

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462501

研究課題名(和文) 前立腺癌の悪性度と関連する legumain の機能解明と治療への応用

研究課題名(英文) Identification of the function of legumain in prostate cancer

研究代表者

大野 芳正 (Ohno, Yoshio)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40266482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌細胞の浸潤・転移形成におけるレグメインの役割について検討した。浸潤能試験では、レグメイン遺伝子をノックダウンによる浸潤能に差は認めなかった。また低酸素下でのレグメイン発現に変化が認められなかった。このため慢性低酸素状態での検討が必要と考え、低酸素(1% O<sub>2</sub>下)で6ヶ月以上継代培養し低酸素耐性株を作成した。低酸素耐性株ではレグメイン発現が増加しており、今後さらに解析を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：Legumain is highly expressed in prostate cancer and other solid tumors and is a potential anticancer target. Here we investigated the role of legumain in invasion and metastasis in prostate cancer cell lines. In vitro invasion assay did not show significant difference in invasive ability regardless of legumain expression level. In addition, hypoxic condition did not change legumain mRNA expression in prostate cancer cells. Therefore, we need experiment under chronic hypoxic condition and established hypoxia resistant prostate cancer cell line by continuous cultivation over 6 months. Legumain expression on mRNA level in hypoxia resistant cell lines was higher than that in parental cell lines. We have a plan of further study.

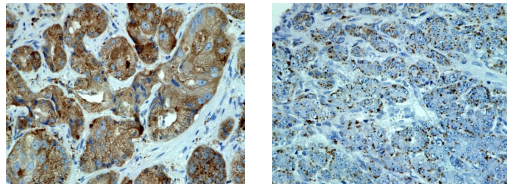
研究分野：泌尿器科癌

キーワード：前立腺がん レグメイン 浸潤 低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

(1)我々は前立腺癌患者の血清を用いたプロテオーム解析を行い、悪性度や病期の進行に関与する分子として30種の候補分子を同定している。骨転移患者の治療前血清中に上昇しているものの一つとして Legumain (asparaginyl endopeptidase) が同定されている。前立腺癌に関しては Liu ら (Cancer Res, 63: 2957, 2003) の報告の中に高率に発現していることが記載されていたのみである。前立腺癌における悪性度や予後との関連などについての詳細な研究はこれまでに行われていなかった。

(2)前立腺癌組織マイクロアレイ(US Biomax Inc.)を用いた免疫染色では、legumain 陽性小胞の細胞内局在などの特徴によって cytoplasmic staining pattern と vesicular staining pattern の2つのタイプに大きく分けられることが判明した。グリソスコアとの関連では悪性度が高くなるにつれて vesicular staining pattern が優位になることが認められた。



cytoplasmic pattern      vesicular pattern

(3) Legumain は自己触媒作用を有する酵素であり、低酸素、酸性条件下で活性化することが明らかにされている。大腸癌細胞の研究では、浸潤先端の偽足に局在すること、また progelatinase A を活性化することにより細胞外基質を分解し浸潤に関わることが分かっている。大腸癌、乳がんでは癌の進展や予後に関与することが報されている。このような特性をもとに doxorubicin などの prodrug が開発され、乳がんなどで研究が進められている。

## 2. 研究の目的

- (1)前立腺癌における legumain の発現と浸潤能との関連を明らかにすること。
- (2)低酸素状態での legumain の発現変化について明らかにすること
- (3)骨転移形成における legumain の発現と機能について明らかにすること。
- (4)低酸素耐性前立腺癌細胞株の作成とレグメインの発現について

## 3. 研究の方法

- (1)使用細胞株  
前立腺癌細胞株 (PC-3, DU-145, LNCaP, C4-2)
- (2) Legumain mRNA の発現  
High-Capacity RNA-to-DNA Kit (Applied Biosystems)を用いて cDNA とし、Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) でリアルタイム PCR を行い発現遺伝子の半定量を行った。使用した RTPCR システムは StepOnePlus System (Applied Biosystems)

である。内因性コントロールとして アクチン mRNA を用いて comparative Ct method を用いて発現量を比較した。

正常群、低酸素培養群、pH5 培養群での発現について比較検討した。

### (3) Western blot analysis

20 µg の蛋白をサンプルとして SDS-PAGE を行った後にメンブレンに転写し、抗レグメイン抗体 (goat anti-human legumain antibody, R&D Systems) を用いて染色した。レグメインの発現量は アクチンを用いて半定量した。

### (4)インビトロ浸潤能試験

8µm pore の 24 well BioCoat Matrigel Invasion Chamber を用いて使用説明書に準じて浸潤能を測定した。すなわち  $2.5 \times 10^4$  細胞/well の濃度でインキュベーションし、24 時間後、48 時間後に測定とした。浸潤細胞は、メンブレン上面の非浸潤細胞を除去し、メタノールで固定したのち 4% クリスタルバイオレットで染色しメンブレン裏側の浸潤細胞をカウントした。データはコントロールインサートメンブレンに対する % 浸潤で表した。

### (5)レグメインノックダウン

Legumain siRNA(h) (Santa Cruz Biotechnology, USA) および siRNA reagent system (Santa Cruz Biotechnology, USA) を使用。マニュアルの条件に従って legumain 遺伝子をノックダウンした。

### (6)骨髄移植腫瘍

PC-3, DU145 細胞を使用。マウスは NOD/SCID および BALBc nu/nu である。  $3 \times 10^5/20\mu\text{L}$  に調整した細胞浮遊液をマウス腓骨近位より 26G 針を用いて骨髄内に移植した。

### (7)免疫組織化学

前立腺全摘ホルマリン固定パラフィン標本を用いて、抗レグメイン抗体を用いて免疫染色を行った。発色は ABC 法を用いて行った。レグメインは 10% 以上の細胞が染色されているものを陽性と判定した。

### (8)低酸素耐性株の作成

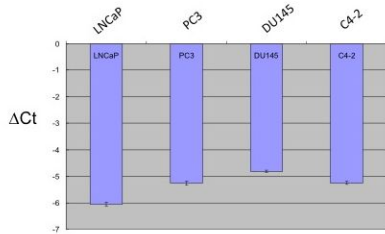
前立腺癌細胞株 PC-3, DU-145, LNCaP を使用。マルチガスインキュベーターを用いて低酸素状態 (2% O<sub>2</sub>) で 6 ヶ月以上継代培養して低酸素耐性株を作成した。樹立した低酸素耐性株と親株との細胞増殖能、レグメインの発現について検討した。

## 4. 研究成果

### (1)前立腺がん細胞株における legumain の発現

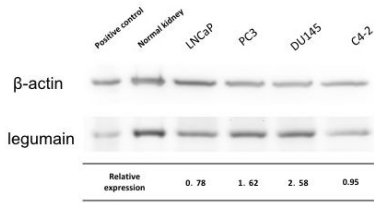
正常酸素および低酸素 (5% O<sub>2</sub>) 濃度下での legumain の発現について検討した。80% confluent 状態になったところで RNA を回収し legumain mRNA の発現を Real-time PCR を用いて comparative Ct 法にて評価した。以前の解析と同様に正常酸素濃度下では DU-145 で最も高く、次いで PC3, C4-2, LNCaP の順であった(図 1)。また蛋白レベルでの発現も同様に確認された(図 2)

【図 1 legumain expression at mRNA level】



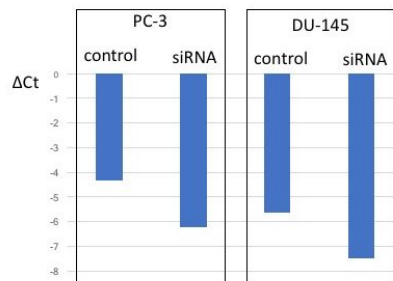
【図 2 legumain expression at protein level】

(2)インビトロ浸潤能試験



使用した細胞株は PC3 と DU145 である。siRNA により legumain をノックダウンし、コントロール細胞と比較した。siRNA によるノックダウンについては予備実験にて legumain mRNA の発現低下を確認しておいた。PC3 で 50%、DU145 で 30%の減少が認められた。

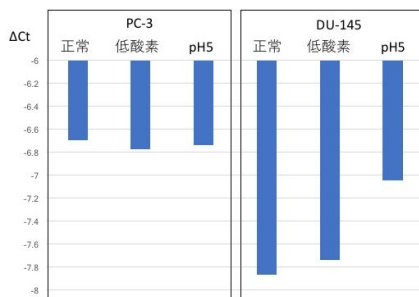
【図 3】 siRNA による legumain ノックダウン



24 時間後および 48 時間後の% invasion は untreated PC3 で 12%、35%、untreated DU145 で 15%、40%であった。一方 knocked down PC3 では 13%、30%、knocked down DU145 で 12%、38%とほとんど差を認めなかった。

(3) 低酸素下でのレグメインの発現の検討 5%酸素下および pH5 下での培養を行ったが、DU145、PC3 legumain mRNA の発現は、いずれの細胞でも確認された。しかし発現量の差は認められなかった (図 4)。

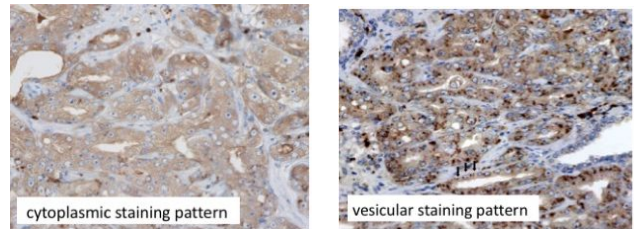
【図 4】



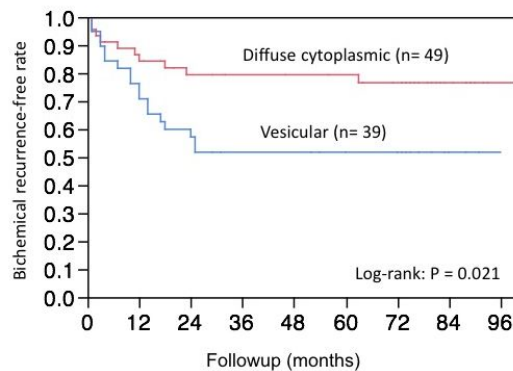
(4)レグメインの発現と予後との関連 前立腺全摘除術検体を用いた検討では、legumain 陽性小胞の細胞内局在などの特徴によって cytoplasmic staining pattern (図 5) と vesicular staining pattern (図 6) の 2 つのタイプに大きく分けられることが判明した。またこの vesicular pattern は、high Gleason score、前立腺皮膜外浸潤、神経周囲浸潤、腫瘍最大径、および PSA 再発率 (図 7) と関連することがわかった。ホルモン治療例におけるレグメイン発現と予後との関連については不明であった。

【図 5】

【図 6】



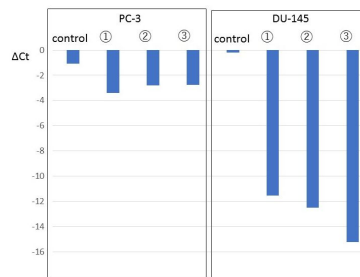
【図 7 PSA 非再発率】



(5) 骨髄移植腫瘍におけるレグメインの発現

細胞株は PC3 と DU145 である。3 × 10<sup>5</sup>/20μL に調整した細胞浮遊液を脛骨骨頭より骨髄内に移植した。NOD/SCID に対する腫瘍形成率は PC3 90%、C4-2 80%であった。Real-time PCR 法による legumain 発現量は移植腫瘍において高度に低下していた (図 8)。

【移植腫瘍におけるレグメインの発現】

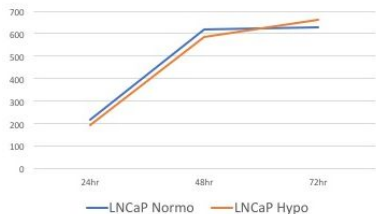


(6) 低酸素耐性株の作成

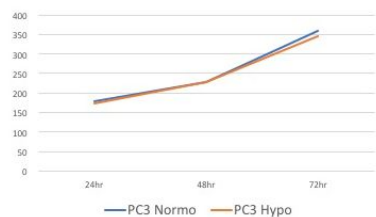
前立腺癌細胞株 PC-3、DU-145、LNCaP を使用。マルチガスインキュベーターを用いて低酸素状態 (2% O<sub>2</sub>) で 6 ヶ月以上継代培養して低酸素耐性株を作成した。アラマブルーを用いた細胞増殖能は LNCaP (図 9) と PC-3 (図

10)では親株と耐性株に差を認めなかったが、DU145(図 11)では耐性株の法がやや増殖能が増加していた。

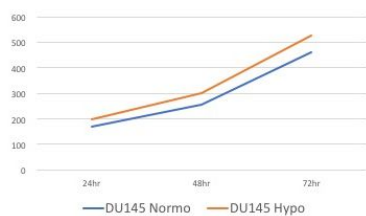
【図 9 LNCaP の親株と耐性株の増殖曲線】



【図 10 PC-3 の親株と耐性株の増殖曲線】

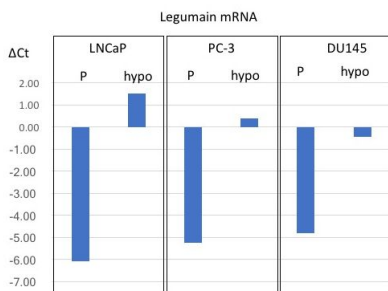


【図 11 DU145 の親株と耐性株の増殖曲線】



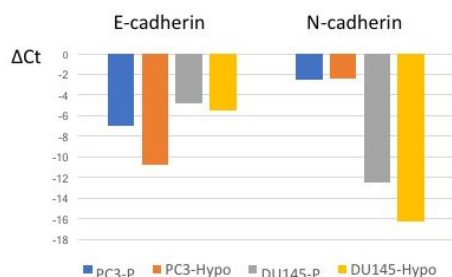
レグメインの発現はいずれの細胞株でも低酸素耐性株で発現が増加していた(図 12)。

【図 12 低酸素耐性株におけるレグメインの発現】



また PC3 と DU145 について上皮間葉移行が見られるかを E-cadherin と N-cadherin の発現を real-time PCR で半定量して比較した。耐性株では E-cadherin の発現減少がやや認められた(図 13)。

【図 13 耐性株における cadherin 遺伝子発現の変化】



## 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 7 件)

Hirasawa Y, Nakashima J, Sugihara T, Takizawa I, Gondo T, Nakagami Y, Horiguchi Y, Ohno Y, Namiki K, Ohori M, Tachibana M, Development of a nomogram for predicting severe neutropenia associated with docetaxel-based chemotherapy in patients with castration-resistant prostate cancer. Clin Genitourin Cancer 15:176-181, 2017. DOI: 10.1016/j.clgc.2016.05.012 査読有り

Hirasawa Y, Ohno Y, Nakashima J, Shimodaira K, Hashimoto T, Gondo T, Ohori M, Tachibana M, Yoshioka K, Impact of preoperatively estimated prostate volume using transrectal ultrasonography on surgical and oncological outcomes in a single surgeon's experience with robot-assisted radical prostatectomy. Surg. Endosc.30:3702-8, 2016.

DOI: 10.1007/s00464-015-4664-1 査読有り

Hamada R, Nakashima J, Ohori M, Ohno Y, Komori O, Yoshioka K, Tachibana M, Preoperative predictive factors and further risk stratification of biochemical recurrence in clinically localized high-risk prostate cancer. Int J Clin Oncol. 21:595-600, 2016. DOI: 10.1007/s10147-015-0923-3 査読有り

Ohno Y, Ohori M, Nakashima J, Okubo H, Satake N, Hashimoto T, Tachibana M, Association between preoperative serum total cholesterol level and biochemical recurrence in prostate cancer patients who underwent radical prostatectomy. Mol Clin Oncol.4:1073-77, 2016. DOI: 10.3892/mco.2016.831 査読有り

Ohno Y, Ohori M, Nakashima J, Okubo H, Satake N, Takizawa I, Hashimoto T, Hamada R, Nakagami Y, Yoshioka K, Tachibana M, Association between ABO blood groups and biochemical recurrence after radical prostatectomy. Int J Clin Exp. Medicine. 15:2642-8, 2015.

査読有り

Okubo H, Ohori M, Ohno Y, Nakashima J, Inoue R, Nagao T, Tachibana M,

Prediction of non-biochemical recurrence rate after radical prostatectomy in a Japanese cohort: development of a postoperative nomogram. Int J Urol, 21:479-83, 2014.

査読有り

Ohno Y, Nakashima J, Izumi M, Ohori M, Hashimoto T, Tachibana M, Association of legumain expression pattern with prostate cancer invasiveness and aggressiveness. World J Urol. 31:359-64, 2013.

DOI: 10.1007/s00345-012-0977-z

査読あり

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0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:

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

大野 芳正 (OHNO, Yoshio)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 40266482

### (2) 研究分担者

中島 淳 (NAKASHIMA, Jun)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10167546

橘 政昭 (TACHIBANA, Masaaki)

東京医科大学・医学部・兼任助教

研究者番号: 70129526

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )