

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592391

研究課題名(和文) 前立腺癌の神経内分泌分化に関わる新規バイオマーカーの同定と診断・治療への応用

研究課題名(英文) Identification and clinical application of novel biomarkers for neuroendocrine differentiation of prostate cancer

研究代表者

松原 昭郎 (Matsubara, Akio)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：10239064

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)：CAST法を用いて、前立腺癌の進展に關与する分泌蛋白・膜蛋白群を同定した。それらの分子群およびその関連蛋白について、細胞生物学的解析を行い、去勢抵抗性獲得および神経内分泌分化の分子機構解明の手掛かりとした。さらに、前立腺癌組織におけるそれらの発現を解析、血清濃度を測定して、前立腺癌症例の臨床病理学的背景との関連を明らかにし、前立腺癌の新規バイオマーカーとしての可能性について提唱した。

研究成果の概要(英文)：Mechanism of molecules identified by CAST method in castration-resistance and neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells have been investigated through cell-biological analysis, and the possibility as novel biomarkers of these molecules have been suggested through the experiments for expression in prostate cancer tissues and the measurement of serum concentration.

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 去勢抵抗性 RegIV

1. 研究開始当初の背景

ホルモン療法は進行性前立腺癌に対するきわめて有効な治療選択肢であるが、治療経過とともに去勢抵抗性となって再燃する。この去勢抵抗性への進行は前立腺癌患者の予後を規定することから、去勢抵抗性獲得のメカニズムの解明と治療法の確立は社会的急務となっている。去勢抵抗性獲得機序の1つとしてアンドロゲン受容体非依存性の経路は重要であり、そのモデルとして我々は神経内分泌分化に注目している。その理由は、ホルモン療法によって神経内分泌分化が誘導されること、神経内分泌癌細胞はアンドロゲン受容体を発現しないこと、神経内分泌癌細胞から様々な因子が合成・放出され、autocrine や paracrine に作用して癌の増殖と運動能、血管新生に関わることが知られていることである。このように、神経内分泌分化のメカニズムを追求することはホルモン不応性前立腺癌の診断と治療につながるきわめて有意義なことと考えられる。発症形態として始めから神経内分泌癌として存在するタイプとホルモン治療中に発現するタイプが知られているが、これらの神経内分泌分化がどのようにして生じるのか、その機序はまったく解明されていない。また、実際の臨床においても神経内分泌癌の診断・治療法はまったく確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では、*Escherichia coli* ampicillin secretion trap (CAST) 法をはじめとする網羅的遺伝子解析に基づいて前立腺癌の神経内分泌分化に特異的な分子を同定し、その細胞生物学的機能を解明することで神経内分泌分化した前立腺癌の診断と新たな治療法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 神経内分泌化に特異的な分子の同定

正常前立腺、通常型の前立腺癌と比べて発現が亢進している膜蛋白もしくは分泌蛋白を CAST 法など網羅的遺伝子解析によって同定、候補となる分子群について、定量的 RT-PCR 法と免疫組織学的染色を用いて臨床病理学的因子との相関や、代表的な神経内分泌マーカーとの相関を検討した。

2) 候補遺伝子の細胞生物学的機能解析

抽出された候補遺伝子に対してはその細胞生物学的な機能解析を前立腺癌細胞株で検討する。強制発現系、発現抑制系を用い、細胞増殖能、浸潤能、Wound healing assay による細胞遊走能、薬剤感受性などについて検討した。

3) 血清腫瘍マーカーへの応用の検討

去勢抵抗性前立腺癌患者に特異的な分泌蛋白に関しては、前立腺癌患者血清での発現量を測定し、腫瘍マーカーとして診断や予後や治療効果判定に有用となるか検討した。

4. 研究成果

ヒト前立腺組織から RNA を抽出して cDNA を合成し作成した CAST ライブラリーをスクリーニングすることにより、前立腺癌に特異的な膜貫通タンパクもしくは分泌タンパクをコードする候補遺伝子群を同定した。その一つである NBL1 は前立腺癌の進展の新規マーカーとなりうることを明らかにした。

神経内分泌癌の発生に関与する分子を探索し、RegIV と、FGF-FGFR に焦点を当てて研究を進めた。前立腺癌細胞株 PC3 に RegIV

および FGFR2 を強制発現させて安定発現株を作成した。RegIV 安定発現株ではシナプトピジンをはじめとする神経内分泌マーカーおよび VEGFA をはじめとする血管新生因子の発現誘導が認められるとともに、細胞増殖の促進、化学療法剤感受性の低下がみられた。FGFR2 安定発現株では、N-cadherin、vimentin の発現が低下し、間葉上皮移行の表現型が認められた。また、細胞増殖の低下、化学療法剤感受性の増強がみられた。RegIV 安定発現 LNCaP では神経内分泌マーカーおよび血管新生因子の発現誘導が認められ、NCad の増強と ECad の減弱が認められ、アンドロゲン除去下での増殖能亢進が認められた。CAST 法によって同定された PRL1 および oligophrenin 1 においても同様の解析を行い、各分子間における効果の相違を比較した。さらに血清 RegIV 濃度を ELISA 法で測定したところ、非癌症例群に比較してホルモン依存性前立腺癌症例群、この 2 群に比較して去勢抵抗性前立腺癌症例群において有意に RegIV 濃度が高値であった。また、前立腺原発神経内分泌癌組織において RegIV の発現増強が確認された。

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 8 件)

Shoji K, Teishima J, Hayashi T, Ohara S, Mckeehan WL, Matsubara A. Restoration of fibroblast growth factor receptor 2IIIb enhances the chemosensitivity of human prostate cancer cells. *Oncol Rep*, (査読有), 2014 Jul; 32(1):65-70.

Nagamatsu H, Teishima J, Goto K, Shikuma H, Kitano H, Shoji K, Inoue S, Matsubara A. FGF19 promotes progression of prostate cancer. *Prostate*, (査読有), 2015 Jul; 75(10): 1092-101.

Teishima J, Yano S, Shoji K, Hayashi T, Goto K, Kitano H, Oka K, Nagamatsu H, Matsubara A. Accumulation of FGF9 in prostate cancer correlates with epithelial-to-mesenchymal transition and induction of VEGF-A expression. *Anticancer Res*, (査読有), 2014 Feb; 34(2): 695-700.

Teishima J, Maruyama S, Mochizuki H, Oka K, Ikeda K, Goto K, Nagamatsu H, Hieda K, Shoji K, Matsubara A. Prostate cancer detection by prostate-specific antigen-based screening in the Japanese Hiroshima area shows early stage, low-grade, and low rate of cancer-specific death compared with clinical detection. *Can Urol Assoc J*, (査読有), 2014 May; 8(5-6): E327-32.

Oligophrenin-1 is associated with cell adhesion and migration in prostate cancer.

Goto K, Oue N, Hayashi T, Shinmei S, Sakamoto N, Sentani K, Teishima J, Matsubara A, Yasui W. *Pathobiology*, (査読有), 2014; 81(4): 190-8.

Shinmei S, Sentani K, Hayashi T, Sakamoto N, Goto K, Zarni Oo H, Naito Y, Teishima J, Matsubara A, Oue N, Kuniyasu H, Yasui W. Identification of PRL1 as a

novel diagnostic and therapeutic target for castration-resistant prostate cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap (CAST) method. Urol Oncol, (査読有), 2014 Aug;32(6):769-78.

Seki M, Teishima J, Mochizuki H, Mutaguchi K, Yasumoto H, Oka K, Nagamatsu H, Shoji K, Matsubara A. Restoration of IGFBP-rP1 increases radiosensitivity and chemosensitivity in hormone-refractory human prostate cancer. Hiroshima J Med Sci, (査読有), 2013 Mar; 62(1): 13-9.

Hayashi T, Sentani K, Oue N, Ohara S, Teishima J, Anami K, Sakamoto N, Matsubara A, Yasui W. The search for secreted proteins in prostate cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: expression of NBL1 is highly restricted to the prostate and is related to cancer progression. Pathobiology, (査読有), 2013; 80(2): 60-9.

[学会発表](計17件)

Jun Teishima, Koichi Shoji, Keisuke Goto, Ryoken Yamanaka, Hiroyuki Shikuma, Hirotaka Nagamatsu, Shunsuke Shinmei, Hiroyuki Kitano, Shinya Ohara, Tetsutaro Hayashi, Norihide Oue, Wataru Yasui, Akio Matsubara. Regenerating islet-derived family, member 4 enhances cell proliferation, castration-resistance and chemoresistance through acceleration of neuroendocrine differentiation in human

prostate cancer cells. 29th Annual EAU Congress, 2014.4.12, Stockholm(Sweden).

Koichi Shoji, Jun Teishima, Shinya Ohara, Akio Matsubara. Restoration of Fibroblast Growth Factor Receptor 2IIb enhances the chemosensitivity of human prostate cancer cells. AUA Annual Meeting 2014, 2014.5.18, Orlando(USA).

Hirotaka Nagamatsu, Jun Teishima, Keisuke Goto, Akio Matsubara. FGF19 subfamily promotes progression in prostate cancer cells. AUA Annual Meeting 2014, 2014.5.18, Orlando(USA).

Jun Teishima, Koichi Shoji, Keisuke Goto, Ryoken Yamaoka, Hiroyuki Shikuma, Hirotaka Nagamatsu, Kiyotaka Oka, Shunsuke Shinmei, Hiroyuki Kitano, Shinya Ohara, Tetsutaro Hayashi, Norihide Oue, Wataru Yasui, Akio Matsubara. Regenerating islet-derived family, member 4 enhances cell proliferation, castration-resistance, and chemoresistance through acceleration of neuroendocrine differentiation in human prostate cancer cells. AUA Annual Meeting 2014, 2014.5.19, Orlando(USA).

亭島 淳、正路晃一、山中亮憲、後藤景介、永松弘孝、大原慎也、林哲太郎、岡清貴、大上直秀、安井 弥、松原昭郎. 去勢抵抗性前立腺癌における regIV の意義. 第73回日本癌学会学術総会, 2014.9.25, 横浜.

永松弘孝、亭島 淳、後藤景介、松原昭郎. Endocrine FGFs promote progression in prostate cancer. 第73回日本癌学会学

術総会, 2014.9.25, 横浜.

永松弘孝、亭島 淳、後藤景介、正路晃一、松原昭郎. FGF19 は前立腺癌細胞の増殖を促進する. 第 102 回日本泌尿器科学会総会, 2014.4.25, 神戸.

正路晃一、亭島 淳、大原慎也、松原昭郎. 前立腺癌細胞における FGFR2 b の発現回復は化学療法感受性を増強する. 第 102 回日本泌尿器科学会総会, 2014.4.25, 神戸.

亭島 淳、永松弘孝、北野弘之、後藤景介、岡清貴、正路晃一、大上直秀、安井弥、松原昭郎. 前立腺癌における Reg の意義. 第 102 回日本泌尿器科学会総会, 2014.4.25, 神戸.

Jun Teishima, Koichi Shoji, Keisuke Goto, Ryoken Yamaoka, Hiroyuki Shikuma, Hirotaka Nagamatsu, Kiyotaka Oka, Shunsuke Shinmei, Hiroyuki Kitano, Shinya Ohara, Tetsutaro Hayashi, Norihide Oue, Wataru Yasui, Akio Matsubara. The role of regenerating islet-derived family, member 4 in human castration-resistant prostate cancer cells. The 4th Congress of Asian Pacific Prostate Society (APPS2014), 2014.3.21, Okinawa.

Nagamatsu H, Teishima J, Goto K, Matsubara A. FGF19 subfamily promotes progression in prostate cancer. The 4th Congress of Asian Pacific Prostate Society, 2014.3.21, Okinawa.

Jun Teishima, Shigeki Yano, Tetsutaro Hayashi, Koichi Shoji, Kiyotaka Oka,

Hirotaka Nagamatsu, Shinya Ohara, and Akio Matsubara. Fibroblast growth factor 9 in prostate cancer cells is associated with postoperative recurrence through acceleration of mesenchymal transition, proliferation, and invasion. AUA 2013 Annual Meeting, 2013.5.4, San Diego (USA).

Jun Teishima, Shigeki Yano, Tetsutaro Hayashi, Koichi Shoji, Kiyotaka Oka, Hirotaka Nagamatsu, Shinya Ohara, and Akio Matsubara. Accumulation of Fibroblast growth factor 9 in prostate cancer cells correlate with epithelial-mesenchymal transition and the induction of VEGFA expression. 33rd Congress of the Societe internationale D'urologie(SIU2013), 2013.9.9, Vancouver (Canada).

Koichi Shoji, Jun Teishima, Shinya Ohara, Akio Matsubara. Restoration of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 b Enhances the Chemosensitivity of Human Castration Resistant Prostate Cancer Cells. 33rd Congress of the Societe internationale D'urologie(SIU2013), 2013.9.9, Vancouver (Canada).

亭島 淳、林哲太郎、正路晃一、岡清貴、永松弘孝、後藤景介、神明俊輔、松原昭郎. 前立腺癌細胞における FGF9 の集積は上皮間葉移行および VEGFA の誘導に關与する. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013.10.5, 横浜.

正路晃一、亭島 淳、大原慎也、松原昭郎. 前立腺癌細胞における FGF2 b の発現回復は化学療法感受性を増強する. 第 72

回日本癌学会学術総会，2013.10.5，横浜．

永松弘孝、亭島 淳、正路晃一、後藤景介、岡清貴、神明俊輔、松原昭郎．FGF19は前立腺癌細胞の増殖を促進する．第72回日本癌学会学術総会，2013.10.5，横浜．

〔その他〕

ホームページ：

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/urology/>

6．研究組織

(1)研究代表者

松原 昭郎 (MATSUBARA AKIO)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：10239064

(2)研究分担者

亭島 淳 (TEISHIMA JUN)

広島大学・医歯薬保健学研究院・講師

研究者番号：20397962

安井 弥 (YASUI WATARU)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：40191118

井上 省吾 (INOUE SHOGO)

広島大学・病院・助教

研究者番号：90457177