

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890098

研究課題名(和文) Xenograftモデルを用いた前立腺癌予後予測血中マーカーの探索

研究課題名(英文) Exploration of a new biomarker for predicting prostate cancer prognosis using xenograft model

研究代表者

寺田 直樹 (Terada, Naoki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60636637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、現在までに臨床患者癌組織由来の前立腺癌xenograftモデルの樹立に成功してきた(KUCaP-1,-2,-3,-4)。本研究ではこれらの前立腺癌xenograftモデルを用いた新規バイオマーカーの同定を目指した。腫瘍の分泌蛋白が濃縮された嚢胞を形成するという特徴をもつKUCaP-3に特に注目し、血中及び嚢胞液中の分泌蛋白の高感度質量分析を行い、数種類のバイオマーカー候補蛋白質を同定した。今後、候補蛋白の機能解析などを検討している。

研究成果の概要(英文)：We have established four kinds of patient derived tumor tissue (PDTT) xenograft model of prostate cancer (KUCaP-1,-2,-3,-4). Our aim was to identify new biomarker for prostate cancer using PDTT xenograft model. We especially focused on KUCaP-3, which forms cyst containing high density tumor origin proteins. High sensitivity mass spectrometry analysis identified some kinds of biomarker candidate proteins. We are planning to investigate their function.

研究分野：前立腺癌

科研費の分科・細目：泌尿器科 腫瘍学

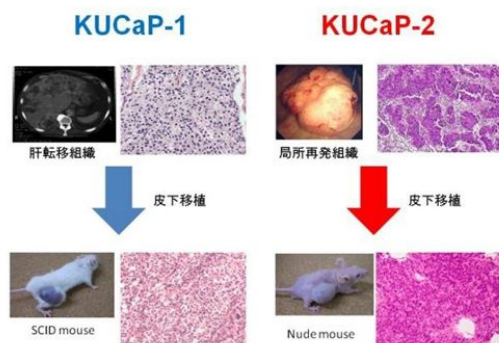
キーワード：前立腺癌 バイオマーカー xenograft

1. 研究開始当初の背景

食生活の変化や人口の高齢化に伴い日本人の前立腺癌罹患率は上昇し続け、その増加率は近年の男性の全癌腫の内では最高となっている。PSA は極めて感度の高い血中腫瘍マーカーであり、それにより多くの早期前立腺癌の診断が可能となった。ところが、近年では逆に PSA スクリーニングに伴う過剰診断、過剰治療が大きな問題となってきている。そのため、臨床癌と潜在癌を区別する新規前立腺癌診断マーカーの開発は急務である。

研究代表者は、以前より前立腺癌組織を免疫不全マウスに直接移植することにより、新規の前立腺癌 xenograft モデル(KUCaP)の樹立に成功し報告してきた(図1)。前立腺癌肝転移組織を用いて作成した KUCaP-1 は、androgen receptor (AR)を発現し、PSA の分泌を認め、宿主マウスを去勢することにより縮小する去勢反応性腫瘍である(図2)。その AR に変異(W741C)を認め、antiandrogen である Bicalutamide が agonist として働くことから、本モデルを用いることにより antiandrogen withdrawal syndrome の原理や Flutamide への antiandrogen 交替療法の機序が解明された。前立腺癌局所再発組織を用いて作成した KUCaP-2 は、KUCaP-1 と同様に AR,PSA を発現する去勢反応性腫瘍であるが、マウス去勢後約 1-2 ヶ月で去勢抵抗性を獲得し再増殖を認める(図2)。本モデルを用いた DNA microarray 解析により、去勢抵抗性獲得機序の1つとして prostaglandin E2 受容体の1つである EP4 の発現亢進を認め、去勢抵抗性前立腺癌に対する治療標的となることが示された。これらの研究から、我々が樹立した KUCaP は、ヒト前立腺癌の病態を再現できる極めて有用な実験モデルであることが示唆された。

図1. KUCaP-1,-2 の樹立



当教室では、同様の方法にて現在までに計4種類(KUCaP-1, -2, -3, -4)の xenograft モデルの樹立に成功している。これらはいずれも前立腺癌の組織型を保っており、その腫瘍増殖速度、AR,PSA の発現、並びにアンドロゲン依存性は様々である(表1)。研究代表はさらに、前立腺肥大症患者と前立腺癌患者の臨床検体を用いた DNA microarray 解析により同定された分子である Cyr61 において、sandwich

ELISA 法による血清中蛋白濃度の測定に成功し、前立腺癌の予後を予測する血中マーカーとなる可能性があることを示した。

図2. KUCaP-1,-2 の去勢前後腫瘍体積変化

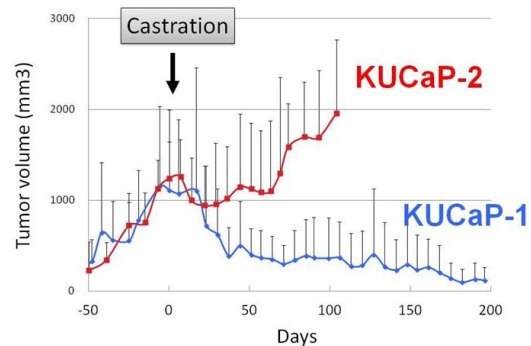


表1. 各 KUCaP の特徴

	KUCaP-1	KUCaP-2	KUCaP-3	KUCaP-4
採取組織	肝転移	局所	局所	局所
増殖速度	++	++	+	++
去勢反応性	++	+	++	-
AR 発現	+(W741C)	+(Wt)	+(H874Y)	-
PSA 発現	+	+	++	-
NSE 発現	-	-	-	+

2. 研究の目的

本研究の目的は、4種類の KUCaP を用いることにより前立腺癌の悪性度と相関するバイオマーカーを同定し、前立腺癌の予後を予測する新規血中マーカーの開発を目指すことである。

3. 研究の方法

1) xenograft および臨床検体を用いた質量顕微鏡解析においては、組織をクライオスタットを用いて 10µm 厚に薄切し indium-tin oxide-coated( ITO)ガラスに乗せサンプルを作成しマトリックスは真空蒸着装置を用いて蒸着させた。質量顕微鏡および高解像度質量顕微鏡を用いて質量分析を行い(分解能: 10 µm)。同機種を用いて MS/MS 分析も行った。  
2) xenograft の腫瘍、腫瘍由来細胞液、マウス血液をもちいて、高感度質量分析を行った。

3)免疫染色・ウェスタンブロッティング  
候補蛋白質に対して、xenograft、臨床検体および前立腺癌細胞株を用いて、組織免疫染色、ウェスタンブロッティングおよび PCR にて解析を行った。

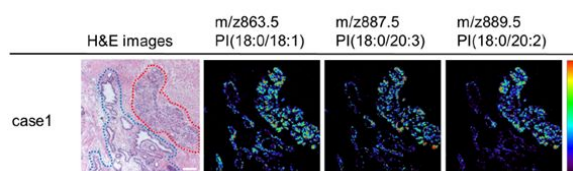
4. 研究成果

1) xenograft に対してトリプシン処理後に質量顕微鏡分析を行ったが、検出されるのは生体内に豊富に含まれるペプチドのみで、悪性度と有意に相関する候補蛋白の同定には至らなかった。

しかしながら、上記の実験手法を参考に、

前立腺癌の臨床検体を用いた高解像度質量顕微鏡による  $m/z1000$  以下の低分子を標的とした網羅的質量分析方法を確立した。この方法を用いて前立腺癌組織の網羅的脂質プロファイル解析を行い、3種のホスファチジルイノシトールの発現が前立腺癌部で特異的に亢進していることを同定した(図3)。さらに、ホスファチジルイノシトールの発現プロファイルを用いて、新たな前立腺癌の組織診断アルゴリズムを作成し、それが高い正診率を持ち、新規バイオマーカーとなり得ることを示した(Goto Terada, *Plos One*, 2014)。これらの事実は、前立腺癌においてリン脂質などの脂質代謝が変化していることを裏付ける新たな知見である。

図3. 前立腺癌部でのホスファチジルイノシトールの発現解析



2)これまでに樹立した各 KUCaP のうち、KUCaP-3 は、腫瘍が嚢胞を形成するという特徴を持つが、その嚢胞液中の PSA 濃度はマウス血中 PSA 濃度よりもはるかに高かった。このマウスの嚢胞液と血清をタンパク質量分析によって解析すると、分泌されているタンパク質のリストが得られた。現在前立腺癌細胞株および保存血清を用いて、その中からバイオマーカーとして利用できる候補を選定している。

#### 結語

臨床患者癌組織由来の前立腺癌 xenograft モデルを用いて、前立腺癌のバイオマーカー候補蛋白を同定した。前立腺癌予後との関連を解析するとともに、sandwich ELISA 法の確立により新規血中マーカーとしての有用性を検討していくことが今後の研究課題である。

#### 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10件)

- 1: Xu S, Zhang Z, Ogawa O, Yoshikawa T, Sakamoto H, Shibasaki N, Goto T, Wang L, Terada N. An EP4 Antagonist ONO-AE3-208 Suppresses Cell Invasion, Migration, and Metastasis of Prostate Cancer. *Cell Biochem Biophys*. 2014 Apr 18. [Epub ahead of print]
- 2: Terada N, Shiraishi T, Zeng Y, Aw-Yong KM, Liu Z, Takahashi S, Luo J, Lupold SE, Kulkarni P, Getzenberg RH. Correlation of

Sproutyl and Jagged1 with Aggressive Prostate Cancer Cells with Different Sensitivities to Androgen Deprivation. *J Cell Biochem*. 2014 Mar 7.

doi: 10.1002/jcb.24805. [Epub ahead of print]

3: Goto T, Terada N, Inoue T, Nakayama K, Okada Y, Yoshikawa T, Miyazaki Y, Uegaki M, Sumiyoshi S, Kobayashi T, Kamba T, Yoshimura K, Ogawa O. The expression profile of phosphatidylinositol in high spatial resolution imaging mass spectrometry as a potential biomarker for prostate cancer. *PLoS One*. 2014 Feb 28;9(2):e90242.

doi:10.1371/journal.pone.0090242.

4: Nakamura K, Terada N, Sugino Y, Yamasaki T, Matsui Y, Imamura M, Okubo K, Kamba T, Yoshimura K, Ogawa O. Novel constant-pressure irrigation technique for the treatment of renal pelvic tumors after ipsilateral ureterectomy. *Int J Urol*. 2014 Jan 9.

doi: 10.1111/iju.12386. [Epub ahead of print]

5: Matsuoka T, Sugino Y, Kobayashi T, Terada N, Yamasaki T, Matsui Y, Imamura M, Okubo K, Kamba T, Yoshimura K, Ogawa O. [A case of prostate carcinosarcoma successfully treated with combined modality therapy]. *Hinyokika Kyo*. 2013 Nov;59(11):749-52.

6: Zeng Y, Wodzinski D, Gao D, Shiraishi T, Terada N, Li Y, Vander Griend DJ, Luo J, Kong C, Getzenberg RH, Kulkarni P. Stress-response protein RBM3 attenuates the stem-like properties of prostate cancer cells by interfering with CD44 variant splicing. *Cancer Res*. 2013 Jul 1;73(13):4123-33.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1343.

7: Li B, Shimizu Y, Kobayashi T, Terada N, Yoshimura K, Kamba T, Mikami Y, Inoue T, Nishiyama H, Ogawa O. Overexpression of ETS-1 is associated with malignant biological features of prostate cancer. *Asian J Androl*. 2012 Nov;14(6):860-3.

doi: 10.1038/aja.2012.107.

8: Kim JJ, Yin B, Christudass CS, Terada N, Rajagopalan K, Fabry B, Lee DY, Shiraishi T, Getzenberg RH, Veltri RW, An SS, Mooney SM. Acquisition of paclitaxel resistance is associated with a more aggressive and invasive phenotype in prostate cancer. *J Cell Biochem*. 2013 Jun;114(6):1286-93.

doi:10.1002/jcb.24464.

9: Terada N, Kulkarni P, Getzenberg RH. Cyr61 is a potential prognostic marker for prostate cancer. *Asian J Androl*. 2012 May;14(3):405-8.

doi:10.1038/aja.2011.149.

10: Terada N, Shiraishi T, Zeng Y, Mooney SM, Yeater DB, Mangold LA, Partin AW, Kulkarni P, Getzenberg RH. Cyr61 is regulated by cAMP-dependent protein kinase with serum levels correlating with prostate cancer

aggressiveness. Prostate. 2012 Jun  
15;72(9):966-76.  
doi: 10.1002/pros.21501.

〔学会発表〕(計 XX 件)

後藤崇之、寺田直樹、井上貴博、中山憲司、  
宮崎 有、植垣正幸、吉川武志、小林恭、清  
水洋祐、神波大己、吉村耕治、小川修、「In situ  
lipid profiling of prostate cancer tissues using  
high resolution imaging mass spectrometry」、『第  
72 回日本癌学会学術総会』、P-3297、横浜、  
2013 年 10 月

後藤崇之、寺田直樹、井上貴博、中山憲司、  
宮崎有、植垣正幸、吉川武志、小林恭、神波  
大己、吉村耕治、小川修、「高解像度質量顕  
微鏡を用いた前立腺癌組織の in situ 脂質プ  
ロファイリング」、『第 23 回泌尿器科分子  
細胞研究会』、P-05、山形、2014 年 3 月

Takayuki Goto, Naoki Terada, Takahiro Inoue,  
Kenji Nakayama, Yu Miyazaki, Masayuki Uegaki,  
Takeshi Yoshikawa, Takashi Kobayashi, Tomomi  
Kamba, Koji Yoshimura, Osamu Ogawa, 「In situ  
lipid profiling of prostate cancer tissues using  
high resolution imaging mass spectrometry」、  
『The 4th Congress of Asian Pacific Prostate  
Society』、P-105、沖縄、2014 年 3 月〔その他〕

ホームページ等

<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

寺田直樹 ( Naoki Terada )

京都大学 医学研究科 助教

研究者番号 : 60636637