

前立腺癌における Hepatocyte Growth Factor (HGF)

およびその関連蛋白の検討

2013 年度

富山大学大学院医学薬学研究部 腎泌尿器科学

保田 賢司

A study of Hepatocyte Growth Factor(HGF) and HGF-related protein  
in prostate cancer

Department of Urology, Graduate School of Medicine and  
Pharmaceutical Sciences for Research, University of Toyama, Toyama,  
Japan

Kenji Yasuda

## 目次

	頁
要 旨	・ ・ ・ 6
I . 緒 言	・ ・ ・ 11
II . 良性前立腺疾患と前立腺癌患者の血清活性型肝細胞増殖因子 (AHGF)	
について	
II -1. はじめに	・ ・ ・ 14
II -2. 対象と方法	
II -2-1. 対象とした患者	・ ・ ・ 15
II -2-2. THGF と AHGF の測定法	・ ・ ・ 16
II -2-3. 統計学的解析	・ ・ ・ 16
II -3. 結果	
II -3-1. 血清 THGF と AHGF について	・ ・ ・ 17
II -3-2. 血清 AHGF/THGF 比について	・ ・ ・ 18
II -3-3. AHGF と HGFA、AHGF と HAI-1 の相関関係について	
	・ ・ ・ 18

Ⅱ-4. 考 察	・ ・ ・ 18
Ⅲ. 前立腺癌における HAI-1 の発現	
Ⅲ-1. はじめに	・ ・ ・ 23
Ⅲ-2. 材料と方法	
Ⅲ-2-1. 対象とした前立腺細胞株	・ ・ ・ 23
Ⅲ-2-2. 対象とした患者	・ ・ ・ 24
Ⅲ-2-3. 前立腺細胞における HAI-1 の mRNA 発現 (RT-PCR)	・ ・ ・ 25
Ⅲ-2-4. 前立腺癌細胞株における膜型 HAI-1 の測定 (Flow cytometry)	・ ・ ・ 25
Ⅲ-2-5. 前立腺組織における HAI-1 の免疫染色	・ ・ ・ 26
Ⅲ-2-6. 免疫染色の評価	・ ・ ・ 27
Ⅲ-2-7. 未治療前立腺癌における HAI-1 score と PSA progression-free survival についての検討	・ ・ ・ 27
Ⅲ-2-8. 統計学的解析	・ ・ ・ 28
Ⅲ-3. 結 果	
Ⅲ-3-1. 前立腺細胞における mRNA の発現について	・ ・ ・ 29

Ⅲ-3-2. 前立腺癌細胞株における膜型 HAI-1 の発現について . . .	29
Ⅲ-3-3. 前立腺組織における HAI-1 の発現について . . .	29
Ⅲ-3-4. 去勢抵抗性前立腺癌における HAI-1 の発現について . . .	31
Ⅲ-3-5. 前立腺癌の HAI-1 スコアと PSA 無進行生存率について . . .	31
Ⅲ-4. 考 察 . . .	31
Ⅳ. 結 論 . . .	38
Ⅴ. 謝 辞 . . .	39
Ⅵ. 参 考 文 献 . . .	40
Ⅶ. 図 . . .	50

## 要旨

### 【研究目的とその背景】

日本では前立腺癌の罹患率、死亡率とも近年急激に増加しており、その対策は急務である。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**）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。

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。HGF は 1 本鎖の非活性型 HGF（**pro-HGF**）として分泌され主に **HGF activator**（**HGFA**）により 2 本鎖の活性型 HGF（**active HGF : AHGF**）となる。HGFA は 2 種類のインヒビターで

ある HGFA inhibitor type 1 (HAI-1) および type 2 (HAI-2) によって特異的に制御される。

当教室ではこれまで、*in vitro* において HGF がアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株である PC-3 や DU-145 細胞の浸潤能を亢進させることを報告した。さらに前立腺癌患者の血清 HGFA や HAI-1 を測定し、進行性前立腺癌患者で有意に高値になることを報告した。これらのことから 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。そこで、本研究では前立腺癌症例の血清 AHGF 値と 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 ( $P=0.008$ )。

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る。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。

## I . 緒言

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor : HGF) は、1 本鎖の非活性型 HGF (pro-HGF) として分泌され、HGF activator (HGFA) により 2 本鎖の活性型 HGF (active HGF : AHGF) となる。HGFA は 2 種類のインヒビターである HGFA inhibitor type 1 (HAI-1) および type 2 (HAI-2) によって特異的に制御されている [7, 8]。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ことが報告されている (Figure 1)。

当研究室ではこれまでに HGF がアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株である PC-3 や DU-145 細胞の浸潤能を亢進させること、さらにその作用機序として細胞運動能の亢進、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (urokinase-type plasminogen activator : uPA) やマトリックス金属プロテアーゼ (matrix metalloproteinase : MMP) 1 型 (MMP-1)、9 型 (MMP-9) そして膜 1 型マトリックス金属プロテアーゼ (membrane-type 1 matrix metalloproteinase : MT1-MMP) の mRNA 発現亢進を報告してきた [16, 17]。また前立腺肥大症 (良性疾患) と前立腺癌患者の血中 HGF 関連因子 (HGF, HGFA, HAI-1, HAI-2) の測定

を ELISA にて行い、特に HGFA と HAI-1 値が骨転移症例並びに去勢抵抗性前立腺癌（castration-resistant prostate cancer : CRPC）症例で有意に高値になることを明らかにした [11, 12]。

これまでの検討にて、前立腺癌を含め多く癌の進展や浸潤における HGF の意義が明らかとなってきた。癌細胞周囲微小環境下において HGFA や HAI を含めた HGF の活性化機構は、癌細胞の浸潤・増殖に重要な役割を果たしている可能性がある。それゆえ前立腺癌患者における血清活性型 HGF 値の検討や正常前立腺細胞並びに前立腺癌細胞での HGFA や HAI の発現を検討することは重要であると思われる。

HGF や c-Met が前立腺癌組織に発現していることや血中の HGF が前立腺患者で高値になることはすでに報告されているが、前立腺癌における HGF 関連因子に関する報告はいまだ数多くは報告されていない。また HAI-1 や HGFA による HGF の調節機構は仮説の域を脱していないのが現状である。我々は、正常前立腺組織や前立腺癌組織を用いて HAI-1 や HGFA の特性、HGF 活性化の調節機構を明らかにすることで前立腺癌の転移や去勢抵抗性獲得の機構の一端を解明する可能性があると考えている。

そこで本研究では第 1 章として良性前立腺疾患患者と前立腺癌患者に

における血清中の AHGF 値を ELISA にて測定し臨床病期、病理組織学的所見、未治療前立腺癌症例と CRPC 症例との関連について検討し、第 2 章として前立腺組織における HAI-1 の発現について前立腺正常細胞株、前立腺癌細胞株、前立腺生検組織標本を用いて検討した。

## Ⅱ．前立腺肥大症と前立腺癌患者の血清活性型肝細胞増殖因子 (AHGF) について

### Ⅱ-1. はじめに

HGF は、細胞周囲微小環境において重要な役割を果たしていると考えられている。HGF は、結腸や胃、肺、膀胱、前立腺の癌細胞における増殖、遊走、浸潤を刺激する[1-3]。HGF は、pro-HGF と呼ばれる一本鎖の非活性型として分泌される。pro-HGF は、主に第 12 因子様セリンプロテアーゼである HGFA やマトリプターゼにより 2 本鎖の活性型 HGF (AHGF) となる[4-6]。HGFA 活性は、細胞周囲微小環境において 2 つのセリンプロテアーゼインヒビターである HAI-1 と HAI-2 によって制御されている[7, 8]。HAI-1 は、マトリプターゼの阻害も行っていることが知られている[9]。HAI-1 mRNA は、腎臓や脾臓、前立腺、小腸、肺、胎盤の正常細胞や多くの癌細胞において発現している。前立腺癌細胞株では、PC-3 と DU-145 で発現していることが報告されている[10]。我々は以前の報告で血清 HGFA と HAI-1 値が、進行した前立腺癌で上昇することを証明し、HGFA と HAI-1 値の間に正の相関があることを示した[11, 12]。これらの結果は、HGFA と HAI-1 が前立腺癌の進行において重要な役割を果たす可能性があることを示唆する。HGF とその受容

体である c-Met は、前立腺組織と前立腺癌細胞株で発現しており [13, 14]、前立腺癌細胞株である DU-145 の細胞増殖と散乱を誘発、さらに浸潤能も増加させた [13, 15]。しかし、前立腺癌細胞の腫瘍浸潤に関する HGF のメカニズムは不明のままである。我々は、HGF が前立腺癌細胞の DU-145 と PC-3 の浸潤能を亢進させ、さらにその作用機序として u-PA やその受容体 (u-PA receptor : u-PAR)、MMP-1、MMP-9 そして MT1-MMP の発現を亢進させることを証明した [16, 17]。血清中の total HGF (pro-HGF と AHGF の合計 : THGF) が、転移性前立腺癌で上昇することは報告されている [18]。しかし AHGF に関する報告はほとんどない。本研究では、前立腺癌患者における AHGF の血清レベルを測定し前立腺癌の有用なマーカーとなりうるか検討した。

## Ⅱ-2. 対象と方法

### Ⅱ-2-1. 対象とした患者

2002 年から 2006 年に富山大学附属病院泌尿器科で診断された 136 例の未治療前立腺癌患者と 24 例の内分泌療法後に病勢が進行した前立腺癌患者 (CRPC)、38 例の良性前立腺疾患患者を対象とした。前立腺癌の診断は、超音波ガイド下経直腸式前立腺針生検または経尿道的前立腺切

除術によって得られた前立腺組織の病理組織学的検査で決定された。病期診断は、Jewett staging system、組織学的悪性度は WHO 分類に従って行った。136 人の前立腺癌患者中 66 人が stage B（未治療前立腺限局癌）、40 人が stage C（未治療前立腺局所浸潤癌）、30 人が stage D（未治療前立腺転移癌）であった。インフォームドコンセントは、すべての患者から得た。

## II-2-2. THGF と AHGF の測定法

血液サンプルは、患者より採血されたのち測定までの間 -80 度で凍結し保存した。THGF や AHGF、HGFA、HAI-1 の濃度は、Human Total HGF、Activated HGF、Activated HGFA、HAI-1 Assay Kit-MCM（株式会社 免疫生物研究所、群馬、日本）を用いて酵素免疫法（EIA 法）にて測定した。

## II-2-3. 統計学的解析

すべての値は平均±標準偏差（mean±SD）（中央値、range）で表し、2 群間の比較には Mann-Whitney U-test と Spearman's rank correlation coefficient を用いた。2 群間以上の比較検定には one-way



analysis of variance (ANOVA) と多重比較検定を用いて有意差検定をした。P<0.05 の場合、統計学的に有意差ありとした。

## II-3. 結果

### II-3-1. 血清 THGF と AHGF について

良性前立腺疾患患者と未治療前立腺癌患者の血清 THGF 値は、それぞれ  $0.45 \pm 0.12 \text{ ng/ml}$  (median 0.430、range 0.166-0.679) と  $0.50 \pm 0.20 \text{ ng/ml}$  (median 0.468、range 0.195-1.392) で血清 AHGF 値は、それぞれ  $0.28 \pm 0.08 \text{ ng/ml}$  (median 0.273、range 0.145-0.430) と  $0.36 \pm 0.12 \text{ ng/ml}$  (median 0.339、range 0.156-0.807) であった (Table 1)。

血清 THGF 値は、両群に有意差を認めなかった (P=0.2056) が血清 AHGF 値は、未治療前立腺癌患者のほうが良性前立腺疾患患者より有意に高値であった (P=0.0001)。臨床病期によって階層化した血清 AHGF 値は、CRPC 患者が stage B、C、D の患者より有意に増加していた (それぞれ P<0.0001) (Figure 2)。さらに stage D の患者は、stage B の患者と比較して血清 AHGF 値が有意に高値であった (P=0.0033)。血清 AHGF 値の組織学的悪性度における比較では、低分化型腺癌の患者と高分化型腺癌の患者の間に有意差を認めた (P=0.013) (Figure 3)。

### Ⅱ-3-2. 血清 AHGF/THGF 比について

未治療前立腺癌患者の血清 AHGF/THGF 比 ( $0.75 \pm 0.16 \text{ ng/ml}$ , median  $0.787$ , range  $0.302\text{-}1.000$ ) は、良性前立腺疾患患者の値 ( $0.63 \pm 0.13 \text{ ng/ml}$ , median  $0.608$ , range  $0.415\text{-}1.000$ ) より有意に高値であった ( $P < 0.0001$ )。臨床病期別で比較したところ CRPC 患者は、stage B の患者と比較して有意に高値であった ( $P = 0.008$ ) (Figure 4)。さらに低分化型腺癌患者の AHGF/THGF 比は、高分化型腺癌患者と比較して有意差があった ( $P = 0.0148$ )。

### Ⅱ-3-3. AHGF と HGFA、AHGF と HAI-1 の相関関係について

未治療前立腺癌患者において AHGF と HGFA ( $r = 0.253$ ,  $P = 0.012$ )、AHGF と HAI-1 ( $r = 0.299$ ,  $P = 0.001$ ) の間にそれぞれ正の相関を認めた (Figure 5)。

### Ⅱ-4. 考察

HGF と c-Met プロトオンコジーンは、前立腺癌で過発現している [13, 19]。そして HGF は、前立腺癌細胞株で増殖、浸潤そして細胞遊走を刺

激する。血清 HGF 値は、前立腺癌を認めなかった症例と比較し前立腺癌を認めた症例で上昇しており、また限局癌より転移性癌で上昇していた[18]。CRPC 患者の HGF 値が高値であることは、生存率の低下と関連している[20]。血清 THGF は、前立腺、乳房、結腸、胃癌を含めた悪性疾患で上昇することが報告されている。

我々の知る限り AHGF について前立腺癌で報告された研究はこれまでなかった。今回の検討においては、前立腺癌患者の THGF と AHGF 値を測定し、これらと臨床病理組織学的因子との間の関連について評価を行った。今回我々は、血清 THGF が前立腺癌患者と良性前立腺疾患患者の間に有意差を認めなかったのに対し前立腺癌患者の血清 AHGF 値が良性前立腺疾患患者より有意に高値であることを初めて示した ( $P<0.0001$ )。さらに血清 AHGF 値は、転移がない前立腺癌患者と比較して遠隔転移を有する患者と CRPC 患者でより高値であった (それぞれ  $P=0.0033$ 、 $P<0.0001$ )。また組織学的悪性度での比較では、低分化型腺癌の患者が高分化型腺癌の患者より血清 AHGF 値は有意に高値であった ( $P=0.013$ )。これらの結果は、AHGF が前立腺癌の進展において何らかの影響を及ぼしている可能性があり、これまでの THGF の検討よりさらに鋭敏に病勢を表現していることが示唆される。

さらに平均血清 AHGF/THGF 比が、良性前立腺疾患患者と比較し未治療前立腺癌患者において有意に高値 ( $P<0.0001$ ) であることも発見した。加えて CRPC 患者の平均血清 AHGF/THGF 比が、stage B 患者より有意に高かった ( $P=0.008$ )。この結果は、前立腺癌進行の指標として血清 AHGF/THGF 比が有用であるかもしれないことを示唆している。以上より AHGF は、より有用な前立腺癌の予後因子であると考ええる。しかし今回は少数の症例における報告でありさらに多くの症例について検討する必要があると思われた。

HGF は、pro-HGF と呼ばれる非活性型 1 本鎖前駆体として分泌される。pro-HGF は、HGFA やマトリプターゼ、プラスミノゲン・アクチベーターによって 2 本鎖の活性型に変換される。HGF の活性化において HGFA がもっとも強力な酵素である。HGFA は、非活性型 (pro-HGFA) としておもに肝細胞から分泌されトロンビンによって活性型になる [23] が、乳癌 [10] や腎細胞癌 [24]、結腸直腸癌 [25] や肝細胞癌 [26] といった様々な癌細胞からも分泌されている。我々は以前の報告で、血清 HGFA 値が進行性前立腺癌患者特に CRPC 患者で上昇することを証明した [11]。前立腺癌患者の血清 HGFA 値増加は、より多くの pro-HGF を処理できることから AHGF により強く影響している可能性がある。今回の未治療

前立腺癌患者における検討で血清 AHGF と HGFA の間に有意な相関を認めた ( $r=0.253$ 、 $P=0.012$ )。

HGFA 活性は、HAI-1 と HAI-2 により細胞周囲微小環境でコントロールされている。HAI-1 と HAI-2 は、1 型膜貫通蛋白で 2 つのクニッツ型セリンプロテアーゼインヒビタードメインを有している。細胞外ドメインの放出により HAI-1 と HAI-2 は分泌型となり強力に HGFA を阻害する。しかし膜貫通型の場合、HAI-1 は HGFA と結合できるが HAI-2 は結合できない。癌細胞において細胞表面の HAI-1 と HGFA/HAI-1 複合体は、メタロプロテアーゼにより 58kDa の分泌型 HAI-1 として急速に上皮細胞から放出される。58kDa の HAI-1 は HGFA と低親和性の特徴を有していて複合体から HAI-1 を切り離す。その結果、HGFA 活性の有意な上昇を細胞周囲に引き起こす[22, 27, 28]。膜型 HAI-1 は、ある特定の細胞条件において活性型 HGFA の細胞周囲濃度調節におけるインヒビターとしてのみではなくリザーバーとしても機能している。HAI-1 mRNA は、いくつかの正常細胞と様々な種類の癌細胞で発現している。HAI-1 蛋白は、前立腺癌細胞株である PC-3 や DU-145 でも発現していた[10]。Knudsen らは、HAI-1 が正常細胞と比較して限局性前立腺癌で有意に発現が増加していることを報告し、前立腺全摘除術後の前立腺

特異抗原（prostate specific antigen：PSA）再発の増加と HAI-1 発現の間に有意な関連があることを示した[29]。我々の以前の検討で血清 HAI-1 が、転移がない症例と比較し遠隔転移がある症例や CRPC 患者でより高値になることを報告した[12]。今回の検討では、未治療前立腺癌患者で血清 AHGF と HAI-1 の間に有意な相関を認めた（ $r=0.299$ 、 $P=0.001$ ）。これらの結果は、HAI-1 が前立腺癌における進行や HGF 活性において重要な役割を有している可能性があることを示唆する。

### Ⅲ．前立腺癌における HAI-1 の発現

#### Ⅲ-1．はじめに

HGF は非活性型の pro-HGF として分泌され HGFA やマトリプターゼによって活性型の AHGF となり細胞周囲微小環境において重要な役割を果たすと考えられている[4-6]。HGFA 活性は、HAI-1 と HAI-2 と呼ばれる 2 つのセリンプロテアーゼインヒビターによって調節されている[7, 8]。HAI-1 は、マトリプターゼの阻害も行っている[9]。HAI-1 の mRNA は、腎臓、脾臓、前立腺、小腸、肺や胎盤の正常組織そして多くの癌細胞において発現している。我々は、血清 HGFA と HAI-1 値が、進行した病期の前立腺癌患者において上昇すること、さらに HGFA と HAI-1 値が正の相関関係にあることを証明した[11, 12]。これらの結果は、HGFA と HAI-1 が前立腺癌の進行に重要な役割を果たす可能性があることを示唆している。今回我々は、正常前立腺細胞株や前立腺癌細胞株および前立腺標本を用いて前立腺組織における HAI-1 の発現を解析した。

#### Ⅲ-2．材料と方法

##### Ⅲ-2-1．対象とした前立腺細胞株

HAI-1 の mRNA を RT-PCR 法にて測定し膜型 HAI-1 の発現は Flow

cytometry (FACS scan) にて測定した。正常前立腺細胞株は、PrEC cells と PrSC cells を用いた。また前立腺癌細胞株は、PC-3、DU-145、LNCaP を用いた。

### Ⅲ-2-2. 対象とした患者

2000 年から 2006 年に富山大学附属病院で診断された 75 人の未治療前立腺癌患者と前立腺癌を認めない 51 人の患者を対象とした。前立腺癌は経直腸式超音波ガイド下の系統的針生検によって病理組織学に診断された。Jewett 病期分類[30]で病期分類を行い、組織学的悪性度は前立腺癌取り扱い規約第 3 版[31]に基づいて行った。75 人の前立腺癌患者の 29 人が stage B、28 人が stage C、18 人が stage D であった。さらに 24 人の CRPC 患者についても HAI-1 の発現を評価した。この検討での CRPC は、外科的去勢、薬物による去勢状態で、かつ血清テストステロンが去勢レベルであるにもかかわらず病勢の増悪、PSA の上昇をみた場合と定義された。PSA の上昇は、4 週間以上あけて測定した PSA が最低値から 25%以上の上昇かつ上昇幅が 2.0ng/ml 以上とした。全ての症例で本研究の登録前にインフォームドコンセントを得た。本研究は、本学の倫理審査委員会によって承認された。



### Ⅲ-2-3. 前立腺細胞における HAI-1 の mRNA 発現 (RT-PCR)

前立腺細胞における HAI-1 の発現は RT-PCR にて評価した。正常前立腺細胞株 (PrEC cell、PrSC cell) 前立腺癌細胞株 (LNCaP、PC-3) からの Total RNA の抽出は RNA 抽出用試薬アイソジェン (ニッポンジェン、東京) を用いて行った。これらの RNA から、First Strand cDNA Synthesis Kit (Science Inc., FL) を用いて、cDNA を作製した。PCR は TAKARA “Ex Taq™” PCR Kit を用い、denaturation (94℃、30 秒)、annealing (57℃もしくは 60℃、1 分)、extension (72℃、1 分 30 秒) にて行った。PCR 生成物を 1.5%アガロースゲル上で電気泳動にかけエチジウムブロマイドにより目的とするバンドを染色し、バンドの濃度をマスタースキング分析装置により定量した。対照として内因性コントロールである GAPDH のバンドを用い、目的のバンドとの濃度比をとることにより、遺伝子発現の強弱を比較した。

### Ⅲ-2-4. 前立腺癌細胞株における膜型 HAI-1 の測定 (Flow cytometry)

前立腺癌細胞株 (LNCaP、DU-145、PC-3) は、37℃の 5%CO<sub>2</sub> イン

キュベーター内で 10% 牛胎児血清 (FCS) と抗生物質を含む RPMI-1640 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) で培養した。蛍光強度は FACScaliber flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて 20000 細胞/サンプルで測定した。データーは CELL Quest research software (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ, USA) にて分析した。

### Ⅲ-2-5. 前立腺組織における HAI-1 の免疫染色

前立腺生検によって得られた組織は、直ちに 10%ホルマリンで固定しパラフィン包埋化した。パラフィン包埋した組織を 5  $\mu$  m に薄切し、キシレンで脱パラフィンしアルコールで段階的に再水和した。抗原賦活化は、緩衝液 TRS (Target Retrieval Solution) (pH 9.0; Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) で加圧式加温チャンバー (Pascal; Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) を用いて 120℃、4 分間で行った。内因性ペルオキシダーゼ活性は、0.1%アジ化ナトリウムを含む 0.3%過酸化水素にて室温 5 分間にてブロッキングし非特異的ブロッキングはブロッキング試薬 (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) で室温 10

分間にて行った。1 次抗体は 1000 倍希釈の抗ヒト HAI-1 ヤギポリクロナール抗体（R&D System Inc., Minneapolis, MS, USA）で 4℃にて一夜反応させた。Tris-Buffered Saline(TBS)で 3 回洗浄後、2 次抗体（Histofine MAX-PO(G) ; Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japan）と室温で 45 分間反応させた。TBS で 3 回洗浄後、3'3'-ジアミノベンジジン（Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA）で発色させ、ヘマトキシレンで核染色後封入した。

### Ⅲ-2-6. 免疫染色の評価

免疫組織化学的染色のスコアは、染色強度により 0 (negative)、1+ (weak)、2+ (moderate)、3+ (strong) の 4 段階に分類した (Figure 6)。全生検組織における染色強度のもっとも多く認める強度をその症例のスコアとした。細胞質の染色は評価せず細胞膜が 50%以上染色されている場合に陽性と判断した。すべてのスライドは 2 人の研究者で評価した。それぞれの判定が異なった場合は、マルチヘッド顕微鏡を用いて再評価を行い最終的に全症例でスコアの合意が行われた。

### Ⅲ-2-7. 未治療前立腺癌における HAI-1 score と PSA

## progression-free survival についての検討

75名の未治療前立腺癌患者について HAI-1 score 0 のグループ (n=5、6.7%) と HAI-1 score 1 から 3 のグループ (n=70、93.3%) に分け PSA progression-free survival について検討を行った。PSA progression の定義は、初回治療がアンドロゲン除去療法 (androgen deprivation therapy : ADT) や去勢術の症例は 4 週間以上あけて測定した PSA が最低値から 25% 以上の上昇かつ上昇幅が 2.0ng/ml 以上とし、手術療法の場合は、4 週間以上あけて測定した PSA が 2 回連続して 0.2ng/ml 以上、放射線療法の場合は、照射後の PSA が最低値 + 2.0ng/ml 以上となった場合とした。

### Ⅲ-2-8. 統計学的解析

統計学的検討は、Statview 5.0 (Abacus Concepts, Berkely, CA, USA) で行われた。全ての値は平均 ± 標準偏差 (mean ± SD) (中央値、range) で表し、2 群間の比較には Mann-Whitney U-test と Spearman's rank correlation coefficient を用いた。2 群間以上の比較検定には one-way analysis of variance (ANOVA) と多重比較検定を用いて有意差検定をした。PSA progression-free survival rate は、Kaplan-Meier 法を用

いて生存曲線を描き、log-rank 検定にて群間の有意差検定を行った。

$P < 0.05$  の場合統計学的に有意差ありとした。

### Ⅲ-3. 結果

#### Ⅲ-3-1. 前立腺細胞における HAI-1 mRNA の発現について

正常前立腺上皮細胞株 (PrEC)、前立腺癌細胞株 (LNCaP、PC-3) に HAI-1 mRNA 発現を認めたが、正常前立腺間質細胞株 (PrSC) にはその発現を認めなかった (Figure 7)。

#### Ⅲ-3-2. 前立腺癌細胞株における膜型 HAI-1 の発現について

前立腺癌細胞株について膜型 HAI-1 の発現を FACS で検討したところ、検討したすべての前立腺癌細胞株に膜型 HAI-1 の発現を認めた (Figure 8)。

#### Ⅲ-3-3. 前立腺組織における HAI-1 の発現について

我々は、前立腺生検で前立腺癌を認めなかった 51 人の患者と前立腺癌と診断された 75 人の患者における HAI-1 の発現を免疫組織学的に検討した。症例の臨床病期と組織学的悪性度は、Table 2 に示される通り

であった。51の良性前立腺組織において47検体（92%）でHAI-1の染色陽性で4検体が陰性であった。47例中10例がweak、32例がmoderate、5例がstrongであった。75の前立腺癌組織では70検体（93%）がHAI-1陽性で、5検体が陰性であった。70例中6例がweak、30例がmoderate、34例がstrongであった（Table 3）。各々の免染強度の代表例はFigure 6に示した。非前立腺癌組織群と前立腺癌組織群におけるHAI-1染色強度の平均スコアは、それぞれ $1.75 \pm 0.74$ （median 2、range 0-3）と $2.24 \pm 0.87$ （median 2、range 0-3）であり前立腺癌組織におけるHAI-1免染強度が有意差をもって高値であった（ $P < 0.05$ ）。Table 3に各臨床病期別、組織学的悪性度別のHAI-1スコアを示した。平均HAI-1スコアは、stage Bが $2.24 \pm 0.69$ （median 2、range 0-3）、stage Cが $2.14 \pm 1.04$ （median 2、range 0-3）、stage Dが $2.39 \pm 0.85$ （median 3、range 0-3）でありこれらの間には有意差を認めなかった。組織学的悪性度においては、高分化型腺癌が $2.06 \pm 0.66$ （median 2、range 0-3）、中分化型腺癌が $2.46 \pm 0.74$ （median 3、range 0-3）、低分化型腺癌が $2.13 \pm 1.04$ （median 2、range 0-3）でありこれらの分類においてもHAI-1の発現に有意差を認めなかった。

### Ⅲ-3-4. 去勢抵抗性前立腺癌における HAI-1 の発現について

24 人の CRPC 患者における前立腺組織の HAI-1 発現について検討を行った。24 例の患者特徴を Table 4 に示す。HAI-1 の発現は、Figure 9 に示す通り転移性前立腺癌患者と比較し有意に低値であった ( $P<0.05$ )。

### Ⅲ-3-5. 前立腺癌の HAI-1 スコアと PSA progression-free survival rate について

前立腺癌患者 75 人について検討した。追跡期間は、中央値 63 ヶ月 (range 0-118) であった。対象とした 75 人中 26 人 (34.7%) が、中央値 28 か月 (range 0-114) で PSA progression を認めた。HAI-1 スコアが、陰性であったグループ ( $n=5$ , 6.7%) と陽性であったグループ ( $n=70$ , 93.3%) の 2 群に分けて検討した PSA progression-free survival rate は、Figure 10 に示す通りであった。HAI-1 スコアが陰性であったグループは陽性であったグループと比較し PSA progression-free survival が有意に短かった ( $P<0.05$ )。

## Ⅲ-4. 考察

本研究において、前立腺癌患者における HAI-1 の発現は前立腺癌を有

しない患者と比較し有意に高かった。HAI-1 の発現は前立腺癌の臨床病期や組織学的悪性度とは相関していなかった。しかし HAI-1 の発現が陰性であった症例は、より短い PSA progression-free survival と有意に関連していた。今回の結果は Saleem らが報告 [32] した HAI-1 の蛋白レベルが、良性前立腺肥大症や PIN, 前立腺癌より正常前立腺組織で高いという結果と異なっていた。彼らは、前立腺癌の病期進行とマトリプターゼの増加や HAI-1 発現の減少が、前立腺疾患の生物学的活動性の進行と関連しているかもしれないと考察していた。一方、Knudsen らは我々と同様限局性前立腺癌と正常前立腺を比較し前立腺癌において HAI-1 の発現が有意に増加することを報告していた [29]。片岡らは、HAI-1 が HGFA のインヒビターとしてだけではなく細胞表面においてこの酵素のリザーバーとして機能しており組織の損傷や炎症といった特殊な環境において HGFA と HAI-1 がともに放出され細胞周囲微小環境における HGFA 活性を亢進させる働きを有していると報告している [27]。今回の研究の結果からこの現象は前立腺癌組織においても生じていると考えられた。

Knudsen らは、HAI-1 の発現と前立腺全摘出術後の PSA 再発リスクとの間に有意な関連があることを発見した [29]。さらに彼らは、転移性前立腺癌の HAI-1 の発現を検討し、16 例の骨転移症例と 15 例のリンパ



節転移症例の全症例においてその発現を証明した。以前の我々の検討において前立腺癌患者の血清 HAI-1 が、転移のない症例と比較し遠隔転移を有するか CRPC となった症例において有意に高値であることが示されていることから HAI-1 が前立腺癌の進行に重要な役割を有している可能性があることが考察された。したがって今後我々は、血清 HAI-1 の上昇の原因として転移巣における HAI-1 が過発現しているかどうかを検討する必要があると考えている。

これまでに CRPC 症例における膜型 HAI-1 発現を検討した報告はなく本研究が最初の報告である。本研究において膜型 HAI-1 は、未治療の転移性前立腺癌と比較し CRPC 患者で低下していた。さらに組織において HAI-1 の発現を認めなかった症例は、HAI-1 の発現が少しでもあった症例より PSA progression-free survival rate が有意に短かった。この結果から HAI-1 は前立腺癌の進行と関連がある可能性がある。これまでの研究においても前立腺、乳房、胃および婦人科癌の進行において HAI-1 の発現減少が必要であると報告されている [10、32、33、34]。福島らは、ヒト膀胱癌細胞株 SUIT-2 の肺転移に関する HAI-1 ノックダウンの影響を検討し HAI-1 欠乏が、肺転移の増強を引き起こすことを示した。この結果から HAI-1 の減少は、癌細胞の遊走や浸潤を増強させる可能性を示唆

する[35]。これらの結果から HAI-1 を標的とした治療は、癌の転移を制御する可能性が示唆されるが、治療アプリケーションとして用いるには更なる検討が必要である。

CRPC 症例で HAI-1 の発現が低下しており予後不良と HAI-1 発現の減少が関連しているという結果からホルモン感受性のある前立腺癌においては HAI-1 の発現が亢進しているかもしれないことが示唆される。

Knudsen らは、neoadjuvant ホルモン除去療法後の前立腺全摘標本を検討しており 3 ヶ月以上のホルモン除去が有意に HAI-1 の発現を低下させることを示した[29]。今回我々が検討した CRPC 症例は、一次療法としてホルモン除去療法が施行された症例であり、Knudsen らの結果と整合性を認める。これらの結果から HAI-1 の蛋白発現は、アンドロゲンによって制御できるかもしれない。しかしアンドロゲン除去療法後の HAI-1 発現減少の正確なメカニズムは、根治的前立腺全摘除術の組織検体や CRPC 症例の組織検体からは明らかにはならなかった。今後、ホルモン感受性のある前立腺癌細胞株にアンドロゲン刺激を行う条件と行わない条件で培養するといった *in vitro* の検討を行う必要がある。

アンドロゲン除去と HGF/c-Met シグナリングの関係は、現在検討が行われている。Verras らは、前立腺癌進行のメカニズムとしてアンドロ

ゲン受容体が、HGF の受容体である c-Met の発現にマイナスの調節をしていると報告した[36]。彼らは、治療戦略としてアンドロゲン除去療法と組み合わせて HGF/c-Met 経路の活性を阻害することでベネフィットが得られるかもしれないと考察していた。Singh らは、*in vitro* の LNCaP 細胞株モデルにおいてアンドロゲン非依存性の進展がみられる間、HGF と c-Met の発現がアップレギュレーションすることを示した[37]。一方で中城らは、前立腺全摘除前のホルモン除去療法は、臨床検体の癌細胞における HGF/c-Met の発現の変化に影響していないと報告している[38]。しかし中城らと同じグループの前田らは、c-Met に特異的な siRNA を用いた c-Met のノックダウンが、アンドロゲン除去療法による c-Met 発現の誘導を阻害し前立腺癌細胞の発育を抑制することを示した[39]。Tu らは、進行性前立腺癌に対するアンドロゲン除去療法と合わせて施行した時、抗細胞増殖としての c-Met インヒビターの効果を示した[40]。Cabozantinib (XL184) は、c-Met や VEGFR2 といったマルチカイネースシグナル経路の経口低分子阻害剤である。転移性 CRPC 患者に対する「Randomized discontinuation」試験の Phase II study 中間解析が、Hussain らによって報告された[41、42]。12 週間の治療後、部分寛解を認めた患者は Cabozantinib の薬剤名を提示して継続、病状に変化がな

かった患者にはブラインドで Cabozantinib とプラセボの無作為治療を継続、病状の進行した患者は治療が中断された。Cabozantinib 1 日 100mg 投与は、6 週という早い時期に骨スキャンとマーカーの骨パラメーターにおいて改善を認めた。骨評価が可能な症例で骨転移の 86%が完全消失もしくは部分消失、12%の安定化が報告された。長期無進行生存が、無作為化の行われた患者において記録された。したがって、アンドロゲン除去療法後の HAI-1 発現減少は、前立腺癌の HGF/c-Met 発現増加と関連しているかもしれない。

今回の研究にはいくつかの留意点がある。症例数が比較的小さく後ろ向き研究である。より大きなグループで前向き検討が行われた場合に結果が異なる可能性がある。CRPC における HAI-1 発現減少の結果は、アンドロゲン除去療法の治療効果によって起こっているかもしれない。このことは、neoadjuvant アンドロゲン除去療法後の前立腺全摘除標本を用いた中城らの研究[38]によって検討されていた。しかし我々は、長期に初回アンドロゲン除去が施行されている非 CRPC 前立腺組織の検討を行っていない。

結論として HAI-1 発現は、良性前立腺組織と比較して前立腺癌組織で増加した。HAI-1 の免疫組織化学的発現と臨床病理組織学的因子の間に

有意な関連は認めなかった。HAI-1 発現は、アンドロゲン除去療法前の転移性前立腺癌症例と比較し CRPC 症例において有意に低下していた。このことから HAI-1 は、CRPC の発生機序において重要な役割を果たしている可能性が示唆される。さらに HAI-1 発現陰性であることは、より短い PSA progression-free survival と有意に相関していた。これらの結果を解析するには更なる研究が必要と考えられた。

#### IV. 結論

前立腺癌の進展や転移、浸潤において HGF およびその関連蛋白は重要な役割を担っている可能性が示唆される。さらに HAI-1 は、治療抵抗性前立腺癌の発生機序において重要な役割を果たしている可能性が示唆される。このことからこれらの蛋白を標的とした治療を考察することによってこれまで制御不可能であった去勢抵抗性前立腺癌の更なる治療改善に寄与する可能性が示された。

## V. 謝辞

本学位論文は公表された 2 論文[43、44]をもとに構成され、平成 18 年 4 月から平成 25 年 9 月にわたり腎泌尿器科学講座において行われた研究内容をまとめたものである。

稿を終えるに当たり、終始御指導を賜りました富山大学大学院医学薬学研究部 腎泌尿器科学講座 布施秀樹 教授に心より感謝申し上げます。

また、本研究の遂行、ならびに論文の作成に当たり、御指導を賜りました富山大学大学院医学薬学研究部 腎泌尿器科学講座 小宮顕 准教授に感謝申し上げます。

また腎泌尿器科学講座の各位、新潟県立中央病院 病理診断科 尾矢剛志部長にはご支援を賜ったことをここに感謝いたします。

## VI. 参考文献

1. Sakata H, Takayama H, Sharp R, Rubin JS, Merlino G, LaRochelle WJ. Hepatocyte growth factor/scatter factor overexpression induces growth, abnormal development, and tumor formation in transgenic mouse livers. *Cell Growth Differ.* 1996;7:1513–1523.
2. Tajima H, Matsumoto K, Nakamura T. Regulation of cell growth and motility by hepatocyte growth factor and receptor expression in various cell species. *Exp Cell Res.* 1992;202:423–431.
3. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffey A, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol.* 1992;119:629–641.
4. Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura A, Kondo J, Morimoto Y, Kitamura N. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J Biol Chem.* 1993;268:10024–10028.



5. Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura N. Activation of hepatocyte growth factor in the injured tissues is mediated by hepatocyte growth factor activator. *J Biol Chem.* 1996;271:3615–3618.
6. Lee SL, Dickson RB, Lin CY. Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J Biol Chem.* 2000;275:36720–36725.
7. Shimomura T, Denda K, Kitamura A, Kawaguchi T, Kito M, Kondo J, Kagaya S, Qin L, Takata H, Miyazawa K, Kitamura N. Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitztype serine protease inhibitor. *J Biol Chem.* 1997;272:6370–6376.
8. Kawaguchi T, Qin L, Shimomura T, Kondo K, Matsumoto K, Denda K, Kitamura N. Purification and cloning of Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2, a Kunitz-type serine protease inhibitor. *J Biol Chem.* 1997;272:27558–27564.
9. Oberst M, Anders J, Xie B, Singh B, Ossandon M, Johnson M, Dickson RB, Lin CY. Matriptase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo. *AmJ Pathol.*

2001;158:1301–1311.

10. Parr C, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. The hepatocyte growth factor regulatory factors in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:202–211.

11. Nagakawa O, Yamagishi T, Fujiuchi Y, Junicho A, Nagaike K, Fuse H. Serum hepatocyte growth factor activator (HGFA) in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Eur Urol.* 2005;48:686–690.

12. Nagakawa O, Yamagishi T, Akashi T, Nagaike K, Fuse H. Serum hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) and type 2 (HAI-2) in prostate cancer. *Prostate.* 2006;66:447–452.

13. Humphrey PA, Zhu X, Zarnegar R, Swanson PE, Ratliff TL, Vollmer RT, Day ML. Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma. *Am J Pathol.* 1995;147:386–396.

14. Kurimoto S, Moriyama N, Horie S, Sakai M, Kameyama S, Akimoto Y, Hirano H, Kawabe K. Co-expression of Hepatocyte growth factor and its receptor in human prostate cancer. *Histochem J.* 1998;30:27–32.

15. Nishimura K, Kitamura M, Takada S, Nonomura N, Tsujimura A, Matsumiya K, Miki T, Matsumoto K, Okuyama A. Regulation of invasive potential of human prostate cancer cell lines by hepatocyte growth factor. *Int J Urol*. 1998;5:276–281.
16. Nagakawa O, Murakami K, Yamaura T, Fujiuchi Y, Murata J, Fuse H, Saiki I. Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) on prostate cancer cell lines. *Cancer Lett*. 2000;155:173–179.
17. Fujiuchi Y, Nagakawa O, Murakami K, Fuse H, Saiki I. Effect of hepatocyte growth factor on invasion of prostate cancer cells. *Oncol Rep*. 2003;10:1001–1006.
18. Naughton M, Picus J, Zhu X, Catalona WJ, Vollmer RT, Humphrey PA. Scatter factor/hepatocyte growth factor elevation in the serum of patients with prostate cancer. *J Urol*. 2001;165:1325–1328.
19. Zhu X, Humphrey PA. Overexpression and, regulation of expression of scatter factor/hepatocyte growth factor in prostatic carcinoma. *Urology*. 2000;56:1071–1074.
20. Humphrey PA, Halabi S, Picus J, Sanford B, Vogelzang NJ, Small

EJ, Kantoff PW. Prognostic significance of plasma scatter factor/hepatocyte growth factor levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer: Results from cancer and leukemia group B 150005/9480. Clin Genitourin Cancer. 2006;4:269–274.

21. Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Blasi F, Comoglio PM. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. EMBO J. 1992;11:4825–4833.

22. Kataoka H, Miyata S, Uchinokura S, Itoh H. Roles of Hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor. Cancer Metastasis Rev. 2003;22:223–236.

23. Shimomura T, Kondo J, Ochiai M, Naka D, Miyazawa K, Morimoto Y, Kitamura N. Activation of the zymogen of hepatocyte growth factor activator by thrombin. J Biol Chem. 1993;268:22927–22932.

24. Yamauchi M, Kataoka H, Itoh H, Seguchi T, Hasui Y, Osada Y.

Hepatocyte growth factor activator inhibitor types 1 and 2 are expressed by tubular epithelium in kidney and down-regulated in renal cell carcinoma. *J Urol*. 2004;171:890–896.

25. Kataoka H, Hamasuna R, Itoh H, Kitamura N, Kono M. Activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in colorectal carcinoma. *Cancer Res*. 2000;60:6148–6159.

26. Nagata K, Hirono S, Ido A, Kataoka H, Moriuchi A, Shimomura T, Hori T, Hayashi K, Kono M, Kitamura N, Tsubouchi H. Expression of hepatocyte growth factor activator and Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;289:205–211.

27. Kataoka H, Shimomura T, Kawaguchi T, Hamasuna R, Itoh H, Kitamura N, Miyazawa K, Kono M. Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 is a specific cell surface binding protein of hepatocyte growth factor activator (HGFA) and regulates HGFA activity in the pericellular microenvironment. *J Biol Chem*. 2000;275:40453–40462.

28. Denda K, Shimomura T, Kawaguchi T, Miyazawa K, Kitamura N.

Functional characterization of Kunitz domains in Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1. J Biol Chem. 2002;277:14053–14059.

29. Knudsen BS, Lucas JM, Fazli L, Hawley S, Falcon S, Coleman IM, Martin DB, Xu C, True LD, Gleave ME, Nelson PS, Ayala GE. Regulation of hepatocyte activator inhibitor-1 expression by androgen and oncogenic transformation in the prostate. Am J Pathol. 2005;167:255–266.

30. Jewett HJ. The present status of radical prostatectomy for stages A and B prostatic cancer. Urol Clin North Am. 1975;2:105-124.

31. General Rule for Clinical and Pathological Studies on Prostate Cancer. 3rd edition. The Japanese Urological Association, the Japanese Society of Pathology, and Japan Radiological Society, Kanehara-shuppan, Tokyo, 2001;44-45.

32. Saleem M, Adhami VM, Zhong W, Longley BJ, Lin CY, Dickson RB, Reagan-Shaw S, Jarrard DF, Mukhtar H. A novel biomarker for staging human prostate adenocarcinoma: overexpression of matriptase with concomitant loss of its inhibitor, hepatocyte growth

factor activator inhibitor-1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:217-227.

33. Nakamura K, Abarzua F, Hongo A, Kodama J, Nasu Y, Kumon H, Hiramatsu Y. The role of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 (HAI-1) as a prognostic indicator in cervical cancer. *Int J Oncol.* 2009;35:239–248.

34. Nakamura K, Hongo A, Kodama J, Hiramatsu Y. The role of Hepatocyte growth factor activator inhibitor (HAI)-1 and HAI-2 in endometrial cancer. *Int J Cancer.* 2011;128:2613-2624.

35. Fukushima T, Kawaguchi M, Yamasaki M. Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 suppresses metastatic pulmonary colonization of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Sci.* 2011;102:407-13.

36. Verras M, Lee J, Xue H, Li TH, Wang Y, Sun Z. The androgen receptor negatively regulates the expression of c-Met: implications for a novel mechanism of prostate cancer progression. *Cancer Res.* 2007;67:967-75.

37. Singh AP, Bafna S, Chaudhary K, Venkatraman G, Smith L, Eudy

JD, Johansson SL, Lin MF, Batra SK. Genome-wide expression profiling reveals transcriptomic variation and perturbed gene networks in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Lett.* 2008;259:28-38.

38. Nakashiro K, Hayashi Y, Oyasu R. Immunohistochemical expression of hepatocyte growth factor and c-Met/HGF receptor in benign and malignant human prostate tissue. *Oncol Rep.* 2003;10:1149-53.

39. Maeda A, Nakashiro K, Hara S, Sasaki T, Miwa Y, Tanji N, Yokoyama M, Hamakawa H, Oyasu R. Inactivation of AR activates HGF/c-Met system in human prostatic carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347:1158-1165.

40. Tu WH, Zhu C, Clark C, Christensen JG, Sun Z. Efficacy of c-Met inhibitor for advanced prostate cancer. *BMC Cancer.* 2010;10:556.

41. Hussain M, Smith MR, Sweeney C, Corn PG, Elfiky A, Gordon MS, Haas NB, Harzstark AL, Kurzrock R, Lara P, Lin C, Sella A, Small EJ, Spira AI, Vaishampayan UN, Vogelzang NJ, Scheffold C, Ballinger MD, Schimmoller F, Smith DC. Cabozantinib (XL184) in metastatic



castration-resistant prostate cancer (mCRPC): results from a phase II randomized discontinuation trial. *J Clin Oncol*. 2011;029(Suppl): abstr4516.

42. Adamo V, Noto L, Franchina T, Chiofalo G, Picciotto M, Toscano G, Caristi N. Emerging targeted therapies for castration-resistant prostate cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:73.

43. Yasuda K, Nagakawa O, Akashi T, Fujiuchi Y, Koizumi K, Komiya A, Saiki I, Fuse H. Serum active hepatocyte growth factor (AHGF) in benign prostatic disease and prostate cancer. *Prostate*. 2009;69:346-351.

44. Yasuda K, Komiya A, Watanabe A, Morii A, Oya T, Nagakawa O, Fujiuchi Y, Fuse H. Expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1 (HAI-1) in prostate cancer. *Anticancer Res*. 2013;33:575-582.

VII. ☒

Fig. 1.

Hepatocyte Growth Factor (HGF) regulatory system

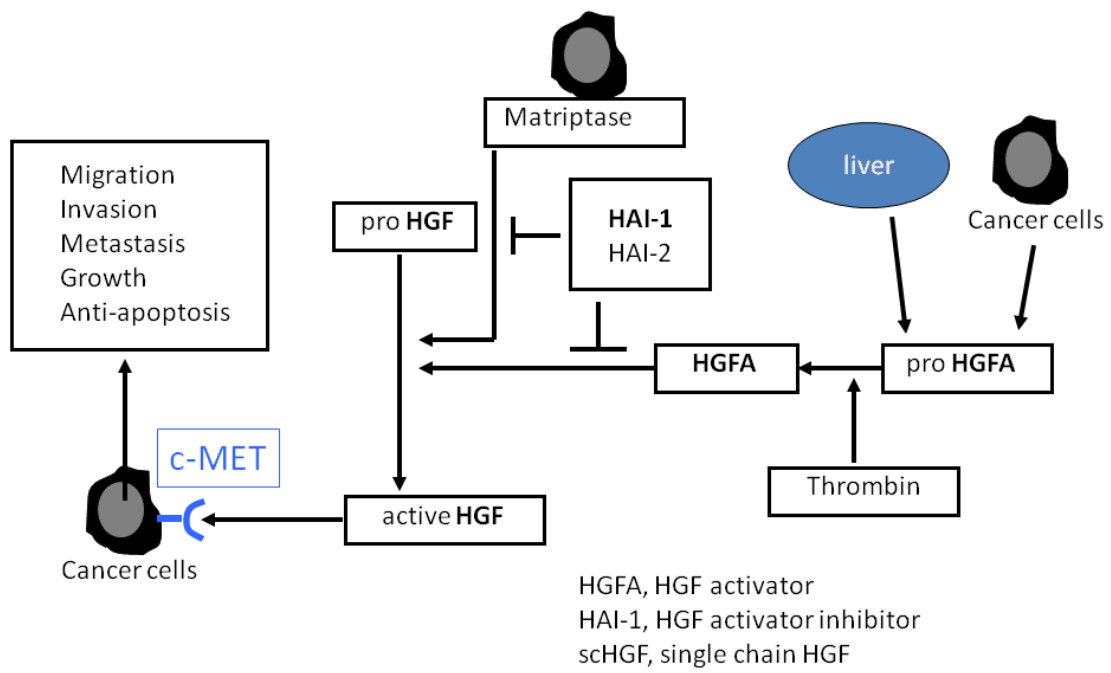
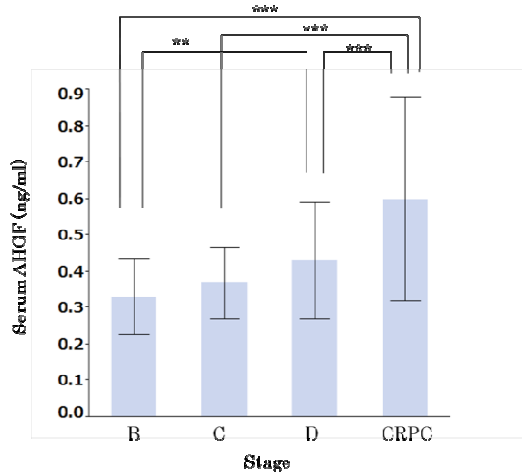


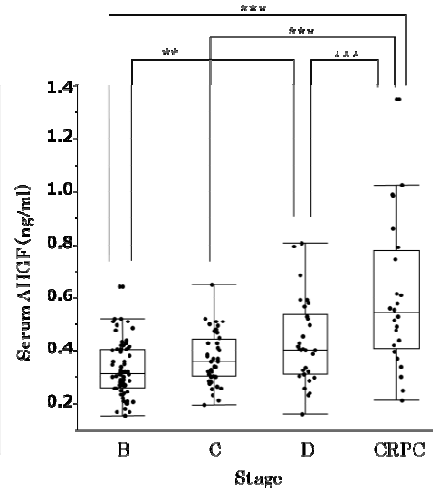
Fig. 2

Serum active hepatocyte growth factor (AHGF) levels according to clinical stage in patients with prostate cancer.

A



B

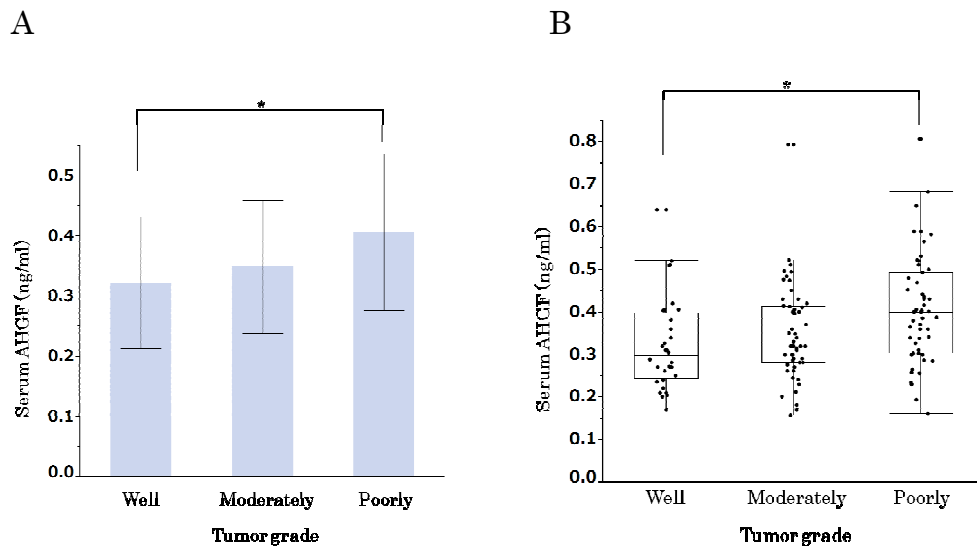


Serum AHGF was increased in patients with metastases or castration-resistant prostate cancer patients. Each bar represents the mean±SD (A). The horizontal bar in the box indicates the median value, the box indicates the 1<sup>st</sup> (25%) and 3<sup>rd</sup> (75%) quartile, the whiskers indicate 5-95%, the back circles indicate the outlier (B).

\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.0001

Fig. 3

Serum active hepatocyte growth factor (AHGF) levels according to tumor grade in patients with prostate cancer.

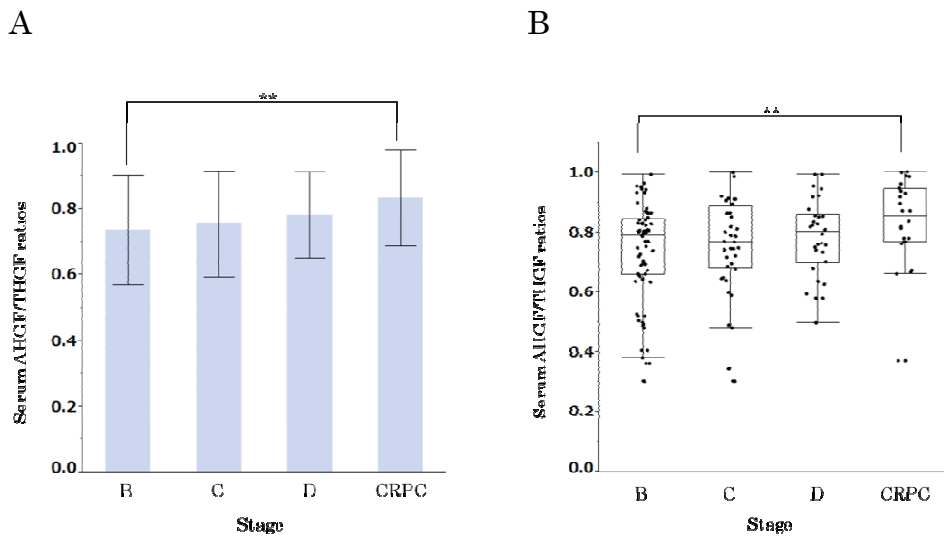


There were significant differences in serum AHGF levels between patients with poorly-differentiated and patients with well-differentiated adenocarcinoma. Each bar represents the mean±SD (A). The horizontal bar in the box indicates the median value, the box indicates the 1<sup>st</sup> (25%) and 3<sup>rd</sup> (75%) quartile, the whiskers indicate 5-95%, the back circles indicate the outlier (B).

\*p<0.05

Fig. 4

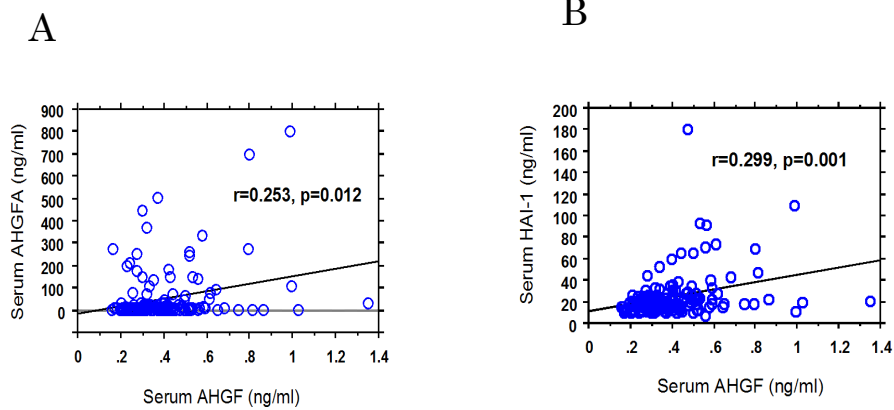
Serum active hepatocyte growth factor (AHGF)/ total hepatocyte growth factor (THGF) ratio according to clinical stage in patients with prostate cancer.



The serum AHGF/THGF ratio in patients with CRPC was significantly higher than in patients with stage B. Each bar represents the mean  $\pm$  SD (A). The horizontal bar in the box indicates the median value, the box indicates the 1<sup>st</sup> (25%) and 3<sup>rd</sup> (75%) quartile, the whiskers indicate 5-95%, the back circles indicate the outlier (B). \*\* $p < 0.01$

Fig.5

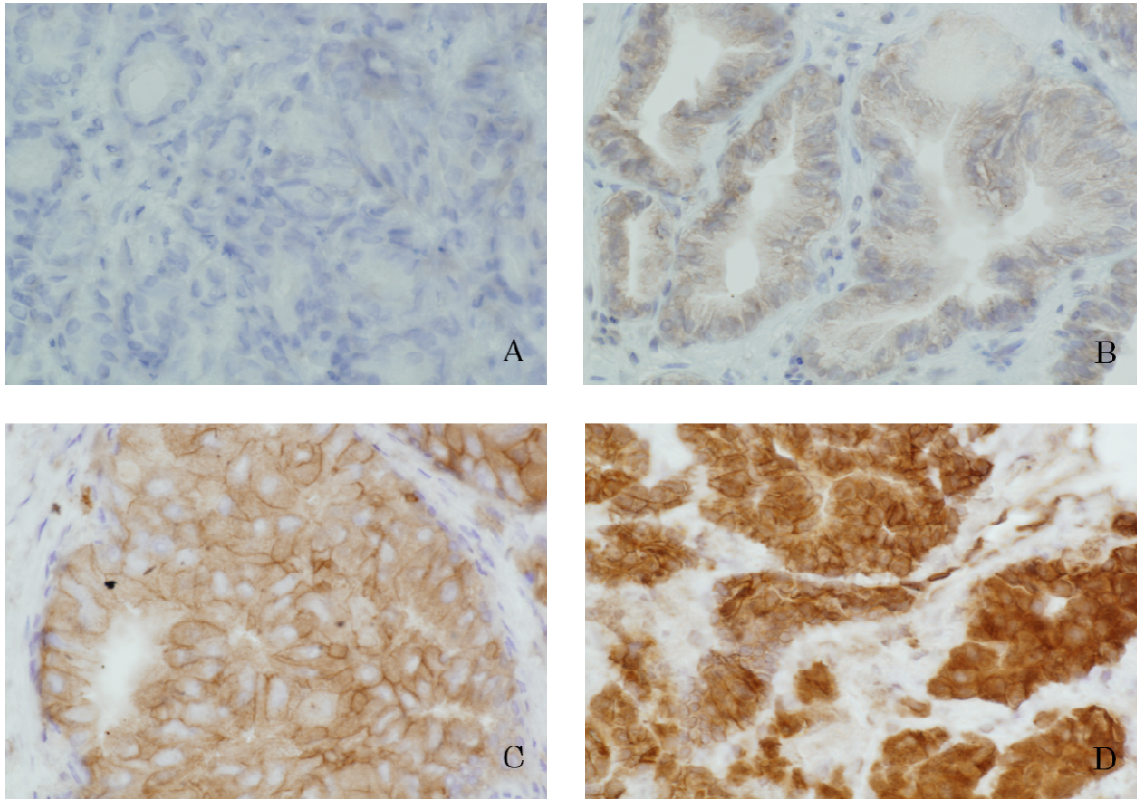
Relationships between serum active hepatocyte growth factor (AHGF) and hepatocyte growth factor activator (HGFA) or Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1 (HAI-1).



Positive correlations were revealed between serum levels of AHGF and HGFA (A). Positive correlations were revealed between serum levels of AHGF and HAI-1 (B).

Fig. 6

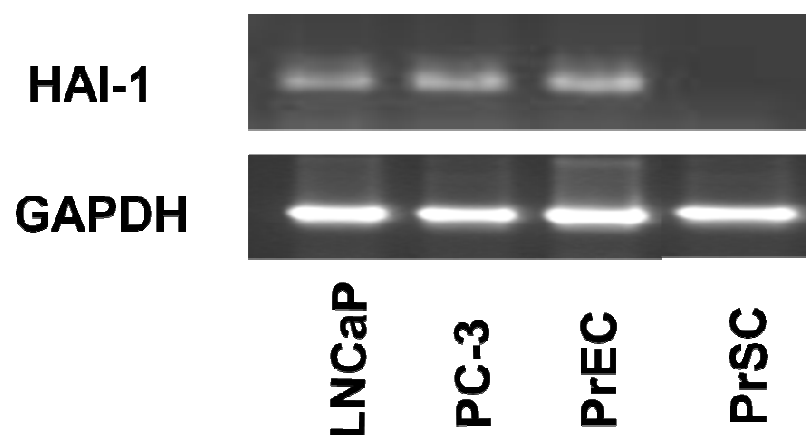
Immunohistochemical staining for Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1 (HAI-1) in prostatic tissues ( $\times 400$ ).



The following score system based on the staining intensity was applied for the immunohistochemical results: 0, negative (A); 1+, weak (B); 2+, moderate (C); and 3+, strong (D). Representative examples of the staining patterns are presented.

Fig. 7

RT-PCR analysis of Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1 (HAI-1) mRNA in prostate cancer cells and normal prostate cells.

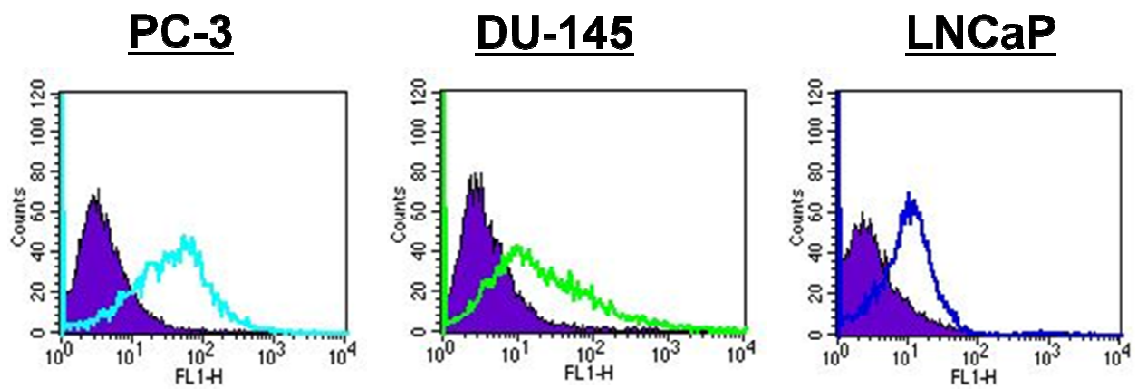


HAI-1 mRNA was expressed in LNCaP, PC-3 and PrEC. But it was not expressed in PrSC.



Fig. 8

Expression of transmembrane-form Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1 (HAI-1) on the surface in prostate cancer cells

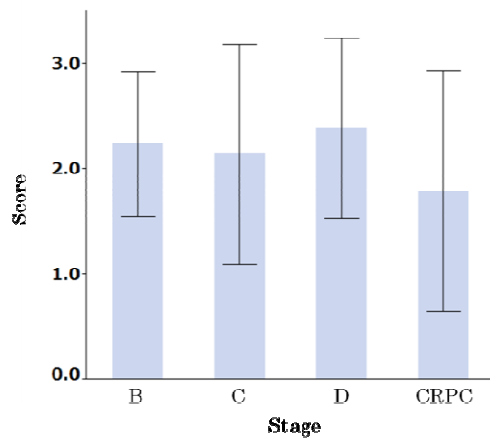


All of prostate cancer cell lines were expressed membrane-type HAI-1 on cell surface.

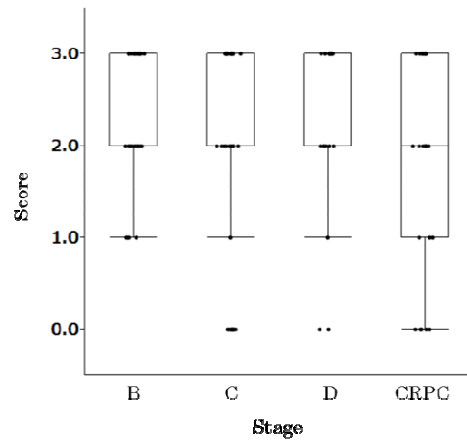
Fig. 9

Expression of Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1 (HAI-1) according to clinical stages in patients with prostate cancer.

A



B



Each bar represents the mean  $\pm$  SD (A). The horizontal bar in the box indicates the median value, the box indicates the 1<sup>st</sup> (25%) and 3<sup>rd</sup> (75%) quartile, the whiskers indicate 5-95%, the back circles indicate the outlier (B). \*P < 0.05 for the difference of stage D versus castration-resistant prostate cancer (one-way ANOVA).

Fig. 10

Kaplan-Meier curves of prostate-specific antigen  
progression-free survival in patients with prostate cancer  
stratified by immunohistochemical score (score 0 or scores 1 to  
3).

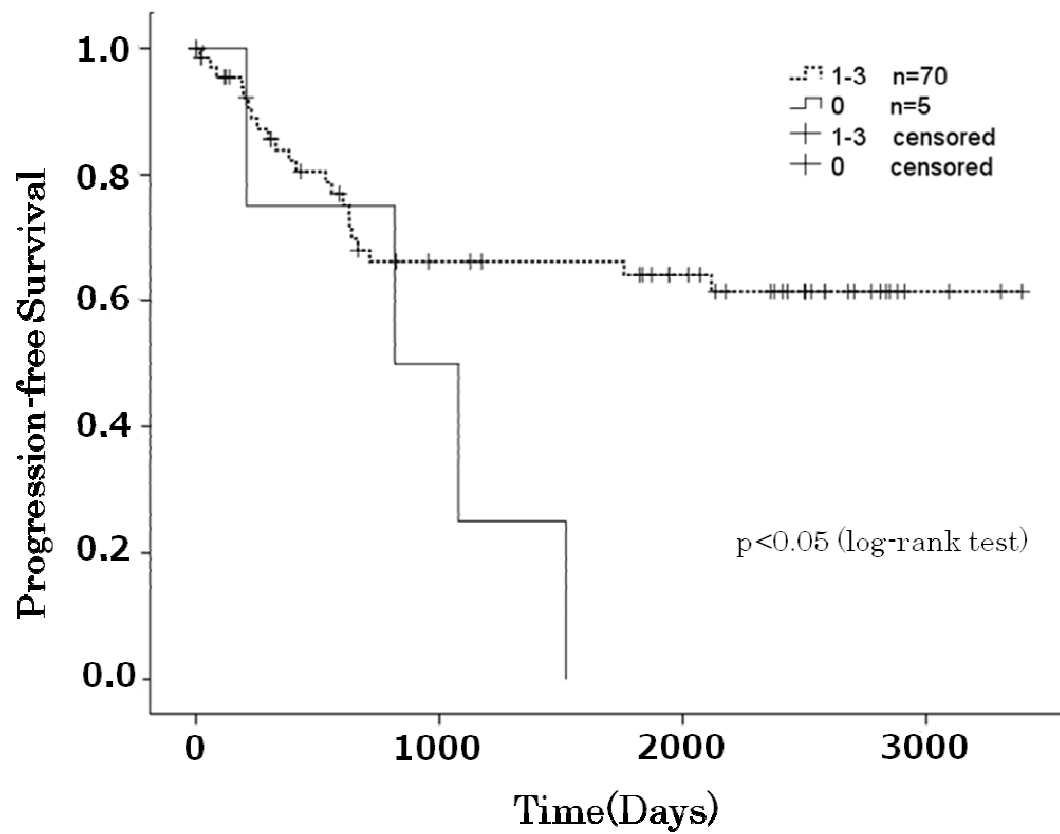


Table 1.

Patients characteristics.

	n	Age	PSA(ng/ml)	THGF(ng/ml)	AHGF(ng/ml)
Benign prostatic disease	38	69.1 ± 8.5	4.38 ± 2.20	0.45 ± 0.12	0.28 ± 0.08**
Prostate cancer					
Untreated	136	71.2 ± 8.2	611.90 ± 3751.51	0.50 ± 0.20	0.36 ± 0.12**
Clinical stage <sup>*</sup>					
B	66	67.1 ± 7.3	12.85 ± 16.08	0.46 ± 0.15	0.33 ± 0.10***
C	40	74.1 ± 7.0	86.50 ± 148.65	0.52 ± 0.23	0.37 ± 0.10
D	30	76.2 ± 9.3	2630.3 ± 7750.7	0.56 ± 0.22	0.43 ± 0.16***
Tumor grade					
Well	32	68.5 ± 7.5	11.41 ± 9.99	0.47 ± 0.17	0.33 ± 0.11****
Moderately	53	69.6 ± 7.7	401.0 ± 1510.6	0.55 ± 0.24	0.40 ± 0.20
Poorly	51	75.3 ± 7.9	529.2 ± 1677.1	0.56 ± 0.26	0.44 ± 0.18****
CRPC	24	72.6 ± 9.3	594.5 ± 1278.3	0.73 ± 0.32	0.60 ± 0.28*****

Well: well-differentiated adenocarcinoma; Moderately: moderately differentiated adenocarcinoma; Poorly: poorly differentiated adenocarcinoma; CRPC: castration-resistant prostate cancer.

Values represent the mean ± SD.

\* According to the Jewett staging system [30].

Untreated prostate cancer versus Benign prostatic disease.

\*\*P=0.0001

Stage B versus Stage D. \*\*\* P=0.0033

Well-differentiated adenocarcinoma versus Poorly-differentiated adenocarcinoma. \*\*\*\*P=0.013

CRPC versus Untreated prostate cancer. \*\*\*\*\*P<0.0001

Table 2.

Patients characteristics.

	n	Age	PSA(ng/ml)
		Mean $\pm$ SD(range)	Mean $\pm$ SD(range)
Controls	51	68.5 $\pm$ 7.9(55-81)	5.8 $\pm$ 3.0(1.6-13.3)
Prostate cancer			
Overall	75	74.0 $\pm$ 8.5(51-94)	475.7 $\pm$ 2228.6(3.1-18900)
Clinical stage*			
B	29	70.7 $\pm$ 7.6(54-85)	13.6 $\pm$ 16.7(3.1-93.1)
C	28	75.3 $\pm$ 7.7(59-94)	251.9 $\pm$ 621.8(8.9-2949)
D	18	77.2 $\pm$ 9.5(58-94)	1567.6 $\pm$ 4392.7(16-18900)
Tumor grade			
Well	17	71.5 $\pm$ 7.7(54-85)	9.5 $\pm$ 6.2(3.1-24.2)
Moderately	28	73.2 $\pm$ 7.4(59-87)	186.2 $\pm$ 409.3(4.6-1542)
Poorly	30	76.1 $\pm$ 9.5(55-94)	1009.6 $\pm$ 3466.2(5.7-18900)

PSA: prostate-specific antigen; Well: well-differentiated

adenocarcinoma; Moderately: moderately differentiated

adenocarcinoma; Poorly: poorly differentiated adenocarcinoma.

\*According to the Jewett staging system [30].

Table 3.

The expression of Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1 (HAI-1) in prostate cancer.

	n	score 0	score 1	score 2	score 3	p-Value
Controls	51	4	10	32	5	0.05>
Prostate cancer	75	5	6	30	34	
Clinical stage*						
B	29	0	4	14	11	0.65
C	28	4	1	10	13	
D	18	1	1	6	10	
Tumor grade						
Well	17	0	3	10	4	0.22
Moderately	28	1	1	10	16	
Poorly	30	4	2	10	14	

ICH: Immunohistochemical; Well: well-differentiated

adenocarcinoma; Moderately: moderately differentiated

adenocarcinoma; Poorly: poorly differentiated adenocarcinoma.

\*According to the Jewett staging system [30].

Table 4.

Characteristic of patients with castration-resistant prostate cancer (n=24).

Characteristic	Value
Age (years)	73.13 ± 7.96
Initial serum PSA (ng/ml)	556.17 ± 852.82
On study	81.35 ± 187.78
Clinical stage* (n)	
B	4
C	4
D	15
Tumor grade (n)	
Well	2
Moderately	12
Poorly	7
Previous therapies (n)	
Androgen deprivation therapy	24
Chemo therapy	6
HIFU	1
Radical prostatectomy	1

PSA: prostate-specific antigen; Well: well-differentiated

adenocarcinoma; Moderately: moderately differentiated

adenocarcinoma; Poorly: poorly differentiated adenocarcinoma;

HIFU: high intensity focused ultrasound.

\*According to the Jewett staging system [30].