

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16771

研究課題名(和文) 前立腺癌の微小環境における高分子量ヒアルロン酸の腫瘍生物学的意義

研究課題名(英文) Significance of hyaluronan in the microenvironment of prostate cancer

研究代表者

佐藤 天童 (Sato, Tendo)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60749571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒアルロン酸の分子量に着目し、前立腺癌におけるヒアルロン酸発現の意義について検討した。手術標本を採集し、ヒアルロン酸を高速液体クロマトグラフィーで解析すると、分子量150Kのヒアルロン酸を中心とした分布であることが判明した。また、高リスク前立腺癌で低分子ヒアルロン酸の割合が多い可能性が示唆された。また、新規に同定されたTMEM2の発現と前立腺癌の悪性度の関連性をパラフィン切片を用いて検討したが、前立腺癌ではTMEM2は悪性度に関与していない可能性が示唆された。TMEM2ノックアウトマウスは作成が終わり、これから検討を開始する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、前立腺癌におけるヒアルロン酸の発現意義について検討した。癌の悪性化には癌とその周囲の微小環境の関与が注目されており、組織内に大量に存在するヒアルロン酸の役割は重要である。しかし、測定が容易ではないため、その役割は未解明であった。今回、我々は組織内の分子量分とその分解酵素の発現を検討することにより、高リスク前立腺癌におけるヒアルロン酸の分子サイズと、ヒアルロン酸分解酵素の局在を検討することができた。更にノックアウトマウスが作成されたことから、今後更なるメカニズムの解明が進むことが予想され、社会的意義は大きいものと考えられる。

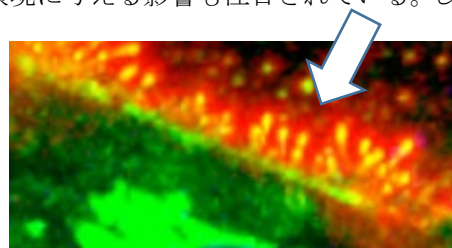
研究成果の概要(英文)：Hyaluronan (HA), a major glycosaminoglycan of the extracellular matrix, is a glycosaminoglycan (GAG) composed of repeating disaccharide units of glucuronic acid and N-acetylglucosamine. HA can act as an oncogenic component of the tumor microenvironment in many human malignancies. However, clinical implication of HA on prostate cancer remains unclear. We investigated the expression of HA and TMEM2 (transmembrane 2: a cell surface hyaluronidase) in prostate cancer. We found mainly 150K HA in the surgically resected prostate cancer samples. Also, low molecular HA was dominant in the high-risk prostate cancer. Immunohistochemical analysis showed that the low TMEM2 expression in the prostate cancer tissue. We successfully developed TMEM2 knockout mice and analyses of these mice are ongoing.

研究分野：泌尿器がん

キーワード：前立腺癌 ヒアルロン酸

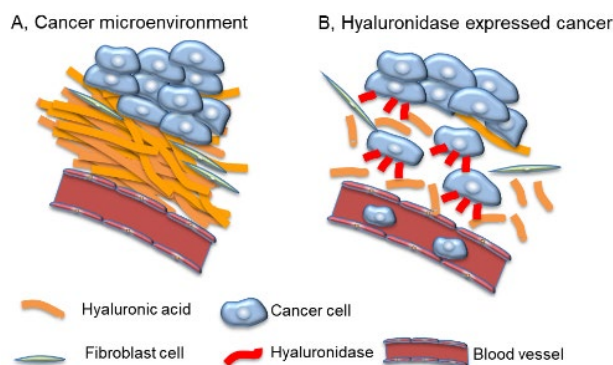
1. 研究開始当初の背景

ヒアルロン酸は癌の悪性度、浸潤能、転移能と密接に関連しているが、癌の種類や間質由来か腫瘍由来かによってその腫瘍生物学的意義が異なり、複雑なメカニズムが存在する。更にヒアルロン酸は巨大な分子を作るため、分子量の違いが癌の微小環境に与える影響も注目されている。しかし、癌の微小環境におけるヒアルロン酸は測定が容易でないため、いままで検討が進んでいなかった。よって、我々の教室の強みである糖鎖生物学の手法を持ちいて、前立腺癌組織内におけるヒアルロン酸分子量分布の測定による臨床的意義の検討を行った。また、共同研究施設である米国 Sanford Burnham Prebys Institute において、新規ヒアルロン酸分解酵素: TMEM2 が同定された^{1,2)}ことを受け、前立腺癌における TMEM2 発現の意義についても測定を計画した。



2. 研究の目的

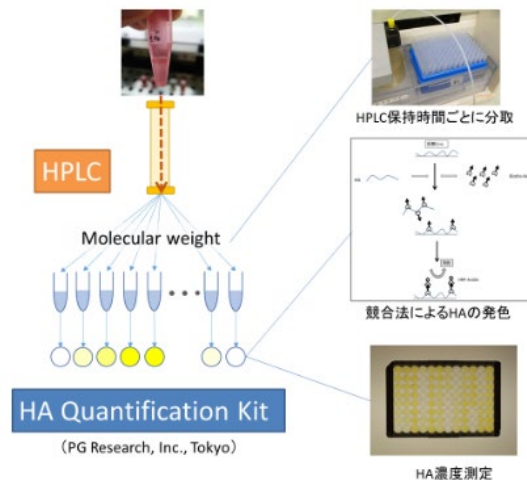
本研究では、ヒアルロン酸の分子量に着目し、前立腺癌における高分子量ヒアルロン酸発現の意義について糖鎖構造解析と免疫担当細胞を加えた癌微小環境再構築系で検討する。また、前立腺癌の微小環境におけるヒアルロン酸分解酵素: TMEM2 発現についても解析を行う。



3. 研究の方法

3-1. ヒト正常前立腺組織および前立腺癌組織におけるヒアルロン酸発現量を分子量別に定量する。前立腺全摘除術および膀胱全摘除術で得られた標本から 18G Biopsy needle で前立腺生検と同様の方法でサンプルを採集する。また、前立腺肥大症で得られた良性前立腺組織も採取する。さらに、ホルマリン固定パラフィン包埋切片からのヒアルロン酸抽出も試みる。

- 1) 検体の酵素分解 (アクチナーゼ、セルラーゼによりグリコサミノグリカンを回収する)
- 2) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により構成要素の分析、ならびに、分子量ごとの分画を回収する。
- 3) 分取された検体をヒアルロン酸測定キット (Hyaluronan Quantification Kit, PG リサーチ社) により、吸光度測定を行い、分子量別にヒアルロン酸の定量を行う。

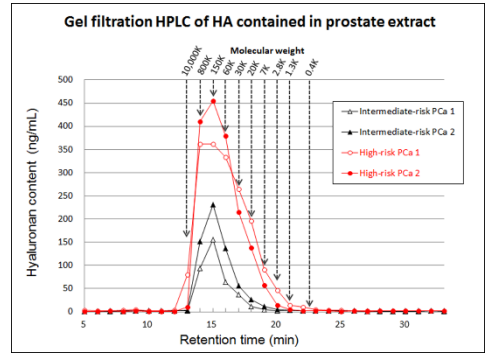


3-2. Laser capture microdissection(LCM)を用いてヒト正常前立腺組織およびヒト前立腺癌から間質と腺管、腫瘍部分に分けてサンプリングを行い、ヒアルロン酸を分子量別に定量する。

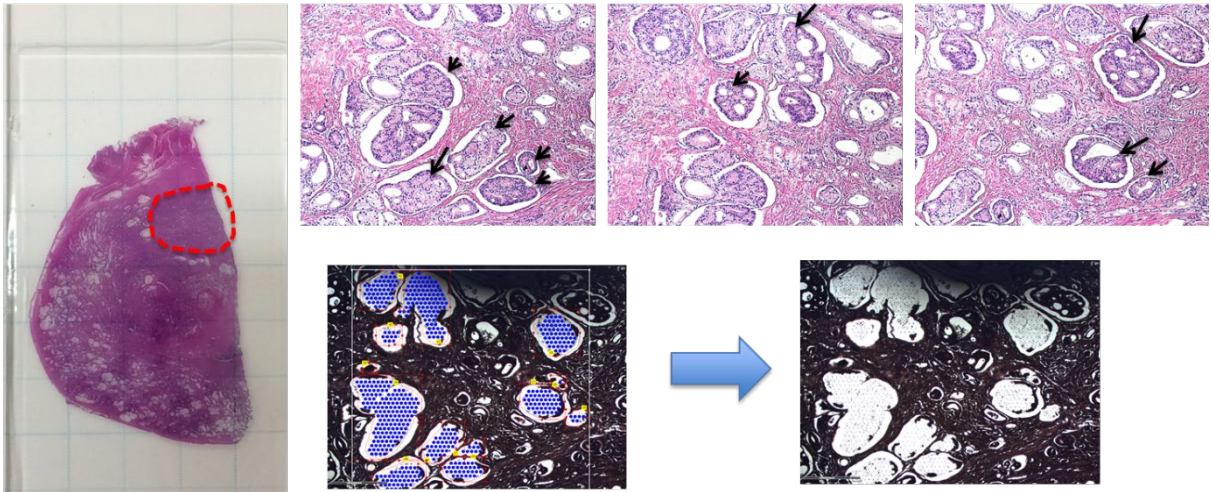
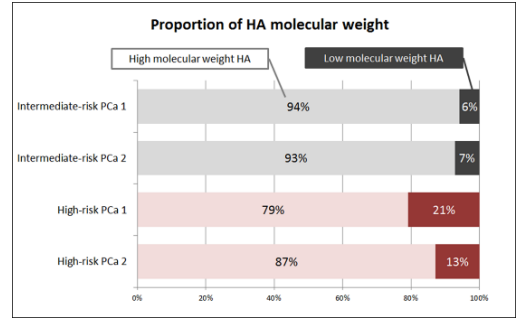
3-3. 前立腺癌における TMEM2 の発現を免疫組織化学染色法と RNA scope 法にて検討を行い、悪性度とも関連を検討する。また、前立腺癌細胞株を用いて、TMEM2 の発現を確認し、knockdown もしくはトランスフェクションを行い、担癌モデルで腫瘍増殖能の検討を行う。

4. 研究成果

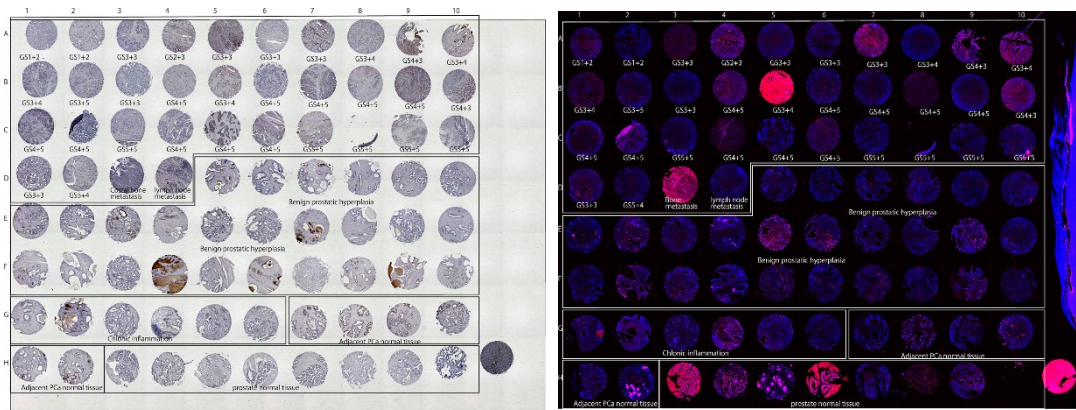
4-1. 手術標本からサンプルを採集し、ヒアルロン酸を高速液体クロマトグラフィーで解析するのに十分な量が含まれているかを確認することができた。さらに、ホルマリン固定パラフィン包埋切片からのヒアルロン酸抽出も試みたところ、処理過程での課題（薄切片のサンプル量が少なく、解析に十分な量を確保困難である点、パラフィン等の除去が容易でなく、測定が困難であることが判明した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片は今後の課題とし、まずは手術標本からのヒアルロン酸発現量定量化を試みた。その結果、分子量150Kのヒアルロン酸をピークとした分布であることが判明した。また、高リスク前立腺癌で低分子ヒアルロン酸の割合が多い可能性が示唆された。



4-2. Laser capture microdissection を用いて前立腺癌組織と正常組織を採取しヒアルロン酸の抽出を試みたが、ヒト前立腺組織から、正常、腫瘍部分に分けてサンプリングを行う場合、更にサンプル量が減るため、高感度の測定系を構築する必要があることが判明し本手法は改良が必要と判断し、現在も抽出法の改良を進めている。



4-3. 前立腺癌における TMEM2 の発現を免疫組織化学染色法と RNA scope 法にて検討を行った。USbioMx PR8011b Prostate Ca Tissue array を用いて様々な悪性度の前立腺癌を免疫染色すると、高悪性度の前立腺癌で染色性が強い傾向が得られたが、有意な差ではなかった。これは RNA scope を用いても同様な結果であった。

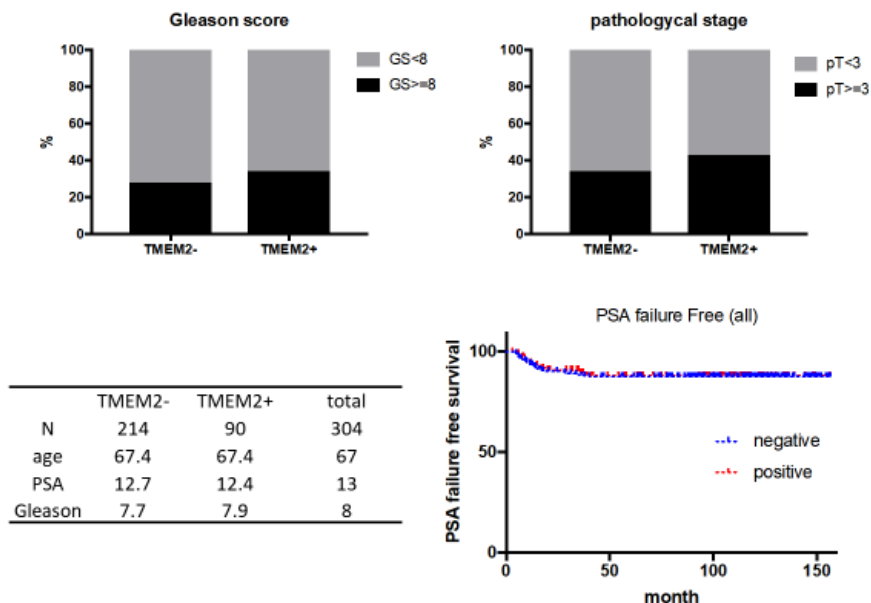


免疫組織化学染色

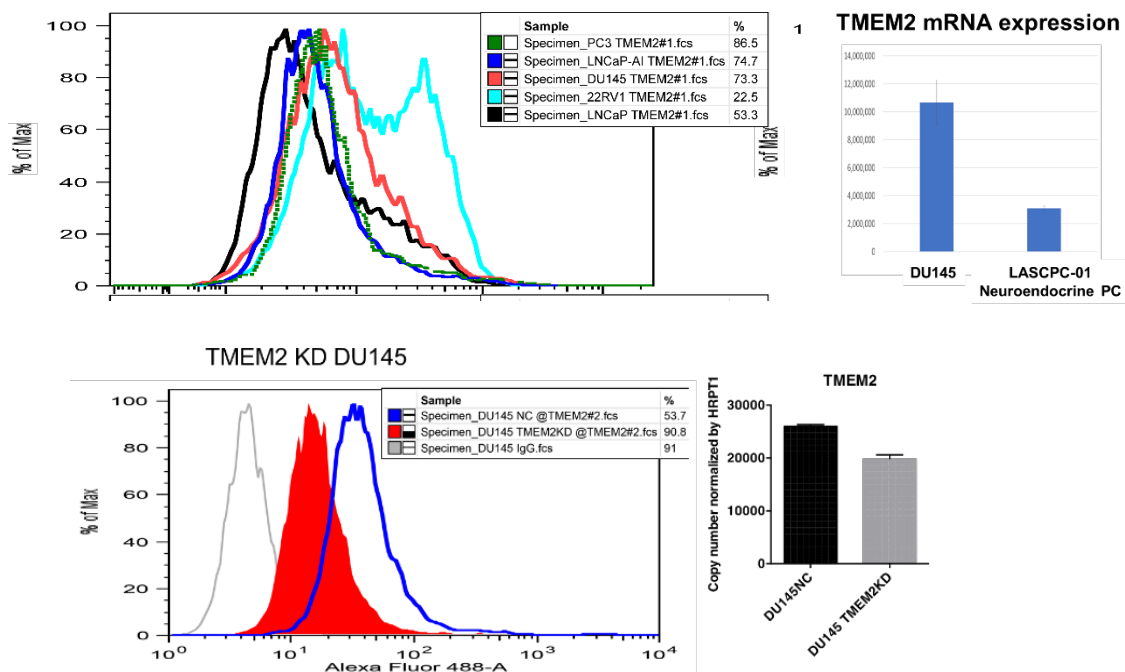
RNA scope

また臨床検体 304 例を用いた検討でも、グリソンスコア別に検討しても有意差は得られず、また TMEM2 陽性群と陰性群の予後に有意差はなく、TMEM2 の発現は前立腺癌の悪性度とは関係していない可能性が示唆された。

TMEM2 expression and pathological findings in prostate cancer



前立腺癌細胞株の TMEM2 発現を検討すると癌の悪性度が上がるにつれて TMEM2 の発現が減少する傾向がみられた。DU145 に TMEM2 発現が認められたため、shRNA を用いて stable knockdown 株 TMEM2 KD DU145 を樹立した。今後、ヌードマウスに移植し親株と腫瘍サイズの比較、腫瘍内の分子学的違いの検討を予定している。



文献：

- 1) Yamaguchi Y, Yamamoto H, Tobisawa Y, Irie F. TMEM2: A missing link in hyaluronan catabolism identified? *Matrix Biol.* 2019 May;78-79:139-146. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.020.
- 2) Yamamoto H, Tobisawa Y, Inubushi T, Irie F, Ohyama C, Yamaguchi Y. A mammalian homolog of the zebrafish transmembrane protein 2 (TMEM2) is the long-sought-after cell-surface hyaluronidase. *J Biol Chem.* 2017 May 5;292(18):7304-7313. doi: 10.1074/jbc.M116.770149.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Momota Masaki, Hatakeyama Shingo, Tokui Noriko, Sato Tendo, Yamamoto Hayato, Tobisawa Yuki, Yoneyama Tohru, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Koie Takuya, Narita Satoshi, Kawaguchi Toshiaki, Ohyama Chikara	4. 巻 S2405-4569(18)
2. 論文標題 The Impact of Preoperative Severe Renal Insufficiency on Poor Postsurgical Oncological Prognosis in Patients with Urothelial Carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Urology Focus	6. 最初と最後の頁 30081-30086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.euf.2018.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Horiguchi Hirotaka, Yoneyama Takahiro, Hatakeyama Shingo, Tokui Noriko, Sato Tendo, Fujita Naoki, Yamamoto Hayato, Tobisawa Yuki, Yoneyama Tohru, Hashimoto Yasuhiro, Koie Takuya, Yoshikawa Kazuaki, Narita Satoshi, Kawaguchi Toshiaki, Ohyama Chikara	4. 巻 35
2. 論文標題 Impact of bacillus Calmette?Gu?rin therapy of upper urinary tract carcinoma in situ: comparison of oncological outcomes with radical nephroureterectomy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Oncology	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12032-018-1102-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----