

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：平成 23 年～平成 24 年

課題番号：23659755

研究課題名（和文） 癌微小環境に着目した去勢抵抗性前立腺癌の新規腫瘍マーカー及び治療標的の探索

研究課題名（英文） Exploration for a novel biomarker and a new therapeutic target of castration resistant prostate cancer in terms of cancer microenvironment

研究代表者

清水洋祐 (Yousuke Shimizu)

京都大学 医学研究科 泌尿器科助教

研究者番号：00542094

研究成果の概要（和文）：

【目的】PSA は前立腺癌の診断および治療マーカーとして広く用いられているが、特異度が低い、悪性度と相関しない、といった問題点があり、PSA を補完するバイオマーカーが求められている。

一方、Nardilysin (NRDc) は HG-EGF や TNF $\alpha$  などの前駆体に対する細胞外シェディングの増強因子である。今回我々は、NRDc の前立腺癌における悪性度との関連を解析し、予後予測マーカーとなり得るかどうかの検討を行った。

【方法】LNCaP, PC3 細胞での NRDc の発現を評価し、その強制発現やノックダウンによる浸潤能の変化を Matrigel invasion assay にて検討し、さらに in vivo 増殖能の変化をマウス皮下 xenograft モデルにて検討した。前立腺癌組織における免疫染色による NRDc 発現の評価と、患者血清における ELISA 法による NRDc 濃度の測定を行い、前立腺癌の悪性度との相関を検討した。

【結果】NRDc の発現は LNCaP と比較し PC3 で高く、その浸潤能と in vivo 増殖能は、PC3 での NRDc ノックダウンにより低下した。免疫染色において組織における NRDc の発現が高い症例において PSA 再発を来しやすい傾向を認めた ( $p=0.30$ )。血清 NRDc 濃度は血清 PSA 濃度と相関を認めず、正常 ( $303 \text{ pg/ml} \pm 510$ ,  $n=20$ ) と比較して前立腺患者 ( $652 \text{ pg/ml} \pm 1950$ ,  $n=161$ ) で高かった ( $p=0.0269$ )。また、血清 NRDc 濃度は転移を有する患者でより高い傾向を認め、予後に相関する傾向を認めた。

【結論】NRDc は前立腺癌の浸潤や増殖に関わり、その組織における発現や血清中濃度は、予後不良前立腺癌の診断マーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

a) Introduction and Objective

Prostate specific antigen (PSA) is a diagnostic or therapeutic biomarker for prostate cancer (PC). However, due to its low specificity and lack of relevance with aggressiveness, novel biomarkers to complement PSA are definitely needed. We

previously reported that Nardilysin (NRDc) promotes ectodomain shedding of the precursor forms of various growth factors and cytokines, such as heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Nishi et al, 2006). The aim of our study is to evaluate the association of NRDc with PC aggressiveness and its potential to be a prognostic marker.

#### b) Methods

NRDc expression levels in LNCaP and PC3 cells were analyzed by real-time PCR and Western blotting. To evaluate the association with cell invasiveness, NRDc was knocked-down in PC3, and in vitro Matrigel invasion assays and in vivo xenograft tumor growth assays were performed in these cells. Then, NRDc expression levels in PC tissues were evaluated by immunohistochemistry (IHC), and NRDc serum concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in serum samples obtained from PC patients.

#### c) Results

The expression levels of NRDc were higher in PC3 than in LNCaP. NRDc knocking-down suppressed in vitro cell invasion and in vivo cell proliferation. In IHC analysis the NRDc expression levels tended to be positively correlated with biochemical recurrence after surgical treatment ( $p=0.30$ ). Serum NRDc concentrations in PC patients ( $652 \text{ pg/ml} \pm 1950$ ,  $n=161$ ) were significantly higher than in normal controls ( $303 \text{ pg/ml} \pm 510$ ,  $n=20$ ) ( $p=0.0269$ ), especially in metastatic PC patients, and tended to be correlated with patients prognosis. The serum NRDc levels were not correlated with serum PSA levels in PC patients.

#### d) Conclusions.

NRDc was associated with PC aggressiveness, being potential tissue and serum markers for predicting PC prognosis.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：前立腺癌

科研費の分科・細目：泌尿器科 腫瘍学

キーワード：NRDc バイオマーカー 前立腺癌 去勢抵抗性

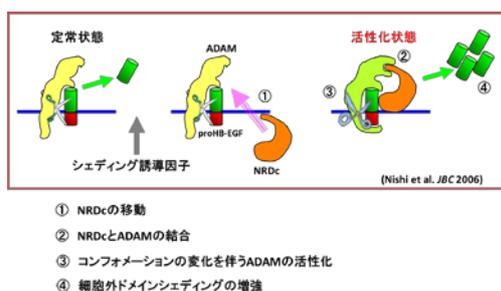
#### 1. 研究開始当初の背景

我々はヒト前立腺癌組織を患者の承諾のもと採取し、免疫不全マウスに移植した xenograft モデルを複数樹立し、報告してき

た (Terada, Shimizu et al. Prostate 2010、Yoshida, Shimizu et al. Cancer Res 2005、Terada, Shimizu et al. 2010)。そのひとつ KUCaP-2 は Androgen receptor (AR)、PSA を

発現している点や、去勢により縮小し再増殖する点など、臨床的前立腺癌の表現型を保った貴重なモデルである。KUCaP-2 の去勢治療感受性期から抵抗性期に変化する遺伝子群の網羅的解析の結果(Cancer Res 2010)、細胞膜蛋白質の shedding に関する Nardilysin (NRDc) が去勢治療感受性期に比較し、去勢抵抗性期に発現上昇していることを見出した。一方で連携研究者等は、Nardilysin (NRDc) を Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) の特異的結合タンパクとして同定し、細胞外シェディングにより HG-EGF およびその他の増殖因子の分泌に関わることを示した(図 0)。さらにノックアウトマウスを用いた研究により神経細胞の軸索形成に関わることを示した。そこで我々は「NRDc は前立腺癌微小環境の調整に重要な役割を果たしており、前立腺癌のあらたな治療・診断標的になりうる。」という仮説を立てるに至った。

図 0



## 2. 研究の目的

①Nardilysin (NRDc) の前立腺癌における機能を解析し、その発現と悪性度との関連を評価する。

②その血清中濃度が前立腺癌の予後予測マーカーとなり得るかどうかの検討を行う。

## 3. 研究の方法

### ①細胞株での発現解析

NRDc に対する特異的抗体を用いて、LNCaP, PC3 細胞での NRDc の発現を評価し、その強制発現やノックダウンモデルを作制した。

### ②細胞株での機能解析

PC3 に対して shRNA を用いて NRDc の発現を抑制し、用いて in vitro 浸潤能の変化を Matrigel invasion assay にて検討し、in vivo 増殖能の変化をマウス皮下 Xenograft モデルにて検討した。

### ③臨床検体での発現解析

前立腺癌に対して前立腺全摘を行った 53 例を用いた免疫染色により癌部の NRDc 発現の評価を行い、術後 PSA 再発との相関を検討した。

### ④血清中濃度の解析

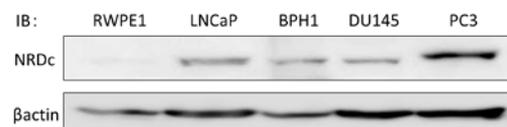
NRDc 特異的抗体を用いた Sandwich ELISA 法を確立し、患者血清(健常者 20 例、前立腺癌患者 161 例)中の NRDc 濃度の測定を行い、前立腺癌の悪性度との相関を検討した。

## 4. 研究成果

### ①細胞株での発現解析

前立腺癌細胞株での Nardilysin (NRDc) の発現を確認し、LNCaP と比べ PC3 で発現が高いことを確認した(図 1)。

図 1



### ②細胞株での機能解析

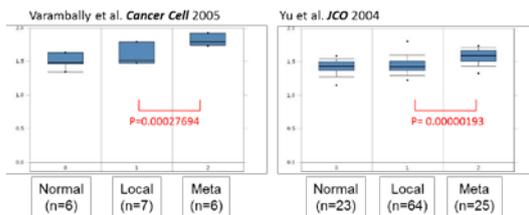
NRDc のノックダウンモデルを作成し、in vitro 浸潤能とマウス皮下 xenograft モデルにおける in vivo 増殖能が低下した。KUCaP-2 の去勢治療感受性期から抵抗性期に変化する遺伝子群の網羅的解析の結果(Cancer Res

2010)において、去勢治療感受性期に比較し去勢抵抗性期で NRdc の発現が上昇していたため、NRdc の発現が去勢抵抗性と関連すると考え、アンドロゲン受容体との関連を検討したが有意な関係性は見い出せなかった。

### ③臨床検体での発現解析

共有データベースである Oncomine において、転移性前立腺癌症例において、限局性前立腺癌症例よりも NRdc の発現が高いことを確認した(図 2)。当研究室の所有する患者予後の確認できる前立腺全摘を行った 53 例の前立腺癌組織マイクロアレイを用いて免疫染色を行うと、NRdc の発現が高い症例において PSA 術後再発を来しやすい傾向を認めた。

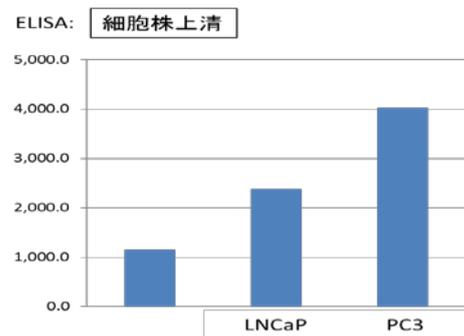
図 2



### ④臨床検体での血清中濃度の解析

NRdc 特異的抗体を用いた Sandwich ELISA 法を確立し、細胞培養上清中の NRdc 濃度が細胞株の発現レベルと相関し(図 3)、NRdc 発現抑制株では細胞上清中の NRdc 濃度が低下することを確認した。次に、バイオマーカーとしての有用性を評価するために当研究室で蓄積した患者の血清(健常者 20 例、前立腺癌患者 161 例)を用いて血清 NRdc 濃度を測定した。正常(303 pg/ml ± 510, n=20)と比較して前立腺患者(652 pg/ml ± 1950, n=161)が高かった(p=0.0269)。また、転移を有する前立腺癌患者(1264 pg/ml ± 3665, n=42)では限局性の患者(447 pg/ml ± 594, n=119)より高い傾向を認めた(p=0.1072)。さらに、有転移症例のうち血清 NRdc 濃度が高い群では特に予後が不良である傾向を認めた。一方で血清 NRdc 濃度は血清 PSA 濃度と相関を認めなかった。

図 3



### ⑤結論

NRdc は前立腺癌の浸潤や増殖に関わり、その組織における発現や血清中濃度は、予後不良前立腺癌の診断マーカーとして有用である可能性が示唆された。

### ⑥今後の展望

前立腺癌において NRdc がシェディングに関与する分子の同定はまだ出来ていないが、胃癌においては NRdc が TNF $\alpha$  のシェディング増強因子として働き、TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B 経路や IL6-STAT3 経路の活性化に関与することを報告した。今後、前立腺癌細胞株の培養上清においてサイトカインアレイを施行し、NRdc のシェディング増強標的分子の探索を検討している。

また、予後不良前立腺癌バイオマーカーとしての血清 NRdc 濃度の有用性を、前向き研究により評価することを検討している。

### 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 5 件)

- 1) Kanda K, Komekado H, Sawabu T, Ishizu S, Nakanishi Y, Nakatsuji M, Akitake-Kawano R, Ohno M, Hiraoka Y, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Matsumoto

- K, Kunichika M, Kimura T, Seno H, Nishi E, Chiba T. "Nardilysin and ADAM proteases promote gastric cancer cell growth by activating intrinsic cytokine signalling via enhanced ectodomain shedding of TNF- $\alpha$ ." *EMBO Mol Med*. 2012 May;4(5):396-411. doi:10.1002/emmm.201200216. Epub 2012 Feb 20.
- 2) Li J, Chu M, Wang S, Chan D, Qi S, Wu M, Zhou Z, Li J, Nishi E, Qin J, Wong J. "Identification and characterization of nardilysin as a novel dimethyl H3K4-binding protein involved in transcriptional regulation." *J Biol Chem*. 2012 Mar 23;287(13):10089-98. doi:10.1074/jbc.M111.313965. Epub 2012 Jan 30
- 3) Takahiro Inoue, Osamu Ogawa "Role of Signaling Transduction Pathways in Development of Castration-Resistant Prostate Cancer," *Prostate Cancer*, vol. 2011, Article ID 647987, 7 pages, doi:10.1155/2011/647987. 2011.
- 4) Mizowaki T, Takayama K, Norihisa Y, Ogura M, Kamba T, Inoue T, Shimizu Y, Kamoto T, Ogawa O, Hiraoka M. Long-term outcomes of three-dimensional conformal radiation therapy combined with neoadjuvant hormonal therapy for Japanese patients with T1c-T2N0M0 prostate cancer. *Int J Clin Oncol*. Oct 5. [Epub ahead of print] 2011 doi: 10.1007/s10147-011-0326-z
- 5) Shimizu Y, Hamazaki Y, Hattori M, Doi K, Terada N, Kobayashi T, Toda Y, Yamasaki T, Inoue TA, Kajita Y, Maeno A, Kamba T, Mikami Y, Kamoto T, Yamada

T, Kanno T, Yoshikawa K, Ogawa O, Minato N, Nakamura E. SPA-1 controls the invasion and metastasis of human prostate cancer. *Cancer Sci*. 102:828-36, 2011

[学会発表] (計1件)

- 1) 後藤崇之、寺田直樹、井上貴博、吉川武志、小林恭、清水洋祐、神波大己、吉村耕治、西英一郎、小川修  
"Nardilysin は予後不良前立腺癌診断マーカーとなり得る"  
『第22回泌尿器科分子・細胞研究会』、P-19、高知、2013年3月

[その他]

ホームページ等

<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水洋祐 (Yousuke Shimizu)  
京都大学 医学研究科 助教  
研究者番号: 00542094

### (2) 研究分担者

井上貴博 (Takahiro Inoue)  
京都大学 医学研究科 助教  
研究者番号: 80511881

小川 修 (Osamu Ogawa)  
京都大学 医学研究科 教授  
研究者番号: 90260611

### (3) 連携研究者

西英一郎 (Eiichirou Nishi)  
京都大学 医学研究科 准教授  
研究者番号: