

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592419

研究課題名(和文) 前立腺癌における神経ペプチドMANSERINの機能解析

研究課題名(英文) The evaluation of the function with Manserin in prostate cancer

研究代表者

曽我 倫久人(SOGA, NORIHITO)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍医化学部・研究員

研究者番号：60332714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Manserinは、前立腺癌株LNCaPにおいて高発現し、その亜株であるF10においては低発現であり、細胞株により差が存在した。また、LNCaPにおいては血管内皮増殖因子を伴う神経内分泌誘導を行い、亜株であるF10においては細胞増殖を誘発した。Manserinは、細胞株により作用が異なり、血管新生と細胞増殖といった癌進展を誘発する複数の機能を有していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The expression levels of manserin were quite different in LNCaP cells and sublines, high level in LNCaP and relative low level in F10. Additionally, manserin may induce NE differentiation in LNCaP cells associated with increased expression of vascular endothelial growth factor, but stimulated proliferation in F10 cells. Therefore, our data supported that manserin contributed to cancer progression via multiple functions, including stimulation of angiogenesis and proliferation.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 神経内分泌分化 マンセリン 細胞増殖 血管新生

1. 研究開始当初の背景

High risk 前立腺がん(Prostate cancer : PCa) もしくは、標準的治療であるホルモン治療に対して耐性を獲得した状態では、高率に前立腺がん細胞自体が Neuroendocrine differentiation(NED) を起こし、がん細胞の進展に関与していると考えられている。

今までのところ、神経内分泌物質である、Neuron specific enolase (NSE) や、Chromogranin A (CgA) が、予後を予測する因子として役割が認識されているのみであり、NED を発症した Pca から分泌される様々な神経内分泌物質の作用の詳細は現在の所明確にはなっていない。

今回、神経内分泌物質として注目している蛋白は、我々が新規にクローニングした manserin であり、CgC に分類される蛋白 Secretogranin II を先駆蛋白とし、その下流に存在する 40amino acid のタンパク質である。その存在が確認されたばかりでその役割などは明確でないが、十二指腸粘膜の先端部の apoptosis が誘導されている細胞において、manserin が過剰に発現している事が確認されている。

我々は今までに、前立腺生検組織における免疫組織染色において、Gleason score が高値であるほど manserin の発現率が高値であることを確認した。また、ホルモン治療を行った症例での検討では、manserin が高発現している症例において、有意に prostate specific antigen(PSA) 再発率が高値であることを確認した。また、多変量解析においても、manserin の発現が PSA 再発の有意な危険因子であった。以上のことより、manserin は、組織悪性度と相関し、その発現率は、ホルモン治療における PSA 再発を予測するものと考えられた。

しかし、manserin の発現のメカニズム、

作用は明らかではなく、その発現及び機能解析が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、manserin の細胞株別の発生量の比較、及び細胞での機能を検証することである。また、がん細胞への作用を解析し、manserin の産生、作用を抑制することが分子標的治療の標的になりうるかの検証を行う。

3. 研究の方法

[方法 1 : 細胞株別の manserin の発現量の比較]

LNCaP (アンドロゲン感受性株)、その亜株 F10、E9 (LNCaP から分離したアンドロゲン低感受性株)、AIDL (LNCaP から分離したアンドロゲン非感受性株) を使用し、それぞれの細胞株での manserin の発現の比較を行う。

[方法 2 : Manserin の作用 (細胞増殖、細胞培養液中への蛋白の排出量の変化、細胞内蛋白の変化)]

LNCaP (Manserin 高発現株)、F10 (Manserin 低発現株) を使用する。それぞれの細胞株にマンセリンを作用させ、細胞増殖 (cell viability assay) の変化を評価する。また、培養液中への蛋白排泄量の変化 [PSA, vascular endothelial growth factor (VEGF)] を、ELISA を使用して確認する。細胞内蛋白 [PSA, NSE, androgen receptor (AR)] の変化は、western blotting にて評価する。

[方法 3 : Manserin に関わる細胞内シグナルの解明]

Manserin の作用が、いかなる細胞内シグナルを利用しているかを解明するために、western blotting にて評価する。評価するシグナルは、PI3-AKT, MAP(Erk) シグナルである。

4. 研究成果

[主題 1: 細胞株別の manserin の発現相違]

前立腺がん細胞株における、manserin の発現量の比較を行った。LNCaP において、manserin の発現は高値であり、E9 においては同程度、F10, AIDL においては低値であった。以後の実験系においては、manserin 高発現株として LNCaP を、manserin 低発現株として F10 を使用した。

[主題 2 : Manserin による分子細胞学的作用]

Manserin は LNCaP の細胞増殖を抑制する一方で、F10 においては細胞増殖を促進した。また、LNCaP において培養液中の PSA 量及び、細胞内 PSA の発現量を低下させることを確認した。また、神経内分泌様分化誘導として、manserin が、LNCaP において NSE 及び、VEGF の発現量を増加させた。F10 においては、細胞外への排出、細胞内での産生共に、manserin による変動は無かった。AR の発現は、両細胞株において変化は確認できなかった。

[主題 3: Manserin に関わる細胞内シグナルの解明]

Manserin の作用に關与する細胞内シグナルを解明するために、MAP kinase の Erk signal 及び、PI3kinase AKT signal の増減を確認した。しかし、LNCaP, F10 細胞において、Phospho-Erk 及び Phospho-Akt の活性は、manserin 付加による変動は無かった。以上のことより、manserin は、MAP kinase の Erk signal 及び、PI3kinase AKT signal 以外の signal を利用して、細胞に作用していることが類推された。

総合的に、manserin は、細胞株依存的に複数の作用を有し、細胞増殖、それを補助する形で VEGF の産生増加による血管新生を誘導し、がんの進展に促進的な作用を誘発していることが確認された。

そのことより、manserin の産生、作用を抑制することが、分子標的治療薬の標的になる可能性が示唆された。

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 10 件)

- 1) Soga N, Yatabe Y, Ogura Y, Hayashi N. The additional central side biopsy of peripheral zone associated with first endorectal standard sextant pattern improved accuracy of prostate cancer detection in Japanese cases. Current urology, in press (査読あり)
- 2) Terao C, Terada N, Matsuo K, Kawaguchi T, Yoshimura K, Hayashi N, Shimizu M, Soga N, Takahashi M; Nagahama Cohort Study Group, Kotoura Y, Yamada R, Ogawa O, Matsuda F. A genome-wide association study of serum levels of prostate-specific antigen in the Japanese population. J Med Genet, 51: 530-536, 2014. (査読あり)
- 3) 曾我 倫久人, TNM 分類 II 期の前立腺癌の治療法. 臨床泌尿器, 68: 225-229, 2014. (査読なし)
- 4) 曾我 倫久人, 泌尿器科診療ベスト NAVI: 前立腺癌. 臨床泌尿器, 67: 271-272, 2013. (査読なし)
- 5) 曾我 倫久人, 泌尿器科診療ベスト NAVI: 前立腺肥大症. 臨床泌尿器, 67: 268-270, 2013. (査読なし)
- 6) Nishikawa K, Soga N, Ishii K, Kato

- M, Iwamoto Y, Hori Y, Etoh M, Ohkawara T, Yamada T, Uchida K, Kise H, Arima K, Narita M, Shiraishi T, Sugimura Y. Manserin is the novel neuroendocrine marker to predict PSA biochemical failure in advanced prostate cancer. Urologic oncology, 13: 787-795, 2013. (査読あり)
- 7) Tomita N, Soga N, Ogura Y, Hayashi N, Shimizu H, Kubota T, Ito J, Hirata K, Ohshima Y, Tachibana H, Kodaira T. Preliminary Analysis of Risk Factors for Late Rectal Toxicity after Helical Tomotherapy for Prostate Cancer. J Radiat Res, 54: 919-924, 2013. (査読あり)
- 8) Tomita N, Soga N, Ogura Y, Hayashi N, Shimizu H, Kubota T, Ito J, Hirata K, Ohshima Y, Tachibana H, Kodaira T. Preliminary results of intensity modulated radiation therapy with helical tomotherapy for prostate cancer. J Cancer Res Clin, 138: 1931-1936, 2012. (査読あり)
- 9) Soga N, Hori Y, Ogura Y, Hayashi N, Sugimura Y. The long term results With delayed-combined androgen blockade therapy in local or locally advanced prostate cancer. Jpn J Clin Oncol, 42: 534-540, 2012. (査読あり)
- 10) 西川 晃平、菅我 倫久人、三木 学、舛井 覚、堀 靖英、吉尾 裕子、長谷川 嘉弘、神田 英輝、山田 泰司、有馬 公伸、杉村 芳樹. ミニマム創内視鏡下手術による前立腺全摘除の経験. 日本ミニマム創泌尿器内視鏡外科学会雑誌. 4:35-39, 2012.
- (査読なし)
- 〔学会発表〕(計 15 件)
- 1) 第 52 回日本癌治療学会(平成 26 年 8 月 28 日 - 29 日・横浜市)
前立腺癌での LH-RH agonist による抗アンドロゲン治療中再発に対する antagonist の効果
菅我 倫久人、小倉 友二、林 宣男
- 2) 第 52 回日本癌治療学会(平成 26 年 8 月 28 日 - 29 日・横浜市)
前立腺癌に対する I-125 密封小線源永久挿入療法の治療成績
小倉 友二、菅我 倫久人、林 宣男
- 3) 第 56 回三重泌尿器科医会(平成 26 年 7 月 5 日・津市)
前立腺生検組織における異型小腺房増殖 (atypical small acinar proliferation : ASAP) 同定後の再生検方法に関する検討
菅我 倫久人、谷田部 恭、小倉 友二、林 宣男
- 4) 第 56 回三重泌尿器科医会(平成 26 年 7 月 5 日・津市)
標準 6 カ所生検に内側生検追加する systemic 前立腺生検での陰性例における、template saturation biopsy による残存腫瘍部位の検証
菅我 倫久人、谷田部 恭、小倉 友二、林 宣男
- 5) 第 102 回日本泌尿器科学会総会(平成 26 年 4 月 24 日-27 日・神戸市)
愛知県がんセンターにおける I-125 密封小線源永久挿入単独療法の検討
小倉 友二、菅我 倫久人、林 宣男
- 6) 第 102 回日本泌尿器科学会総会(平成 26 年 4 月 24 日-27 日・神戸市)
前立腺がんにおける新規神経内分泌

物質 manserin の作用.

曾我 倫久人、石井 健一朗、西川 晃平、小倉 友二、林 宣男、成田 正明、杉村 芳樹

- 7) 第3回日本泌尿器病理研究会(平成26年3月28日・新橋)
前立腺標準6カ所生検に内側生検を加えることによる、がん検出率への影響.
曾我 倫久人、谷田部 恭、小倉 友二、林 宣男
- 8) 第3回日本泌尿器病理研究会(平成26年3月28日・新橋)
前立腺生検組織における異型小腺房増殖(atypical small acinar proliferation: ASAP)同定後の再生検としての、経会陰的多数箇所生検の役割.
曾我 倫久人、谷田部 恭、小倉 友二、林 宣男
- 9) 第63回日本泌尿器科学会中部総会(平成25年11月28日-30日・名古屋市)
前立腺標準6カ所生検に内側生検を加えることによる、がん検出率への影響.
曾我 倫久人、谷田部 恭、小倉 友二、林 宣男
- 10) 第51回日本癌治療学会学術集会(平成25年10月24日-26日・京都市)
テンプレートを用いた経会陰的前立腺 saturation 検の検討.
小倉 友二、**曾我 倫久人**、林 宣男
- 11) 第72回日本癌学会学術総会(平成25年10月3日-5日・横浜)
Evaluation of the function of Manserin in prostate cancer
Soga N, Ishii K, Hayashi N, Sugimura Y
- 12) 第54回三重泌尿器科医会(平成25

年7月6日・津市)

経直腸的前立腺生検における、標準6カ所生検に内側生検を追加する有益性

曾我 倫久人、谷田部 恭、小倉 友二、林 宣男

- 13) 108th Annual AUA Congress (平成25年5月4日-8日・San Diego)
The impact of prostate cancer Gleason score variations depended on pathologists for clinical risk classification after Gleason grading consensus decided by international society of urological pathology (ISUP: 2005)
Soga N, Yatabe Y, Ogura Y, Hayashi N
- 14) 第101回日本泌尿器科学会総会(平成25年4月25日-28日・札幌市)
Gleason score grading コンセンサス(2005年)以後の、前立腺生検組織における院外病理医と院内病理医の Gleason score の相違が、臨床病期 risk 分類に与える影響
曾我 倫久人、谷田部 恭、小倉 友二、林 宣男
- 15) 第2回日本泌尿器病理研究会(平成25年2月2日・新橋)
Gleason score grading コンセンサス(2005年)以後の、前立腺生検組織における院外病理医と院内病理医の Gleason score の相違が、臨床病期 risk 分類に与える影響.
曾我 倫久人、谷田部 恭、小倉 友二、林 宣男

6 . 研究組織

(1)研究代表者

曾我倫久人 (Norihito, Soga)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍医化学部・研究員

研究者番号 : 60332714

(2)研究分担者

成田 正明 (Narita, Masaaki)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 80302404

杉村芳樹 (Sugimura, Yoshiki)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 90179151

石井健一郎 (Ishii, Kenichiro)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 90397513

(3)連携研究者

なし