

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592338

研究課題名(和文) ホルモン不応性前立腺癌特異的分泌プロテアーゼの精製・同定と癌治療への応用

研究課題名(英文) Castration-resistant prostate cancer-specific protease: Function analysis and application search as a therapeutic target.

研究代表者

和田 孝浩 (WADA, Yoshihiro)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：20284755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌培養液中のプロテアーゼ活性を95種類の2アミノ酸基質で測定すると、Ac-XZ-MCAを水解する活性は去勢感受型にはなく不応型にのみ検出された。この活性はDFPで完全に抑制されたので、セリン型であった。培養上清中より洗浄後の細胞浮遊液の活性ははるかに強く、蛍光標識した本プロテアーゼ特異的阻害剤による癌細胞染色で細胞膜が染色されたことから、分泌型ではなく細胞膜に存在と推定された。ビオチン標識上記阻害剤を結合させた本プロテアーゼを癌細胞膜から溶出させてアビジンカラムで精製し、同定のためプロテオミクス解析中である。このプロテアーゼは去勢不応型前立腺癌に特異的で標的治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Protease activities in culture media of prostate cancer cells were measured using 95 dipeptidyl substrates and a hydrolytic activity for Ac-XZ-MCA was found in media of castration-resistant but not -sensitive type cells. This activity was completely inhibited by DFP but not by other inhibitors, indicating this protease is serine-type. This activity was much higher in the washed cell suspensions than the culture supernatants and was localized on the cancer cell membrane when stained using biotin-XZ-chloromethylketone, which revealed that this protease is not secreted to the media but bound to the cell membrane. This protease was separated from the cell membrane and subjected to proteomics analysis but has not been identified because of a small amount of the protease. This castration-resistant prostate cancer cell-specific protease is a promising therapeutic target, thus further purification procedures will be done for its identification.

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 去勢不応性 プロテアーゼ 細胞膜

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は米国では既に罹患率が第1位であり(死亡率は第2位)、わが国でも高齢化社会やライフスタイルの欧米化に伴い前立腺癌は急速に増加している(男性癌死亡率第7位、2020年には3倍増と予測:前立腺癌診療ガイドライン2006・がんの統計2005)。アンドロゲン除去療法や抗アンドロゲン療法が有効なホルモン感受性癌(Campbell's Urology 8版)と異なり、ホルモン不応性癌は新規抗がん剤のタキソテールが使用されても生存期間延長効果は、2~3ヶ月にすぎない(N Engl J Med 351: 1513-20, 2004; N Engl J Med 351: 1502-12, 2004)。

最近、前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)抗原を標的とするがんワクチン製剤が使用され、タキソテール以上の生存期間延長効果とタキソテールよりさらに少なく軽度の副作用が報告された(N Engl J Med 363: 411-22, 2010)。

プロテアーゼがホルモン抵抗性前立腺癌細胞DU-145の増殖に關与することから、プロテアーゼと前立腺癌病態との密接な関係は明らかであり、ホルモン不応化との関係も示唆されている(Gregory et al., Mol Cancer Res 6: 1043-1051, 2008)。AIDSでも治療効果が立証されているが、プロテアーゼインヒビターは細胞増殖抑制作用があり抗癌剤や放射線抵抗性乳癌などに有効性が示されている(Gills et al., Clin Cancer Res 13: 5183-5194, 2007)。実際、PSA特異的抗体やプロテアーゼインヒビターによるPSA活性の抑制が前立腺癌骨形成性転移を抑制する(Yonou et al., Biochem Biophys Res Commun 288:1082-1087, 2001)ことから、インヒビターや抗体によるプロテアーゼ抑制は有効な癌治療法として期待できる。従って、ホルモン不応性癌のみが分泌するプロテアーゼをターゲットにした治療法は、ホルモン不応性癌に対する新規の有効な治療法となることが有望である。本プロテアーゼをターゲットにしたホルモン不応性癌治療法の開発を行う。

2. 研究の目的

前立腺癌は今後最も著しい増加が予想されている癌種であり、その診断と治療は現在の医学・医療における最重要な課題の1つである。ホルモン感受性前立腺癌に対してはホルモン療法が有効であるが、ホルモン不応性前立腺癌には有効性の高い治療法がない。

我々は、ホルモン不応性前立腺癌のみが産生するプロテアーゼを精製・同定し、本プロテアーゼをターゲットにしたホルモン不応性癌治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) ホルモン不応性前立腺癌細胞株特異的分泌プロテアーゼ活性検出

Acetyl(あるいは succinyl)-X1-X2-MCA (methyl-coumaryl-amide)を準備する。X2にはLys, Phe, Val, Ala, Argの5種類のアミノ酸を選定し、X1にはGlyからTrpの19種類のアミノ酸を配置して計95種類の基質を合成する。

ヒト前立腺癌ホルモン感受性細胞株LNCaPとホルモン不応性細胞株PC-3・DU145を通常培地で培養後、無血清培地に移し再培養して12、24、48時間の培養上清を採取する。

96穴プレートに数十種の2アミノ酸蛍光合成基質(1mM)をそれぞれ100 μ l入れ、これに培養上清を100 μ lずつ添加して、各基質へのプロテアーゼ活性を蛍光分光光度計で測定する。

ホルモン不応性細胞株でのみ活性が検出された基質を選出し、その活性がPSA抗体で抑制されないことを確認する。また、この活性が最も高い細胞株と培養時間を決定する。

(2) ホルモン不応性前立腺癌細胞株特異的分泌プロテアーゼの精製・同定

セリン型、システイン型、メタロ型、酸性型プロテアーゼに、各々特異的なインヒビターを培養上清に添加し、その抑制によって本プロテアーゼがどの型に属するかを決定する。

最も活性が高かった癌細胞株の、最も活性が高かった培養時間の無血清培地培養液を5リットルから、特異的な基質に対する活性を指標に、種々のカラムクロマトグラフィーによってプロテアーゼを精製する。これにはHPLCシステムを使用する。

精製したプロテアーゼに対してプロテオミクス解析を行い、そのアミノ酸配列情報から、既知のプロテアーゼか未知のプロテアーゼかを調べる。

以上より、ホルモン不応性癌細胞が特異的に分泌するプロテアーゼが同定され、その性状が明らかになる。

4. 研究成果

(1) 去勢不応型特異的前立腺癌プロテアーゼ活性検出: 上記95種類の2アミノ酸基質を使ってconfluentになった種々の前立腺癌細胞株の培養上清のプロテアーゼ活性を測定したところ、Ac-XZ-MCA(特許申請の都合でこの様に記載する)水解活性のみが、去勢感受型のLNCaPでは検出されず、不応型でアンドロゲン受容体DU-145およびPC-3で検出された(図1)。しかし、不応型株でもこの受容体陽性のC4-2と22RV1では本活性はみられなかった(図2)。

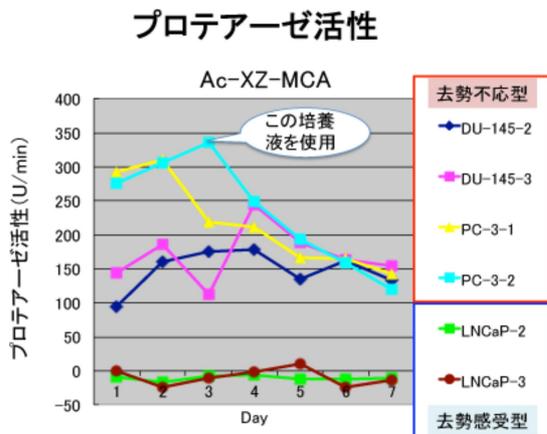


図 1. 前立腺癌株細胞培養液の Ac-XZ-MCA 水解活性。

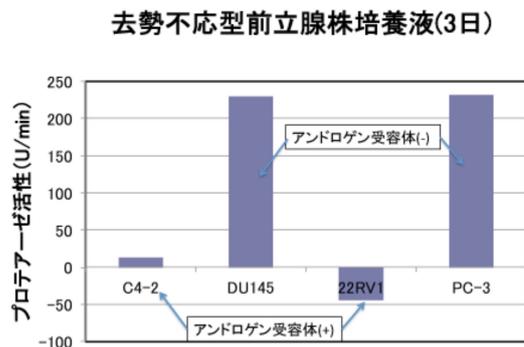


図 2. 去勢不応型前立腺癌株培養液の Ac-XZ-MCA 水解活性。

(2) 本プロテアーゼの性質解析: 検出されたプロテアーゼ活性の性質を明らかにするために、様々なプロテアーゼインヒビターによる抑制効果を調べた。PC-3 のこの活性はセリンプロテアーゼに特異的な DFP (1 mM) で完全に消失したが、チオールプロテアーゼインヒビターの E64 (10 μM) や金属プロテアーゼインヒビターの o-フェナントリン (1 mM) では全く抑制されなかった (図 3)。この結果から、本プロテアーゼはセリン型であることがわかった。

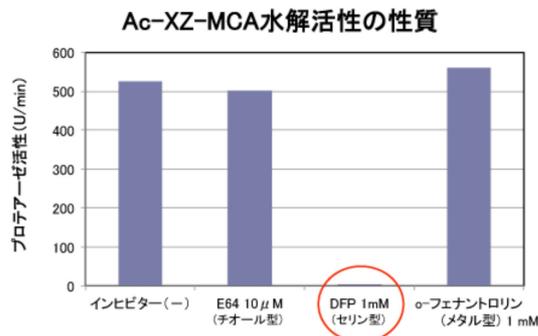


図 3. PC-3 細胞 Ac-XZ-MCA 水解活性のインヒビターによる活性阻害プロファイル。

(3) 本プロテアーゼの局在解析: 本プロテアーゼが分泌型か細胞膜結合型か明らかにするために、80 プレート分の PC-3 細胞培養上清の活性を測定した。遠心後の沈殿にのみ活性が検出され、上清およびその 20%、30% の硫酸分画にはほとんど活性はみられなかった (図 4)。1 プレートの培養細胞 (1 × 10⁶ 個) を洗浄後 PBS に浮遊して活性を測定すると、80 プレートの培養液の遠心沈殿よりも 5 倍の活性が認められた (図 4)。これらの結果から、本プロテアーゼは分泌型ではなく細胞膜結合型であることが推定された。

Ac-XZ-MCA 水解活性の局在

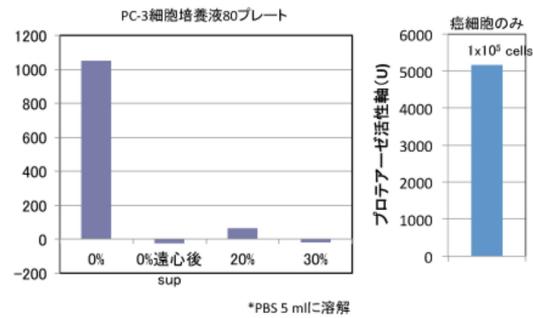


図 4. PC-3 細胞培養上清、遠心沈殿、および硫酸分画の Ac-XZ-MCA 水解活性。

そこで、PC-3 細胞浮遊液にビオチン標識した基質と同じアミノ酸配列の阻害剤ビオチン XZ-クロロメチルケトン を添加してプロテアーゼに結合させた。4% パラホルムアルデヒドで固定したあと、細胞に抗ビオチンマウス IgG 抗体、さらに CFTM568 標識抗マウス IgG ヤギ抗体を反応させた。DAPI で核染したあと、蛍光顕微鏡で蛍光の細胞局在を観察した。プロテアーゼの存在を示す赤色蛍光は細胞膜に局在して認められたが、上記阻害剤を添加しなかった場合は、赤色蛍光は細胞にはみられなかった。以上より、本プロテアーゼは PC-3 細胞の細胞膜に存在することが明らかとなった。

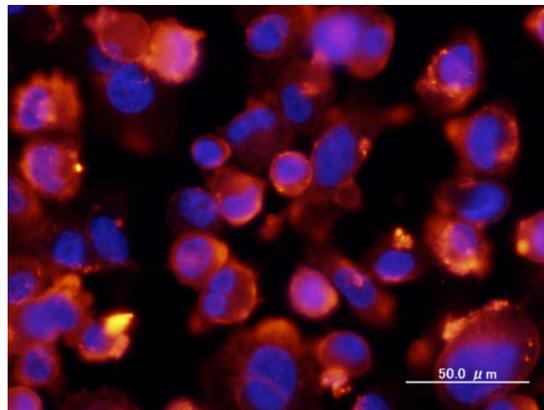


図 5. PC-3 細胞 Ac-XZ-MCA 水解活性のビオチン-XZ-クロロメチルケトンによる標識。

(4) プロテアーゼの精製・同定：プロテアーゼをビオチン-XZ-クロロメチルケトンで標識したあと、細胞膜分画を分離し細胞膜からプロテアーゼを溶出させた。この溶液を濃縮してアビジンカラムにかけ、プロテアーゼを吸着させた。カラムを 1M NaCl 液で洗浄後、monomeric ビオチン溶液でカラム吸着物を溶出した。溶出液を濃縮後、二分して各々二次元電気泳動を施行した。一方のゲルをニトロセルロース膜に転写してアビジン-HRP によるプロットを行うと数十個のドットが検出された。他方のゲルを deep purple でタンパク染色すると、分子量 7 万周辺のドットとの一致がみられた。これらのドットをプロテオミクス解析して、推定される分子を検索したが、相当するプロテアーゼは認められなかった。原因として、プロテアーゼが極めて微量なため、精製の過程で消失してしまったことが考えられた。今後、アビジンカラムを使用せずに、膜溶出液を直接二次元電気泳動し、プロテアーゼの検出・同定を行う予定である。これにより、プロテアーゼが同定され、去勢不応型前立腺癌治療の標的としての応用が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Nitta, H., Wada, Y., Kawano, Y., Murakami, Y., Irie, A., Taniguchi, K., Kikuchi, K., Yamada, G., Suzuki, K., Honda, J., Wilson-Morifuji, M., Araki, N., Eto, M., Baba, H. and Imamura, T.: Enhancement of human cancer cell motility and invasiveness by anaphylatoxin C5a via aberrantly expressed C5a-receptor (CD88). *Clin. Cancer Res.* 19: 2004-2013, 2013. 査読有, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1204
Murakami, Y., Wada, Y., Kobayashi, H., Hasegawa, M., Okamoto, K., Eto, M., Imamura, T.: The tail nick augments *Aeromonas sobria* serine protease (ASP) activity in plasma through retarding inhibition by 2-macroglobulin. *FEBS Letters*, 586; 3613-3617, 2012, 査読有, DOI: 10.1016/j.febslet.2012.08.004.
Murakami, Y., Wada, Y., Kobayashi, H., Irie, A., Hasegawa, M., Yamanaka, H., Okamoto, K., Eto, M., Imamura, T.: Inhibin of *Aeromonas sobria* serine protease (ASP) by 2-macroglobulin. *Biological Chemistry*, 393; 1193-2000, 2012, 査読有, 10.1515/hsz-2012-0117.
Wada, Y., Takahashi, W., Kawano, Y., Eto, M.: Current status of pharmacotherapy against metastatic renal cell carcinoma in Japan. *International Journal of Urology*, 19; 284-295, 2012, 査読有,

DOI: 10.1111/j.1442-2012.02962.x.
Wada, Y., Uchiba, M., Kawano, Y., Kai, N., Takahashi, W., Honda, J., Tanoue, K., Maeda, Y., Murakami, Y., Eto, M., Imamura, T.: Severe bleeding tendency caused by a rare complication of excessive fibrinolysis with disseminated intravascular coagulation in a 51-year-old Japanese man with prostate cancer: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 6; 378, 2012, 査読有, DOI: 10.1186/1752-1947-6-378.
和田孝浩, 今村隆寿, 高橋渡, 河野吉昭, 本多次朗, 田上憲一郎, 仲西寿朗, 谷川史城, 前田喜寛, 中村圭輔, 江藤正俊, 桑原朋広: 進行性腎盂尿管癌の臨床において手術に役立つ腎盂尿管の解剖(Gerota 筋膜), 泌尿器外科, 25; 667-672, 2012, 査読無
河野吉昭, 和田孝浩, 高橋渡, 本多次朗, 仲西寿朗, 江藤正俊: 転移性腎細胞癌に対するインターフェロンと分子標的治療薬の併用療法. 西日本泌尿器科学会雑誌, 74; 190-196, 2012. 査読無
和田孝浩, 田上憲一郎, 高橋渡, 河野吉昭, 江藤正俊: 腎癌に対するサイトカイン療法の現況と展望. 西日本泌尿器科学会雑誌, 74; 236-245, 2012, 査読無
和田孝浩, 谷川史城, 高橋渡, 河野吉昭, 本多次朗, 前田喜寛, 中村圭輔, 江藤正俊, 菊川浩明, 菊池健: 高齢者の膀胱全摘除術, 日本老年泌尿器科学会雑誌, 25; 101, 2012, 査読無
和田孝浩, 江藤正俊: 第3回根治的腎摘除術後のフォローアップについて教えてください. RCC FOREFRONT, 7; 14-15, 2012, 査読無
本多次朗, 和田孝浩, 高橋渡, 仲西寿朗, 谷川史城, 江藤正俊: 高齢の進行前立腺癌患者に対するドセタキセルを用いた化学療法の経験, 日本老年泌尿器科学会雑誌, 25; 103, 2012, 査読無
Eto, M., Takahashi, W., Kawano, Y., Wada, Y.; Personalized treatment in the immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma, *Int J Urol*, 18; 419-21, 2011, 査読有

[学会発表](計 43 件)

前田喜寛, 和田孝浩, 河野吉昭, 菊池健, 高橋渡, 杉山豊, 田上憲一郎, 矢津田旬二, 今村隆寿, 江藤正俊: 転移性腎細胞癌における C5a 受容体の発現及び生物学的意義について. 第 72 回日本癌学会学術総会, 平成 25 年 10 月 3-5 日, 横浜市, パシフィコ横浜
今村隆寿, 新田英利, 和田孝浩, 河野吉昭, 村上洋嗣, 江藤正俊, 馬場秀夫: アナフィラトキシン C5a の癌進展に有利な活

性. 第72回日本癌学会学術総会, 平成25年10月3-5日, 横浜市, パシフィコ横浜
今村隆寿, 村上洋嗣, 和田孝浩: 去勢不応型前立腺癌特異的プロテアーゼの探索. 第102回日本病理学会総会, 平成25年6月6-8日, 札幌市, ロイトン札幌
前田喜寛, 和田孝浩, 河野吉昭, 菊池 健, 高橋 渡, 本多次朗, 田上憲一郎, 仲西寿朗, 谷川史城, 中村圭輔, 矢津田旬二, 今村隆寿, 江藤正俊: 転移性腎細胞癌におけるC5a受容体の発現および生物学的意義について. 第22回泌尿器科分子・細胞研究会, 平成25年3月8-9日, 高知市
和田孝浩, 井川 掌, 入江慎一郎, 古賀寛史, 呉屋真人, 佐藤文憲, 月野浩昌, 徳田雄治, 西山賢龍, 野口正典, 藤本真浩, 横溝晃, 中川昌之, 内藤誠二, 江藤正俊: P-24 PSA高値のため前立腺生検を行い癌陰性と診断された患者に対する経過観察の方法に関する調査 アンケート結果から, 第28回前立腺シンポジウム, 平成24年12月8-9日, 東京, 東京コンファレンスセンター・品川
和田孝浩, 前田喜寛, 矢野大輔, 江藤正俊, 野尻明弘, 鍋倉康文, 井 秀隆, 狩野武洋, 鎌田知子, 平山英雄, 石松隆志, 池田和義, 津崎祥一郎, 甲斐信幸: Green Light Laserによる経尿道的前立腺蒸散術, 第8回内視鏡的前立腺治療研究会, 平成24年11月24日, 仙台: 仙台国際センター
和田孝浩, 谷川史城, 高橋 渡, 河野吉昭, 本多次朗, 前田喜寛, 中村圭輔, 江藤正俊, 伊藤徳浩, 西 一彦: 末期腎不全患者における前立腺癌に対する前立腺全摘除術. 第57回日本透析医学界学術集会総会, 平成24年6月22-24日, 札幌, 京王プラザホテル札幌
和田孝浩, 谷川史城, 高橋 渡, 河野吉昭, 本多次朗, 前田喜寛, 中村圭輔, 江藤正俊, 菊川浩明, 菊池 健: 高齢者の膀胱全摘除術. 第25回日本老年泌尿器科学会, 平成24年6月1-2日, 徳島, あわぎんホール
MAEDA, Y., Wada, Y., Kawano, Y., Kikuchi, K., Takahashi, W., Honda, J., Nakanishi, J., Imamura, T., Eto, M.: Aberrant expression of C5aR in metastatic renal cell carcinoma, AUA Annual Meeting 2012, 2012年5月19-23日, 横浜市, パシフィコ横浜
河野吉昭, Nicole Maltry, Marjorie Walker, 和田孝浩, 高橋 渡, 江藤正俊, Jonathan Waxman, Robert Kypta: 正常前立腺上皮細胞の増殖抑制及腺房構造維持におけるDkk-3の生物学的意義, 第100回日本泌尿器科学会総会, 平成24年4月21-24日, 横浜, パシフィコ横浜
和田孝浩, 町田二郎, 井 秀隆, 石松隆志, 浅山縁, 川上茂生, 佐渡英三, 菊川浩明, 木谷公亮, 桑原朋広, 川野尚, 田上憲一郎,

江藤正俊: 熊本県版前立腺癌診療連携パス『私のカルテ』, 第100回日本泌尿器科学会総会, 平成24年4月21-24日, 横浜, パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 孝浩 (WADA, Yoshihiro)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 20284755

(2) 研究分担者

今村 隆寿 (IMAMURA, Takahisa)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 20176499

河野 吉昭 (KAWANO, Yoshiaki)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 30593793