いずれにおいても特異的バンドが検出された。DHT 10nMによりコントロール比最大1.5倍までの発現増加が観察されたがDHTに対する用量依存性、曝露時間依存性の発現変化は認めなかった。EGFに関しては刺激後10分でわずかではあるがDHTと同レベルの発現増加が観察され、このレベルは刺激2時間後よりも高い蛋白発現であった。同様にPC-3細胞に関してもDHTおよびEGF刺激を行ったが、こちらでは特異的バンドは検出されなかった。

次にH2O2による酸化ストレス刺激に関して検討を行った。そうしたところ、50-200 μ Mnの添加で2-3時間の曝露後H2O2刺激により細胞形態の変化が観察されるにも関わらず最大1.5倍程度のMK蛋白発現上昇が観察された。この変化は前述したDHTやEGF刺激の場合とほぼ同様の結果で、各因子に特徴的な発現変化とは判断できなかった。

以上の結果を合わせると、前立腺癌細胞における基礎的MK発現レベルは細胞種により異なり、アンドロゲン依存性のLNCaP細胞で確認できたがそのレベルは高いものではなく、アンドロゲン依存性の点からDHTによる刺激を行ってもその変化は軽微であり、かつEGFに対する変化も同様のレベルであったことから細胞増殖時のMKの役割は高くないものと考えられた。酸化ストレス刺激時においても同様で、

その役割は存在する可能性があるものの、軽微であると推測された。前立腺癌における自然炎症の関与についてはMKのみならずこれと関連する他の因子も併せて検討する必要があると考えられる。

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)

Igawa T, Takehara K, Onita T, Ito K, Sakai H: Stability of [-2]pro-PSA in whole-blood and serum: analysis for optimal measurement conditions (Accepted for publication Aug. 21, 2013. Journal of Clinical Laboratory Analysis in press) DOI: 10.1002 / jcla.21678

Igawa T, Tsurusaki T, Nomata K, Hayashi M, Furukawa M, Sakai H: Oncological outcomes of hormonal therapy with a gonadotropin-releasing hormone agonist combined with a steroidal antiandrogen in patients with prostate cancer. Anticancer Research 34, 1983-1988, 2014.

[学会発表](計 5 件)

井川 掌: ホルモン療法併用 I-125 密封小線源療法の短期治療成績 - ホルモン療法の効果とその影響について - 第 100 回日本泌尿器科学会総会 2012 年 04 月 21 日 横浜市

井川 掌: 前立腺癌に対する酢酸クロルマジノンまたはピカルタミドを用いた CAB 療法の長期予後 第 50 回日本癌治療学会総会 2012 年 10 月 26 日 横浜市

Tsukasa Igawa: Clinical practice guideline for prostate cancer in Japan. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer 2012 年 11 月 16 日 Kanazawa

井川 掌: [-2]pro-PSA の採血検体での測定安定性に関する検討 第 101 回日本泌尿器科学会総会 2013 年 4 月 25 日 札幌市

井川 掌: 前立腺全摘後 PSA 再発に対する間歇的ホルモン療法の臨床的検討 第 51 回日本癌治療学会総会 2013 年 10 月 24 日 京都市

〔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〕

特記なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井川 掌 (IGAWA, Tsukasa)
長崎大学大学院医歯(薬)学総合研究
科・准教授
研究者番号: 40295069

(2) 研究分担者

酒井英樹 (SAKAI, Hideki)
長崎大学大学院医歯(薬)学総合研究
科・教授
研究者番号: 40235122

大仁田 亨 (ONITA, Toru)
長崎大学病院・講師
研究者番号: 50452850

竹原浩介 (TAKEHARA, Kousuke)
長崎大学病院・助教
研究者番号: 40580345

(3) 連携研究者: なし