

氏 名 やすだ けんじ
保田 賢司

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 富医薬博乙第 48 号

学位授与年月日 平成 26 年 2 月 27 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 4 項該当

学 位 論 文 題 目 **前立腺癌における Hepatocyte Growth Factor (HGF) およびその関
連蛋白の検討**

論 文 審 査 委 員

（主査）	教 授	齋藤 滋
（副査）	教 授	近藤 隆
（副査）	教 授	野口 誠
（副査）	教 授	関根 道和
（紹介教員）	教 授	布施 秀樹

論文内容の要旨

[研究目的とその背景]

前立腺癌は、ホルモン（アンドロゲン）依存性に増殖する。進行性前立腺癌では、アンドロゲン除去療法（androgen deprivation therapy : ADT、去勢術）が選択される。ADT はほとんどの症例に奏効するが次第に効果が低下し、いわゆる去勢抵抗性前立腺癌（castration-resistant prostate cancer : CRPC）となり癌死にいたる。そこで前立腺癌が、浸潤、転移をきたす要因や治療抵抗性を獲得する機序の解明は今後の治療戦略を立てる上で重要である。一方で、癌細胞を取り巻く微小環境で生じている癌細胞と周囲間質正常細胞との相互作用が浸潤や転移に重要であることが知られている。間質から分泌される増殖因子の1つに肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor : HGF）がある。HGF は、組織再生・修復に関与することに加え、癌-間質相互作用のメディエーターとして多くの癌細胞の浸潤・転移能を亢進させる。当教室ではこれまでの研究で、HGF やその関連蛋白は前立腺癌において浸潤や転移に重要な役割を果たす可能性があることを示してきた。本研究では前立腺癌症例の血清活性型 HGF（active-HGF : AHGF）値と HGF activator inhibitor type 1（HAI-1）値を測定し検討した。さらに前立腺組織における HAI-1 の発現について前立腺癌細胞株・前立腺正常細胞株・前立腺針生検標本などを用いて検討した。

[方法]

当科外来通院中で文書にて同意を得られた良性前立腺疾患患者（前立腺肥大症 38 名、コントロール群）および前立腺癌患者（160 名）の血清を用いて血清 AHGF と Total HGF（AHGF + pro-HGF : THGF）を ELISA 法にて測定した。ヒト前立腺癌細胞株 PC-3（アンドロゲン非依存性、骨転移由来）、DU-145（アンドロゲン非依存性、脳転移由来）、LNCaP

(アンドロゲン依存性、リンパ節転移由来)、PrEC cells (前立腺正常上皮細胞)、PrSC cells (前立腺正常間質細胞)における HAI-1 の発現や作用機序解明のため RT-PCR にて HAI-1 mRNA を測定、Flow cytometry を用いて膜貫通型の HAI-1 測定を行った。また同意を得た症例について、前立腺針生検の標本を用いて HAI-1 の発現を免疫組織学的に検討した。

[結果]

未治療前立腺癌患者における血清 AHGF 値はコントロール群と比較して有意に高値を示した ($P=0.0001$)。前立腺癌患者で病期別に検討したところ転移症例や CRPC 症例は限局癌症例と比較して有意に高値であった(それぞれ $P=0.0033$ 、 $P<0.0001$)。さらに、低分化型腺癌は高分化型腺癌に比べて高値であった ($P=0.013$)。AHGF/THGF 比の比較では、CRPC 症例が限局癌症例より高値を示した。ヒト前立腺癌細胞株や前立腺正常細胞株における HAI-1 mRNA の解析では正常間質細胞のみに発現を認めなかった。Flow cytometry を用いた膜貫通型の HAI-1 測定ではすべての前立腺癌細胞株で発現を認めた。生検組織の HAI-1 免疫染色では、生検標本内に癌を認めなかった患者の腺上皮細胞における染色強度に比べ、癌陽性患者の癌細胞における染色強度が有意に高かった ($P<0.05$)。未治療前立腺癌患者における染色強度の比較では、その病期や分化度で HAI-1 の発現に有意差は認めなかった。CRPC 症例の染色強度は、未治療転移病期症例に比べ有意に低下していた ($P<0.05$)。未治療前立腺癌症例の免疫組織染色にて HAI-1 の発現を認めなかった患者と発現を認めた患者で PSA progression-free survival を比較したところ前者が有意に短かった ($P<0.05$)。

〔総括〕

これまでの結果から HGF およびその関連蛋白が、前立腺癌における転移浸潤に極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで本研究では、血清 AHGF に関して臨床検体を用いて検討を行った。その結果、AHGF が転移癌や CRPC で高値となることが分かった。これまでに THGF に関する報告はあったが AHGF に関する報告は本研究が初めてであった。本研究の結果から AHGF は、従来の THGF より前立腺癌転移や CRPC への進展のマーカーとしての有用性があり、AHGF 値を治療前に把握することで難治性患者に対するより積極的な治療選択が考慮できる可能性がある。AHGF の増加が転移や CRPC に関連すると考えられたことから、次にその調節因子である HAI-1 に関する研究を進めた。前立腺癌における進行度別の発現の比較では、CRPC において発現の低下がみられた。今回の研究結果から CRPC 症例では前立腺組織においてプロテアーゼによる切り出し現象が亢進しており、それによって細胞膜上での発現低下を示したのではないかと考えられる。今後さらに検討を要するが、前立腺癌の転移や CRPC への進展に AHGF が重要な役割を持っておりその調節機構には HAI-1 が深くかかわっていると思われる。以上より HAI-1 も前立腺癌における病勢の進行を示すマーカーとして有用であり CRPC の治療標的となる可能性があると考えられる。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

(目的)

前立腺癌の罹患率、死亡率は、近年急速に増加しており、その対策は急務である。前立腺癌はアンドロゲン依存性に増殖するため、進行性前立腺癌ではアンドロゲン除去療法が選択される。本治療法は、ほとんどの症例で奏効するが、次第にその効果が低下し、去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer: CRPC) となり、最終的には癌死に至る。そのため前立腺癌が浸潤、転移をきたす要因や治療抵抗性を獲得する機序の解明は、今後の治療戦略を立てる上で重要である。Hepatocyte growth factor (HGF) は、前立腺癌において、浸潤や転移に重要な役割を果たすことは、これまで報告されている。HGF は、HGF activator により、活性型 HGF (active-HGF : AHGF) となり、HGFA は2つのインヒビターである HGFA inhibitor type1(HAI-1) および type2 (HAI-2) により特異的に制御される。保田君は、HGF 活性化の調整機構を HGFA、HAI-1 から解明することで、前立腺癌の転移や去勢抵抗性獲得の一端を明らかにしようとした。

(方法)

文書にて同意を得た上で、良性前立腺疾患である前立腺肥大症 38 名 (コントロール群) および前立腺癌患者 160 名から血清を採取し、血清 AHGF 値ならびに Total HGF (AHGF + pro-HGF) 値を ELISA 法で測定した。ヒト前立腺癌細胞株 PC-3、LNCaP ならびに前立腺正常上皮細胞 (PrEC)、前立腺正常間質細胞 (PrSC) における HAI-1 mRNA 発現を RT-PCR 法にて、細胞表面上の HAI-1 を Flow cytometry 法で検討し、前立腺針生検の標本を用いて HAI-1 発現を免疫組織学的に検討した。調べた2群間の比較には、Mann-Whitney U テストと Spearman's rank correlation coefficient を用いた。また、2群

間以上の比較検定には ANOVA と多重比較検定を用いて有意差を検討した。

(成績)

1. 前立腺癌症例での血清 AHGF 値は、コントロール群に比し、有意に高値 ($P=0.0001$) となった。特に転移症例や CRPC 症例は限局癌症例と比較して有意に高値 (それぞれ $P=0.0033$, $P<0.0001$) であった。組織型では、低分化腺癌が高分化腺癌に比し、AHGF 値が有意に高値 ($P=0.013$) であった。AHGF/THGF 値の比較では CRPC 症例が限局癌症例より有意に高値 ($P=0.008$) を示し、CRPC 症例では活性化 HGF 率が増加していた。
2. ヒト前立腺癌細胞株では、HAI-1 mRNA、膜貫通型の HAI-1 蛋白を細胞表面に認めたが、正常間質細胞ではその発現を認めなかった。
3. 生検検体における HAI-1 免疫染色は、CRPC 症例で未治療転移癌症例に比し、有意に低下 ($P<0.05$) していた。未治療例での検討では、HAI-1 発現を認めなかった群での PSA-progression-free survival は、HAI-1 発現を認めた群の値に比し、有意に短かった ($P<0.05$)。

(総括)

これまで前立腺癌での THGF に関する報告はあったが、今回の報告で保田賢司君は、1) AHGF が転移症例や CRPC で高値であること、2) AHGF の調節因子である HAI-1 発現が CRPC 群において低下していること、3) 同時に HAI-1 発現低下が progression-free survival の短縮と相関することを初めて示した。これらの点には新規性があり、前立腺癌の進展や CRPC を起こす機序の一端として、AHGF ならびに調節因子である HAI-1 が重要な役割を担うことを示し、医学における学術的重要性が高い。加えて、今後、AHGF や HAI-1

が前立腺癌の病勢の進行を示すマーカーとしても利用されることが期待され、臨床的发展性も高いと思われる。

以上より、本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。