

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592385

研究課題名(和文)のう胞形成前立腺癌異種移植モデルを用いた前立腺癌分泌蛋白質の発現・機能解析

研究課題名(英文) Expression and functional analysis of secreted proteins in an original patient-derived xenograft of prostate cancer with glandular formation

研究代表者

井上 貴博 (Inoue, Takahiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80511881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫不全マウスにヒト前立腺癌組織を移植して新規患者由来異種移植片、KUCaP3を作成した。KUCaP3はアンドロゲン受容体とPSAを発現し、アンドロゲン依存性増殖および嚢胞形成の特徴を有する。LC/MS法でこの嚢胞液のタンパク質発現解析を行い、23のヒト由来タンパク質を同定した。その内発現の高かったNiemann-Pick disease, type C2(NPC2)について発現・機能解析を行った。前立腺癌臨床組織の免疫染色で、正常腺管に比べ、癌細胞でその発現低下を認めた。NPC2を発現抑制した細胞株を作成し、3D培養を行うと、腺管形成が阻害された。NPC2は前立腺腺管形成に関わると思われる。

研究成果の概要(英文)：A prostate cancer tissue sample was transplanted into male severe combined immune-deficient mice. This PDX mouse model was named KUCaP3. Sequential volume changes were observed before and after castration, and androgen receptor (AR) and prostate-specific antigen (PSA) expression were examined immunohistochemically. Proteomic analysis of cyst fluid and sera samples of KUCaP3 mice were analyzed by mass spectrometry (MS). Glandular formation capacity was examined by three-dimensional assay. KUCaP3 mice exhibited cyst formation, showed androgen-dependent growth, and expressed AR and PSA. Based on MS, 23 proteins of human origin were detected in two or more KUCaP3 samples, among which Niemann-Pick disease, type C2 (NPC2) was most abundant. Based on an immunohistochemical assay, NPC2 was downregulated in prostate cancerous tissue relative to non-cancerous tissue samples. After silencing endogenous NPC2 expression, prostate epithelial glandular formation was significantly suppressed.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 質量分析 NPC2

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の診断、治療においては前立腺特異抗原(PSA)がバイオマーカーとして用いられるが、特異度が低い、悪性度を反映しないなどの問題があり、臨床的に PSA を補完するバイオマーカーが強く求められている。また、進行性前立腺癌において去勢療法が標準治療であるが、ほぼ全例、平均2年の奏功期間のち、去勢治療に抵抗性を示す去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)となる。CRPC に対しては、抗がん剤治療も限られており、CRPC の進展機序の解明に伴う新規標準治療の開発が急務となっている。

2. 研究の目的

PSA を補完するマーカーの探索。また、去勢抵抗性の機序解明、新規治療標的の探索。

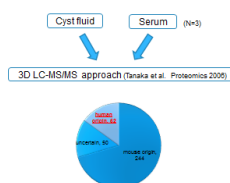
3. 研究の方法

我々は、免疫不全マウスにヒトの前立腺癌組織を移植してできた patient-derived xenograft (PDX) のうち嚢胞を形成するという特徴をもつ KUCaP3 を新規に樹立した。KUCaP-3 は臨床癌と同様に、アンドロゲン受容体を発現し、多量の PSA を発現している。またその血清と嚢胞液からも PSA が検出されている。本 xenograft モデルを用い、去勢抵抗性を獲得する前後で嚢胞液内のヒト由来の分泌タンパク質を網羅的に解析する。嚢胞液中のタンパク質で、ヒト由来であることが確認できるものを選択する。前立腺癌の細胞株や臨床検体を用いて validation を行う。候補として残ったタンパク質の ELISA の実験系を樹立する(既存のものがあれば利用する)。臨床の血清サンプルを用いてそのタンパク質の測定を行い、再発や臨床経過などを反映するか検討する。

4. 研究成果

KUCaP3 は嚢胞を形成する前立腺癌 PDX であり、その character は継代しても維持されている。3匹の KUCaP3 組織より嚢胞液および血清を抽出し、アルブミン等の高分子タンパクを除去した後、質量分析を行った。前処理および質量分析は田中らの報告に基づいて島津製作所と共同研究の形で行った。検出されたペプチド断片の情報に基づき、i) ヒト由来(=癌細胞由来)のタンパク ii) マウス由来のタンパク iii) 由来の鑑別の困難なもの の 3 群に分類し、前立腺癌のバイオマーカー候補を抽出した。嚢胞液から検出された 346 のタンパクのうち、ヒト由来が 52、マウス由来が 244、由来の鑑別が困難なものが 50 認められた (fig.1)。

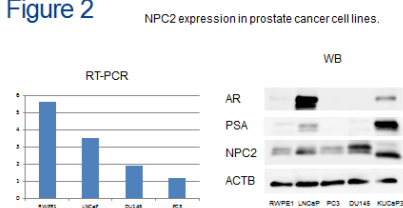
Figure 1



ヒト由来のタンパクのうち、7 分子は血清の質量分析においても検出された。これらの中には PSA の他、前立腺癌およびその他の癌で既にバイオマーカーとしての有用性を報告されているものが複数含まれており、本研究モデルの有用性を支持する結果であった。また、これまでバイオマーカーとしての報告のない分子も含まれていた。これらのうち、もっとも高濃度に発現が認められた NPC2 について更なる解析を行った。

代表的な前立腺癌細胞株での NPC2 の発現を見ると、RT-PCR においても Western blotting においても比較的悪性度の低いと考えられている細胞株では発現が高く、悪性度の高い前立腺癌細胞株では発現が低くなっていた (fig.2)。

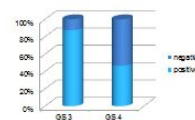
Figure 2



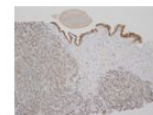
また前立腺癌の臨床組織から作成した Tissue microarray を用いた、NPC2 の免疫染色においても、Gleason 3 の組織の方が、Gleason 4 の組織よりも NPC2 を高く発現していた (fig.3)。

Figure 3

• Tissue Microarray



• Needle Biopsy



さらに前立腺の針生検で得られた組織を用いた免疫染色では、同一検体においても、正常の前立腺組織より癌の組織において発現が低下していることが確認された (Fig4)。これらの結果から、我々は NPC2 は前立腺癌の PDX を用いた網羅的探索から発見されたタンパク質であるが、前立腺癌の発癌および進展とともに失われるものであると考えた。前立腺癌組織は形態学的に、正常前立腺組織に認められる腺管構造が破綻していく傾向にあり、NPC2 と腺管構造の関係を解析した。正常前立腺細胞株とされる RWPE1 は 3D 培養

することにより腺管を形成することが知られている。我々は NPC2 に対する shRNA を用いて、NPC2 を stable knockdown した RWPE1 細胞株を作成した。これを用いて 3D 培養を行うと、NPC2 を knockdown した群において、有意に腺管形成が阻害された。

NPC2 は前立腺の腺管形成に関わる新規分子と思われたが、腫瘍マーカーとしての有用性は否定的であると思われた。今回リストに見つかったその他の蛋白質においても同様の解析を進めている。

また KUCaP3 は去勢を行うことで、一度腫瘍が消退し、再度大きくなるという性質を持っている（去勢抵抗性の獲得）。この去勢抵抗性を獲得した KUCaP3 の嚢胞と血清を用いて質量分析を行うことで、同様にタンパク質のリストが得られている。今回の研究期間においてはその発現や機能解析には至らなかったが、引き続き研究を進めていく予定である。

#### 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) Nakayama K, Inoue T, Sekiya S, Terada N, Miyazaki Y, Goto T, Kajihara S, Kawabata S, Iwamoto S, Ikawa K, Oosaga J, Tsuji H, Tanaka K, Ogawa O. The C-terminal fragment of prostate-specific antigen, a 2331 Da peptide, as a new urinary pathognomonic biomarker candidate for diagnosing prostate cancer. PLoS One. 2014 Sep 18;9(9):e107234. doi: 10.1371/journal.pone.0107234.

eCollection 2014.

2) Maeno A, Terada N, Uegaki M, Goto T, Okada Y, Kobayashi T, Kamba T, Ogawa O, Inoue T. Up-regulation of miR-582-5p regulates cellular proliferation of prostate cancer cells under androgen-deprived conditions. Prostate. 2014 ;74(16):1604-12.

3) Takayuki Goto, Naoki Terada, Takahiro Inoue, Kenji Nakayama, Takeshi Yoshikawa, Yu Miyazaki, Masayuki Uegaki, Yosuke Shimizu, Shinji Sumiyoshi, Takashi Kobayashi, Tomomi Kamba, Koji Yoshimura, Osamu Ogawa The Expression Profile of Phosphatidylinositol in High Spatial Resolution Imaging Mass Spectrometry as A Potential Biomarker for Prostate Cancer. PLoS One 2014 ;9(2):e90242. doi: 10.1371/journal.pone.0090242.

eCollection 2014.

4) Kobayashi T, Inoue T, Kamba T, Ogawa O. Experimental evidence of persistent androgen-receptor-dependency in castration-resistant prostate cancer. Int J Mol Sci. 2013 Jul 26;14(8):15615-35.

doi: 10.3390/ijms140815615. Review.

5) Inoue T, Kinoshita H, Inui H, Komai Y, Nakagawa M, Oguchi N, Kawa G, Sugi M, Ohe C, Miyasaka C, Nakano Y, Sakaida N, Uemura Y, Matsuda T. Pathological outcomes of Japanese men eligible for active surveillance after radical prostatectomy. Int J Clin Oncol. 2014 19: 379-383

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 吉川武志、井上貴博ほか「臨床検体由来のマウス異種移植片を用いた、蛋白質質量分析による前立腺癌新規バイオマーカーの同定」、日本癌学会学術総会、2012年9月21日、北海道札幌市
- 2) 吉川武志、井上貴博ほか「臨床検体由来のマウス異種移植片を用いた、蛋白質質量分析による前立腺癌新規バイオマーカーの同定」、第101回日本泌尿器科学会総会、2013年4月26日、北海道札幌市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井上 貴博 (Inoue, Takahiro)  
京都大学医学研究科・講師  
研究者番号：80511881

##### (2) 研究分担者

松井 喜之 (Matsui, Yosshiyuki)  
京都大学医学研究科・講師  
研究者番号：00582107

山崎 俊成 (Yamazaki, Toshinari)  
京都大学医学研究科・助教  
研究者番号：00607749

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

(3) 連携研究者

(        )

研究者番号：