

がん産生プロテアーゼ kallikrein 11 の  
生理的機能解明

**Identification of substrates for kallikrein 11  
produced by human cancer**

東京大学新領域創成科学研究科  
先端生命科学専攻  
がん先端生命科学分野  
佐野 厚美

## 目次

I. 要約	3
II. 序論	5
III. 材料と実験方法	8
IV. 実験結果	14
V. 考察	18
謝辞	21
図表	22
参考文献	32

## I. 要約

human kallikrein 11(遺伝子名 *KLK11*; タンパク名 hK11)は分泌型トリプシン様セリンプロテアーゼで、その発現は乳がん及び前立腺がんで予後に関わることが分かっているが、そのがん進展における機能は不明である。そこで本研究では、ヒトがん細胞の産生する hK11 の生理的機能を明らかにするため、各種ヒトがん細胞株において *KLK11* の発現を調べた。*KLK11* の発現は低分化型胃がんとエストロゲン依存性乳がんで発現が高かった。胃がんにおいては、胃がん細胞株を用いた同所移植マウスモデルにおける *KLK11* 発現と線維化のレベルの相関、及び胃がん発症において重要な働きをする増殖因子 transforming growth factor beta(TGF- $\beta$ )の活性化における hK11 の関与を検討した。しかし *KLK11* 発現と線維化の相関も、hK11 による潜在型 TGF- $\beta$  の分解も見られなかった。乳がんにおいては、細胞株を用いた実験で *KLK11* の発現がエストロゲン刺激によって増加し、ヒト乳がん組織の一部で *KLK11* の発現が認められた。次に、乳がんの増殖に寄与する insulin-like growth factors(IGFs)に着目し、その作用を阻害する IGF binding proteins(IGFBPs)に対する分解能を hK11 が有するか検討した。そして hK11 が IGFBP-3 を分解することを新規に見出した。以上の結果により、ヒト乳がん細胞において発現される hK11 が IGFBP-3 を分解し、活性化 IGF が腫瘍の増殖に寄与している可能性が示された。

## Abstract

Expression of human kallikrein 11(*KLK11*; hK11), secreted as a trypsin-like serine protease, is related to prognosis in ovarian and prostate cancer, but its physiological functions in the steps of cancer progression are still unknown. In order to elucidate physiological function and to identify substrates for hK11, the expression of *KLK11* was investigated in human cancer cell lines. *KLK11* was highly expressed in poorly differentiated type gastric cancer and estrogen dependent breast cancer cell lines. In gastric cancer, we analyzed correlation between *KLK11* expression and level of fibrosis in orthotopic mouse model using gastric cancer cell lines and investigated whether hK11 contributes to activation of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ), which plays an important role in gastric cancer development. However, neither the correlation between them nor enzymatic degradation of latent TGF- $\beta$  was observed. Expression of *KLK11* was stimulated by estrogen treatment in human breast cancer cell lines, and was detected in human breast cancer tissues. We then focused on insulin-like growth factors (IGFs) and investigated proteolytic ability of hK11 against IGF regulator, insulin like growth factor binding proteins (IGFBPs). hK11 was able to cleave IGFBP-3. These results indicate that hK11 expressed in human cancer cell degrades IGFBP-3 and facilitates bioavailability of IGFs, thereby affecting cancer cell proliferation and anti-apoptosis.

## II. 序論

がんの発生率は世界的に増加しており、日本においてもここ 25 年間でがんが死因の第 1 位を占め、最近では総死因の 3 割を超えるまでに至っている。近年の分子生物学や分子腫瘍学の急速な進歩によりがんの発生・増殖・進展に関わる因子が徐々に判明してきた。重要な役割を果たしていると考えられている因子の 1 つにペプチド結合の加水分解を行うプロテアーゼ(タンパク質分解酵素)がある。ヒトゲノムには少なくとも 553 のプロテアーゼ遺伝子が含まれているとされており[1]、プロテアーゼは大きく 4 種(セリン・システイン・メタロ・アスパラギン系)に分類される。腫瘍とプロテアーゼという観点で見ると、細胞外マトリックスを壊して腫瘍の浸潤・転移に寄与するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)に関して今日までに多数の報告がなされている一方、セリンプロテアーゼは最も古くから研究のされてきた酵素の 1 つであり、正常・疾患ともにさまざまな基質成分に対して作用する。

Tissue kallikrein(hK)は分泌型セリンプロテアーゼであり、多くの哺乳類に存在することが分かっている。ヒトでは 19q13.3-13.4 にセリンプロテアーゼで最大となる 15 個もの遺伝子からなる kallikrein ファミリー(遺伝子名: *KLK1*~*KLK15*、タンパク名 hK1~hK15)を形成し、例外はあるがファミリー間の相同性は DNA レベル・アミノ酸レベル共に 30%~50%である。その作用はトリプシン様/キモトリプシン様に分かれ、基質としては細胞外マトリックス(hK5, 6, 13,14)、fibronectin(hK3, 6)、plasminogen(hK3, 6, 13)などが既に知られているが、その働きに関しては未知の部分が多い。現在、がんにおいて kallikrein ファミリーが注目されているのは腫瘍マーカーとしての役割であり、実際に臨床では血清中の hK3(PSA)が前立腺がんの腫瘍マーカーとして用いられている。他の kallikrein ファミリーの多くは卵巣がん及び前立腺がんの進展マーカーとしての意義が示されている。kallikrein ファミリーが関わる腫瘍の多くは主に性ホルモンに関連した腫瘍であり、kallikrein 遺伝子の発現はステロイドホルモンによって発現調節

を受けていることが報告されている[2]。

*KLK11* がコードする hK11 は trypsin-like serine protease(TLSP)として PCR によりヒト脳の海馬で発現する分子として見出された[3]。他のファミリーと同様に *KLK11* にも選択的スプライシングによるアイソフォームが存在し、1<sup>st</sup> エクソンの異なるそれらは brain-type(isoform1)と prostate-type(isoform2)と呼ばれる[4-6]。hK11 は正常では脳、皮膚、唾液腺、胃、前立腺、乳腺、腸管など多くの組織で発現していることが確認されている[7, 8]。腫瘍においては、細胞株では前立腺がん、乳がん、組織では卵巣がん、前立腺がん、乳がん、肺がん、膝がん、大腸がん、神経内分泌がんで発現していることが報告されている[5, 9, 10]。*KLK11* の発現は性ホルモンであるエストロゲンとグルココルチコイドで調節されることも乳がん細胞株を用いた実験で示されている[7]。腫瘍マーカーとしては、前立腺がん及び卵巣がん患者の血清中で hK11 が上昇し[11]、それらの腫瘍組織における *KLK11*/hK11 の発現が予後に関わることが知られている[9, 12-18]。しかし、hK11 の酵素としての機能に関する報告はほぼ皆無であり、基質や組織における機能は未だに明らかにされていない。

近年世界的に胃がんの発生率は徐々に低下しているが、欧米に比べ日本での発生率は依然として高く、がんとしては男性で1位、女性で2位の罹患率であるため、その早期発見と転移予防は大きな課題となっている。胃がんの発生には腫瘍抑制遺伝子 *RUNX3* の欠失が重要な働きをすることが明らかとなっている。*RUNX3* は増殖因子 transforming growth factor beta(TGF- $\beta$ )を介した細胞シグナルの抑制に働くため、TGF- $\beta$  は胃がんの発生・進展にとって重要な役割を果たすことが推測されている。また、TGF- $\beta$  は線維芽細胞の増殖と組織の線維化に重要な働きをすることが知られている[19]。TGF- $\beta$  は LAP(latency-associated peptide)を伴った前駆体として細胞から分泌されるため、シグナルとして使われるためには細胞外で活性化されなければならない。活性化に関わる因子には、プロトンや細胞接着因子とともにプロテアーゼがあり、MMP、plasmin、そして hK3(PSA)などが知られている[20]。

また、日本人の女性における乳がん発症率は年々増加傾向にあり、現在、女性で

は胃がんを抜いて最も頻度の高いがんとなっており、年間約3万人が乳がん罹患している。エストロゲンは正常乳腺の発生・成長に深く関わっており、乳がんでもがんの増殖に寄与するため、エストロゲン受容体であるエストロゲンレセプター $\alpha$  (ER $\alpha$ )陽性(エストロゲン依存性)の腫瘍に対しては ER $\alpha$ を抑える治療が施される[21]。乳がん組織における *KLK11* 遺伝子の発現は、正常と比較してがんで僅かに低かったものの有意差はなかったとの報告がある[22]。

Insulin-like growth factors(IGFs)は腫瘍の増殖・抗アポトーシスに重要な働きをする因子として古くから研究されてきたものの1つであり、多くの組織で産生され、細胞表面の IGF レセプター(IGF-R)を介して細胞にシグナルを伝える。IGFs は乳がん、前立腺がん、大腸がんなどにおいて、がんの浸潤・転移に重要な役割を果たしていることが示されてきた[23-25]。多くの場合、IGFs は IGFs と高い親和性を有する IGF binding proein(IGFBP)-1~6 と共に産生され、それらと結合することで血中や組織中に不活性化型として安定して存在している。よってプロテアーゼによる IGFBPs の分解はがん細胞が IGFs シグナルを用いる上で重要なプロセスとなる。IGFBPs を分解する酵素としては MMP ファミリー、plasmin、thrombin、PAPP-A、Cathepsin L などがよく知られている[26-28]。kallikrein ファミリーについては、hK2, 3, 4 が IGFBPs の一部を分解することが判明しているが[29-32]、hK11 に関しては IGFBPs の分解に関与するか不明である。

そこで本研究では、ヒトがん細胞株における *KLK11* の発現の確認、ヒト胃がん同所移植マウスを用いた *KLK11* の機能検討、hK11 の基質の同定、ヒト乳がん組織における *KLK11* の発現の確認を通して、エストロゲンによって発現調節を受けるプロテアーゼ hK11 の生理的機能の解明を試みた。

### III. 材料と実験方法

#### 試薬

Recombinant human kallikrein 11(isoform1), latent TGF- $\beta$  1, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6, IGF-1 は R&D systems から購入した。

#### ヒト乳がん手術材料

本研究で用いた乳がん試料は国立がんセンター東病院において2002年に手術を受けた女性患者の27症例を用いた。患者の年齢は27才～80才で、中央値は53才であった。患者組織の利用にあたり、本研究は国立がんセンター倫理指針に基づいて研究を行った。

#### 培養細胞

本研究では、ヒト乳がん細胞株4種 MCF-7, T47D, MDA-MB231, MDA-MB468、ヒト胃がん細胞株8種 MKN-28, MKN-45, HSC-43, HSC-44PE, HSC-57, HSC-58, HSC-59, HSC-60、ヒト前立腺がん細胞株3種 CWR22Rv1, PC3, LNCaP、ヒト膵がん細胞株3種 Capan-1, MiaPaCa-2, BxPC-3、ヒト肺がん細胞株1種 A549、ヒト大腸がん細胞株1種 HT-29、ヒト線維芽細胞株1種 MRC-5 の計21細胞株を用いた。HSC-43, -44PE, -57, -58, -59, -60 は国立がんセンター実験動物管理室柳原五吉先生から供与を受けた。それ以外の細胞株は全て ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) から購入した。MiaPaCa-2, Capan-1 は Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM, Sigma)で、HT-29 は McCoy(GIBCO)で、MRC-5 は  $\alpha$ -MEM(GIBCO)で、その他の細胞株は RPMI1640 (Sigma)を培地として用い、Capan-1 は20%、それ以外は10% Fetal bovine serum(Equitech-Bio Inc.)を添加して、適当な大きさのシャーレ(FALCON®)を用いて37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養を行った。



## 定量 RT-PCR

各細胞、各組織からの RNA の抽出には TRIzol® reagent (Invitrogen)を用いた。ヒト組織はマルチピースショッカー(YASUI KIKAI)を用いてホモジナイズした。RNA は 40U の RNase-free DNase I(Takara)を用いて処理を行い、分光光度計を用いて total RNA 濃度を測定した。cDNA の合成には、ExScript™ RT reagent Kit(Takara Bio Co., LTD.)を使用し、500ng の total RNA と Random 6mers を含む 10  $\mu$ l の反応液で 42°C 15 分の逆転写反応を行い、その後 95°C 2 分で逆転写酵素を失活した。全ての定量 PCR 反応には SmartCycler® System(Cepheid)を用い、2x SYBR® Premix Ex Taq™(Takara)12.5  $\mu$ l、0.2  $\mu$ M 目的遺伝子特異的プライマー、逆転写反応産物 1  $\mu$ l を含む 25  $\mu$ l の反応液で定量を行った。内部標準として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の発現も確認した。反応条件は GAPDH が 95°C 5 秒、60°C 20 秒を 45 サイクル、*KLK11* が 95°C 5 秒、60°C 20 秒、83°C 6 秒を 45 サイクルで行った。用いたプライマー配列を示す。

*GAPDH* forward 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'

*GAPDH* reverse 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'

*KLK11* forward 5'-GCAATGACATCATGCTGGTGAAG-3'

*KLK11* reverse 5'-ATGTTGGCGCATCGCAAG-3'

*KLK11* のプライマーは isoform1 特異的なものを用いた。増幅された遺伝子産物の特異性は融解曲線とアガロースゲル電気泳動で確認した。検量線は RT-PCR 産物を  $1 \times 10^8$  から  $1 \times 10^2$  コピーまで段階希釈することで作成し、各サンプルの 50ng total RNA あたりの目的遺伝子の mRNA コピー数を割り出した。

## マウス胃がんモデル

6-7 週齢のメス重症複合型免疫不全症(severe combined immunodeficiency; SCID)マウス(CLEA Japan)の腹腔内にネンブタール(大日本製薬)を注射することによって麻酔を施し、正中に沿って切開、開腹し、29 ゲージの注射針を用いて  $1 \times 10^6$  の細胞を腺胃の大弯側の壁に注入した。細胞は施術の直前にシャーレからはがし、

RPMI-1640 に  $1 \times 10^6/50 \mu\text{l}$  で用意した。その後、胃を腹腔内に戻し、腹膜と皮膚のそれぞれを縫合した。マウスは 2 週後に胃を摘出し、摘出した胃を切開してホルマリンで固定して標本を作製し、腫瘍部に含まれる密な線維性間質の有無について組織学的に評価を行った。

### 酵素活性の確認

recombinant kallikrein 11 の活性の確認はフルオロスキャンアセント(大日本住友製薬)を用いて行った。まず、プレインキュベーション反応液(50mM Tris(pH6.8), 10mM  $\text{CaCl}_2$ , 1M NaCl)で添付書類に基づきメタロプロテアーゼ thermolysin を用いて kallikrein を活性化した後(1:40)、10mM EDTA で thermolysin を失活させ、10mM EDTA を含む 50mM Tris(pH8.3)溶液で  $100 \mu\text{M}$  基質と hK11 100ng を  $37^\circ\text{C}$  で反応させた。基質には過去に報告のある 2 種のペプチド、Z-Phe-Arg-MCA、及び Bz-Arg-MCA(PEPTIDE INSTITUTE, Inc.)を用い、ペプチドの分解で生じる AMC を蛍光(励起 380nm/蛍光 460nm)で反応開始から 10 分おきに 4 時間測定することで酵素活性を確認した[4]。

### hK11 自己分解の検証

活性型 hK11 による自己分解の検証には recombinant human kallikrein11 200ng を用いた。hK11 と thermolysin(40:1)をプレインキュベーション溶液(50mM Tris(pH6.8), 10mM  $\text{CaCl}_2$ , 1M NaCl)で  $37^\circ\text{C}$  15 分または 30 分反応させて hK11 の活性化を行った後、10mM EDTA で thermolysin の反応を止め、50 mM Tris(pH8.3), 10mM EDTA の反応液にプレインキュベーション混合液を混和し、1 時間、 $37^\circ\text{C}$  で反応を行った。hK11 の阻害剤にはセリンプロテアーゼ阻害剤である phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)を 100%エタノールに溶解したものを、プレインキュベーションあるいはその後のインキュベーションで 20mM の濃度で用いた。hK11 の反応の停止は、還元剤である 2-メルカプトエタノール(最終濃度  $50 \mu\text{g/ml}$ )を含むサンプルバッファーを添加することによって行った。

## Western blot

総タンパク濃度を一定に調整したサンプルを 12%の SDS-PAGE を用いて分離し、PVDF メンブレン(Millipore)に転写した。非特異的反応を抑えるため、5% スキムミルク、1% BSA 溶液を用いて 1 時間室温でブロッキングを行った。メンブレンは mouse monoclonal anti-human kallikrein 11 antibody(1:500; clone 189308; R&D systems)を用いて室温 2 時間で 1 次抗体処理を行った後、2 次抗体として peroxidase-labeled rabbit anti-mouse antibody(1:3000; Zymed Laboratories)を用い、室温 1 時間で処理を行った。hK11 のバンドは ECL chemiluminescent reagent(Amersham Corp.)で可視化を行った。

## 潜在型 TGF- $\beta$ の切断

活性型 hK11 による潜在型(latent)TGF- $\beta$  の切断の確認には recombinant human kallikrein11 と recombinant human latent TGF- $\beta$  を用いた。hK11 と thermolysin(40:1)をプレインキュベーション溶液(50mM Tris(pH6.8), 10mM CaCl<sub>2</sub>, 1M NaCl)で 37°C 15 分反応させて hK11 の活性化を行った後、10mM EDTA で thermolysin の反応を止めた。50 mM Tris(pH8.3), 10mM EDTA の反応液にプレインキュベーション混合液と recombinant latent TGF- $\beta$  を混和し、4 時間、37°C で反応を行った。潜在型 TGF- $\beta$  は 50ng, hK11 は 100ng, 200ng, 500ng を使用した。反応の停止は、還元剤を含むサンプルバッファーを添加することによって行い、15%の SDS-PAGE を用いて分離し、Western blotting を用いて LAP の検出を行った。一晩 4°C で polyclonal anti-human LAP antibody(1:500; R&D)を用いて 1 次抗体処理を行った後、2 次抗体として peroxidase-labeled rabbit anti-goat antibody(1:3000; Zymed Laboratories)を用いて室温 1 時間で処理を行い、ECL chemiluminescent reagent でバンドを検出した。

## 乳がん細胞株における hK11 の発現

通常培地で培養した乳がん細胞株を PBS で洗った後、無血清培地に交換し、そ

の 24 時間後に細胞の上清を回収した。細胞は PBS で 3 回洗浄した後、lysis buffer(20mM Tris-HCl(pH7.6), 150mM NaCl, Complete protease inhibitor cocktail tablet(1tablet for 25ml lysis buffer; Roche), 1mM Sodium Orthovanadate, 10mM NaF, 1% NP-40, 10% glycerol)に溶解してライセートの回収を行った。その後 30 分間 4°Cで静置後、14000×g 30 分遠心し、タンパク濃度の測定を行った。上清は 10%トリクロロ酢酸を加え、1 時間氷上で静置した後、15000×g 30 分遠心し、エタノール・ジエチルエーテル溶液(1:1)で 2 回洗浄した後 PBS に溶解してタンパク濃度の測定を行った。Bio-Rad protein assay dye reagents を用いて総タンパク濃度を一定にしたサンプルを 12%の SDS-PAGE を用いて分離し、Western blot を用いて hK11 の検出を行った。

#### ステロイドホルモン刺激

通常培地で培養したセミコンフルエントの乳がん細胞株 2 株(MCF-7, T47D)を PBS で洗浄した後、フェノールレッドによるエストロゲン作用を除外するため無血清・フェノールレッド無添加の培地に交換した。培地交換の 24 時間後、100% エタノールに溶解したエストラジオール(SIGMA)あるいはジヒドロテストステロン(SIGMA)を  $1 \times 10^{-8}$  M で培地に添加して刺激を行い、24 時間後に RNA の回収を行った。コントロールとして 100% エタノールのみを添加したもの、無血清・フェノールレッド添加培地をしたものを用いた。

#### IGFBPs の切断

活性型 hK11 による IGFBPs の切断の確認には recombinant human kallikrein 11 と recombinant human IGFBPs を用いた。hK11 と thermolysin(40:1)をプレインキュベーション溶液(50mM Tris(pH6.8), 10mM CaCl<sub>2</sub>, 1M NaCl)で 37°C 15 分反応させて hK11 の活性化を行った後、10mM EDTA で thermolysin の反応を止めた。50 mM Tris(pH7.5), 10mM EDTA の反応液にプレインキュベーション混合液と recombinant IGFBPs を混和し、4~24 時間、37°C で反応を行った。hK11 と IGFBP-3

の重量比は基本的に 20:1 に固定し、IGFBP-1~6 の 6 種類を全てを用いた実験では IGFBPs 50ng に対し、hK11 100ng~1000ng を使用した。また、IGFBPs を切断するポジティブコントロールとしては MMP-7 を用いた[28]。MMP-7 は使用するバッファー(10mM HEPES(pH 7.4), 5mM CaCl<sub>2</sub>, 150mM NaCl)が hK11 と異なるため、MMP-7 のバッファーのみのコントロールもおいた。反応の停止は、還元剤を含むサンプルバッファーを添加することによって行った。IGFBPs, hK11 の反応液は 15%の SDS-PAGE を用いて分離し、Western blot を用いて IGFBPs の検出を行った。一晩 4℃で 1 次抗体処理を行った後、2 次抗体として室温 1 時間で処理を行った。1 次抗体はそれぞれ mouse monoclonal anti-human IGFBP-1 antibody(clone 33627.11; R&D Systems)、goat polyclonal anti-human IGFBP-2 antibody(C-18; Santa Cruz)、goat polyclonal anti-human IGFBP-3 antibody(C-19; Santa Cruz Biotechnology)、mouse monoclonal anti-human IGFBP-4 antibody(clone 82334.11; R&D Systems)、goat polyclonal anti-human IGFBP-5 antibody(c-18; R&D Systems)、mouse monoclonal anti-human IGFBP-6 antibody(clone 110211; R&D Systems)を 1:500 で用いた。2 次抗体は IGFBP-1/4/6 には peroxidase-labeled rabbit anti-mouse antibody(1:6000)を、IGFBP-2/3/5 には peroxidase-labeled rabbit anti-goat antibody(1:6000; Zymed Laboratories)を用いた。IGFBPs のバンドは Lumi-Light<sup>plus</sup> Western Blotting Substrate(Roche)で可視化を行った。

### 統計学的解析

ヒト乳がん手術材料における *KLK11* の発現結果と腫瘍部/非腫瘍部の発現の比較には Paired *t* test を、*KLK11* の発現結果と臨床病理像の相関検討には Mann-Whitney *U* test を用いた。それぞれ有意差は  $P < 0.05$  で定義した。

## IV. 実験結果

### 細胞株における *KLK11* mRNA の発現

ヒトがん細胞株における *KLK11* mRNA の発現パターンを調べるため、ヒト乳がん細胞株 4 種、ヒト胃がん細胞株 8 種、ヒト前立腺がん細胞株 3 種、ヒト膵臓がん細胞株 3 種、ヒト肺がん細胞株 1 種、ヒト大腸がん細胞株 1 種、ヒト線維芽細胞株 1 種を対象として RNA を抽出し、cDNA を作製して定量 PCR を行った。その結果、乳がん細胞株の 2/4、胃がん細胞株の 4/8、前立腺がん細胞株の 1/3、膵がん細胞株の 2/3、肺がん細胞株の 0/1、大腸がん細胞株の 1/1、線維芽細胞株の 0/1 で *KLK11* の発現が認められた(Fig.1)。乳がんではエストロゲンレセプター陽性の細胞株 2 株に *KLK11* の発現が見られ、エストロゲンレセプター陰性の 2 株には発現が認められなかった。また、胃がんにおいても、高分化型胃がん由来細胞株と低分化型胃がん由来細胞株で *KLK11* の発現に差異が認められた(Fig.2A)。

### 胃がんにおける検討

胃がん細胞株のみに着目してみると、高分化型胃がん由来細胞株 2 株(MKN-28, HSC-57)には *KLK11* が発現しておらず、低分化型胃がん由来細胞株 6 株中 4 株(HSC-43, HSC-58, HSC-59, HSC-60)には *KLK11* が発現していた(Fig.2A)。 *KLK11* の発現していた低分化型の 4 株はスキルス胃がん由来細胞株であり、低分化で高度な線維化を伴う予後の悪い胃がんの発生・進展に *KLK11* の関与が示唆された。そこで *KLK11* の発現と高分化/低分化の組織型が相関するか確認すべく、これらの細胞株を用いて SCID マウス胃壁に同所移植することで担がんマウスモデルを構築した。そして移植胃がんにおける線維化を組織に含まれる間質量で評価した。その結果、マウスモデルで線維化を伴う腫瘍を認めたのは HSC-44PE と HSC-58 の 2 株による腫瘍だけであり、残りの 5 株の腫瘍は間質の少ない充実性であった。HSC-44PE はスキルス胃がん由来低分化型がんであり、そのマウス

モデルの腫瘍では線維化を認めたにも関わらず *KLK11* の発現が見られなかったことから(Fig.2B)、*KLK11* の発現量と同所移植マウスモデルにおける線維化および細胞株の由来するがんの組織型は相関しないことが示された(Table 1)。

### hK11 の基質の探索

ヒトがんが発現している hK11 の生理学的意義を解明すべく、基質の探索を試みた。まずはリコンビナントの hK11 の活性を確認するために既に hK11 の基質として報告のあるペプチド、Z-Phe-Arg-MCA を基質に用いて測定を行った。その結果、以前の報告と同様に hK11 は Z-Phe-Arg-MCA を切断し、Bz-Arg-MCA は切断せず、リコンビナント hK11 は酵素活性を持っていることが確認された(Fig.3A)[4]。

次に、hK11 が自己分解を行うかどうかを hK11 の活性化に用いた thermolysin 及びセリンプロテアーゼ阻害剤 PMSF を用いて検討した。Thermolysin により活性化された hK11 のみが自己分解を起こし(左から lane3 vs lane7)、その反応はプレインキュベーションの時間に依存(lane1 vs lane3)し、PMSF によって阻害されること(lane1 vs lane 2; lane 3 vs lane 4)を確認した。また、PMSF をプレインキュベーションから添加するサンプルを作り、hK11 が活性化されると同時に自己分解を始めていることを示した(lane2 vs lane5; lane4 vs lane6)(Fig.3B)。

次に、胃がんの増殖ならびに間質の線維化に関わる因子である TGF- $\beta$  の活性化に hK11 が寄与するかどうか調べた。潜在型 TGF- $\beta$  に含まれる LAP の hK11 による切断を検討したところ、LAP のフラグメントは検出されず、元の LAP のバンドの減少も見られなかったことから、hK11 は LAP を直接基質として分解せず、TGF- $\beta$  を活性化しないことが示された。(Fig.3C)。

### 乳がんにおける hK11 の発現とエストロゲンとの関連

細胞株における mRNA の検討により ER の有無と *KLK11* の発現に関連性が示唆されたため(Fig.1)、乳がん細胞株 3 株(ER(+)) MCF-7, T47D; ER(-) MDA-MB468) を用いてタンパクレベルでの hK11 の発現を確認したところ、ER 陽性の T47D

の上清中にのみ hK11 が分泌されていることが推測された(Fig.4A)。次に、Fig.1 で *KLK11* の発現の認められた MCF-7、T47D を用いてステロイドホルモンによる刺激を行い、*KLK11* の発現変化の確認を行ったところ、エストラジオールによって *KLK11* の発現量が増加し、ジヒドロテストステロンでは *KLK11* の発現に変化が認められなかった(Fig.4B)。

### IGFBPs を用いた hK11 基質の探索

乳がんの増殖・浸潤・転移に増殖因子 IGFs が関与していることは数多く報告されている[33]。hK11 が IGFBPs の分解と IGFs の活性化を引き起こす可能性を検討するため、IGFBP-1~6 の全ての IGFBPs を用いて hK11 の基質になるか検討した。その結果、IGFBP-1, -2, -3, -5 に関してはそれぞれのタンパクの分解断片が検出され、hK11 による IGFBPs の切断が確認された。また、IGFBP-4, -6 に関しては分解断片は検出されなかったが、濃度依存的ではないが元の IGFBPs のバンドの減少が僅かに認められた(Fig.5)。このことにより、hK11 は IGFBP-1~6 全てを基質とする IGFBP プロテアーゼとして働く可能性が示唆された。

### hK11 による IGFBP-3 の切断の確認

IGFBPs 6 種の検討によりフラグメントが見えた IGFBP-1, -2, -3, -5 の中で、今回の研究では、血中を最も多く流れていて血中 IGF-I, IGF-II の 75%以上に結合していると言われており、IGFBPs の中で最も重要な働きを果たしていると考えられる IGFBP-3 に焦点を絞り[26]、再検討を行った。その結果、hK11 は IGFBP-3 を分解し、その反応はセリンプロテアーゼ阻害剤である PMSF によって阻害されることが確認された(Fig.6)。

次に、IGFBP-3 と hK11 の反応に関する経時変化をさらに検討した。24 時間インキュベートしても IGFBP-3 のみでは自然分解せず、EDTA 処理によって阻害された thermolysin によっては IGFBP-3 が分解されないことを確認した上で(Fig.7A)、thermolysin によって活性化された hK11 を用いて IGFBP-3 の切断反応を 0 時間、6



時間、12時間、24時間で行った。その結果、時間経過と共に IGFBP-3 は hK11 によって切断され、24 時間後には元のバンドがほぼ消え、hK11 によってかなりの割合の IGFBP-3 が分解されたことを確認した(Fig.7B)。

#### ヒト乳がん手術材料による検討

ヒト乳がん 27 症例の腫瘍部および非腫瘍部の mRNA を用いて *KLK11* の発現を検討した。27 症例中 RNA の抽出できた腫瘍部 26 例、非腫瘍部 26 例(腫瘍部・非腫瘍部共に 1 サンプルずつ欠損)について *KLK11* および *GAPDH* の発現を定量 PCR により調べた。その発現結果と臨床病理像を比較検討した。各 26 例のサンプルの合計による腫瘍部と非腫瘍部の *KLK11* の発現の比較では非腫瘍部がわずかに *KLK11* の発現が高かったものの、有意差は認められなかった(Fig.8A)。また、腫瘍部の *KLK11* 発現データを用いて、乳がんの予後因子として知られる ER 陰性/陽性(Fig.8B)、プロゲステロンレセプター(PgR)陽性(Fig.8C)、閉経前後(Fig.8E)、血管浸潤の有無(Fig.8F)、リンパ管浸潤の有無(Fig.8G)と相関を検討したが、これらに関しては *KLK11* の発現との間に有意な相関は認められなかった。一方、組織異型度と *KLK11* の発現の関係を検討すると、腫瘍部において *KLK11* を高発現していた 26 例中 3 例はいずれも組織異型度 GradeI/II 症例に含まれ、*KLK11* は GradeIII に対して GradeI/II に有意に高発現していることが示された (Fig.8D)。

## V. 考察

今回の研究では各種ヒトがん細胞で *KLK11* が発現しており、特に間質形成を伴うスキルス胃がん由来の低分化胃がん細胞株、ならびにエストロゲン依存性の乳がん細胞株に *KLK11* が高発現していることを初めて示した。hK11 は自己分解も起こすが IGFbPs を分解し、がん細胞周囲の IGFs の活性化に参与する可能性があることを示した。IGFBPs が hK11 の基質になることは、がんにおける hK11 の生理学的意義についての初めての報告である。また、組織異型度が Grade I/II のヒト乳がん組織で *KLK11* が高発現していることも初めて示した。

今回の研究の問題点について考察する。まず、マウス同所移植胃がんモデルおよび潜在型 TGF- $\beta$  活性化の点で仮説通りの結果を得られなかったことが挙げられる。マウスモデルに関して言えば、ヒト腫瘍を同所移植した場合腫瘍部内に動員される線維芽細胞はマウスのものであり、ヒトの腫瘍とは異なる組織像を呈することも予測されるため、腫瘍の形態のみで線維化の評価を行うのはやはり難しい。また、潜在型 TGF- $\beta$  活性化についても今回は hK11 が LAP を分解しないことが明らかになったが、プロテアーゼによる TGF- $\beta$  の活性化という観点では、潜在型 TGF- $\beta$  に結合し潜在型 TGF- $\beta$  を細胞外マトリックスに貯蔵する役割を果たす潜在型 TGF- $\beta$  binding protein(LTBP)の分解により活性化が起こることも報告されている。今回は LTBP と hK11 については検討を行わなかったが、hK11 の TGF- $\beta$  活性化機構として、TGF- $\beta$  を活性化するプロテアーゼの活性化に参与するなどの他の多くの分子機構[20]についても検索が必要と考えられる。よって *KLK11* の発現量と胃がんの組織型について検討する余地はまだあると思われる。

次に、IGFBPs と hK11 についてもまだ詳細な検討が必要と考える。特に IGFbP-3 に関してはその hK11 による切断配列の決定を試みることと、他の IGFbPs、特に今回分解を確認した IGFbP-1/-2/-5 の分解をより詳細に調べる必要がある。

ヒト乳がん組織における検討では組織異型度と *KLK11* 発現との間に傾向が見られたものの、他の臨床病理像と発現結果に有意差は認められなかった。今回 *KLK11* が組織異型度の Grade の低い症例で高発現していることが判明したが、Grade の低い症例がホルモン依存性であることが多いことは既知の知見であり、また、今回ホルモンの関わる症例(ER(+), PgR(+), 閉経前)で *KLK11* が比較的高く発現している傾向は見てとれた。この結果は ER(+)乳がん細胞株における *KLK11* の発現や *in vitro* でのエストロゲンによる *KLK11* の発現亢進の結果と一致する。今回は症例数が少なかったためより確実に有意差等の検討を行うためにはさらに症例数を増やす必要がある。また、今回は 3 年前の症例を用いたが、サンプルを用いた患者の予後データが出揃えば *KLK11* 発現と予後との相関を検討する必要があると考える。

また、*KLK11* の knockout マウスあるいは transgenic マウス作製により胃や乳腺の発達への hK11 の関与を検討するのも興味深いと思われた。今後、より分子生物学的手法を用い、hK11 の働きに関して詳細な調査が必要となると考える。

IGFs は細胞の増殖、アポトーシスの阻害に働くことがさまざまな臓器で明らかになってきた。乳がんにおいては IGF-I は間質細胞が、IGF-II は間質細胞及び上皮細胞が分泌する。正常と比較して乳がん患者の血中では IGF-I が増加し、腫瘍部の間質では IGF-II の発現量が増加する。また、IGFs のシグナルを細胞内に伝える IGF-IR の発現は乳がんで増加する。IGFs を阻害する IGFbps に関しては 6 種の IGFbps 中 5 種(IGFBP-1~5)の発現がヒト乳がん組織で確認されている。がん患者の予後と IGFs の関連性については、乳がん患者の血清では IGF-I の増加と IGFBP-3 の減少がみられ[34]、閉経前の女性で IGF-I の増加及び IGFBP-3 の減少が見られると乳がんの発症リスクが高くなるという報告がある[35]。これらの事実から、今回報告した hK11 による IGFBP-3 の分解及びそれに従って起こるであろう IGF シグナルの細胞への伝達が乳がんにおいて非常に重要な役割を果たすことが示唆される。

乳がんの発生・進展を考える上で重要な因子となるエストロゲンは、それ自

体が乳がんの増殖に寄与し、抗エストロゲン剤は治療に用いられることが知られているが[21]、近年 IGF シグナルとエストロゲンにもクロストークが存在することが明らかになっている。エストロゲンは ER を介して IGF-I, IGF-II, IGF-IR の発現を上昇させ、IGFBP-3 の発現を減少させ、伝達される IGF シグナルを増加させる。また、IGF-I は ER の発現を亢進する[33, 36, 37]。その上、今回 IGFBP-3 を分解することが新たに判明した hK11 はホルモンによって発現が調節されるエストロゲン依存性プロテアーゼであることより、乳がんにおいてはエストロゲン、IGFs、そして hK11 が相互作用して乳がんの生存に寄与していると考えられた。今回明らかにしたエストロゲン依存性プロテアーゼがエストロゲンにより発現が調節される増殖因子調節タンパク(IGF-IGFBP システム)の分解によりシグナルを制御する機構は今までに知られていない事象であり、大変興味深い (Fig.9)。

今後、このホルモン依存性プロテアーゼ hK11 による乳がん細胞における IGFs との関わりが乳がんのメカニズムの一端を明らかにし、将来的に新しい治療につながることを期待される。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、日頃より有益な助言をいただきました国立がんセンター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理部石井源一郎先生、藤井誠志先生に厚く御礼申し上げます。

乳がん手術サンプルの提供を賜りました同臨床腫瘍病理部三階貴史先生、技術面でのサポートをしてくださった奥村千枝先生、奥原葉子先生、奥本麻衣先生、橋本弘子先生に心より感謝いたします。

また、様々な場面で助言をいただきました臨床腫瘍病理部の方々に深く感謝いたします。

**Table 1**

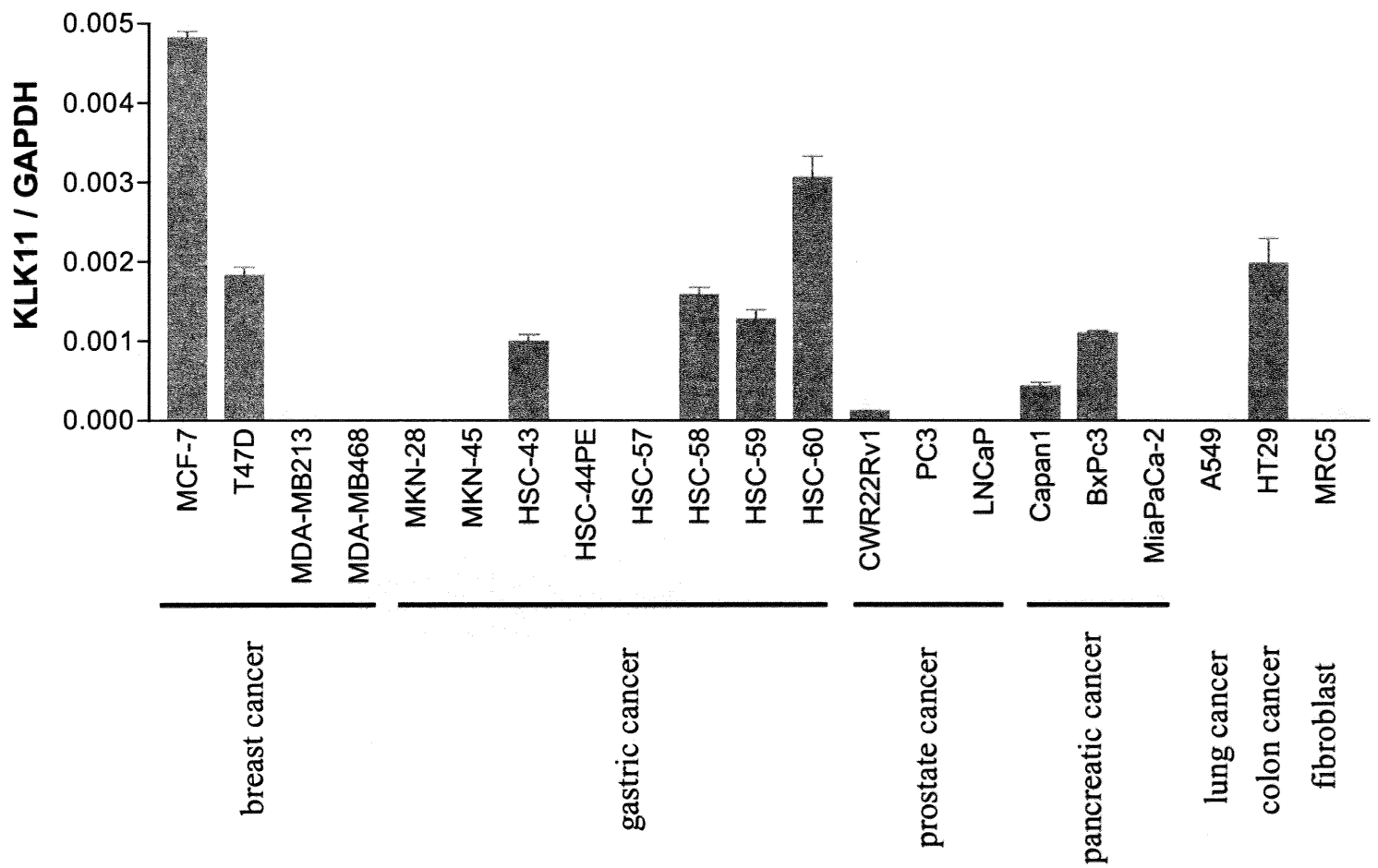
ヒト胃がん同所移植マウスモデルにおけるKLK11発現とがん  
間質線維化程度

	histology	<i>KLK11</i> expression	fibrosis
MKN-28	W/D	-	-
HSC-57	W/D	-	-
MKN-45	P/D	-	-
HSC-43	sci	+	-
HSC-44PE	sci	-	+
HSC-58	sci	+	+
HSC-59	sci	+	-
HSC-60	sci	+	-

W/D: well differentiated type

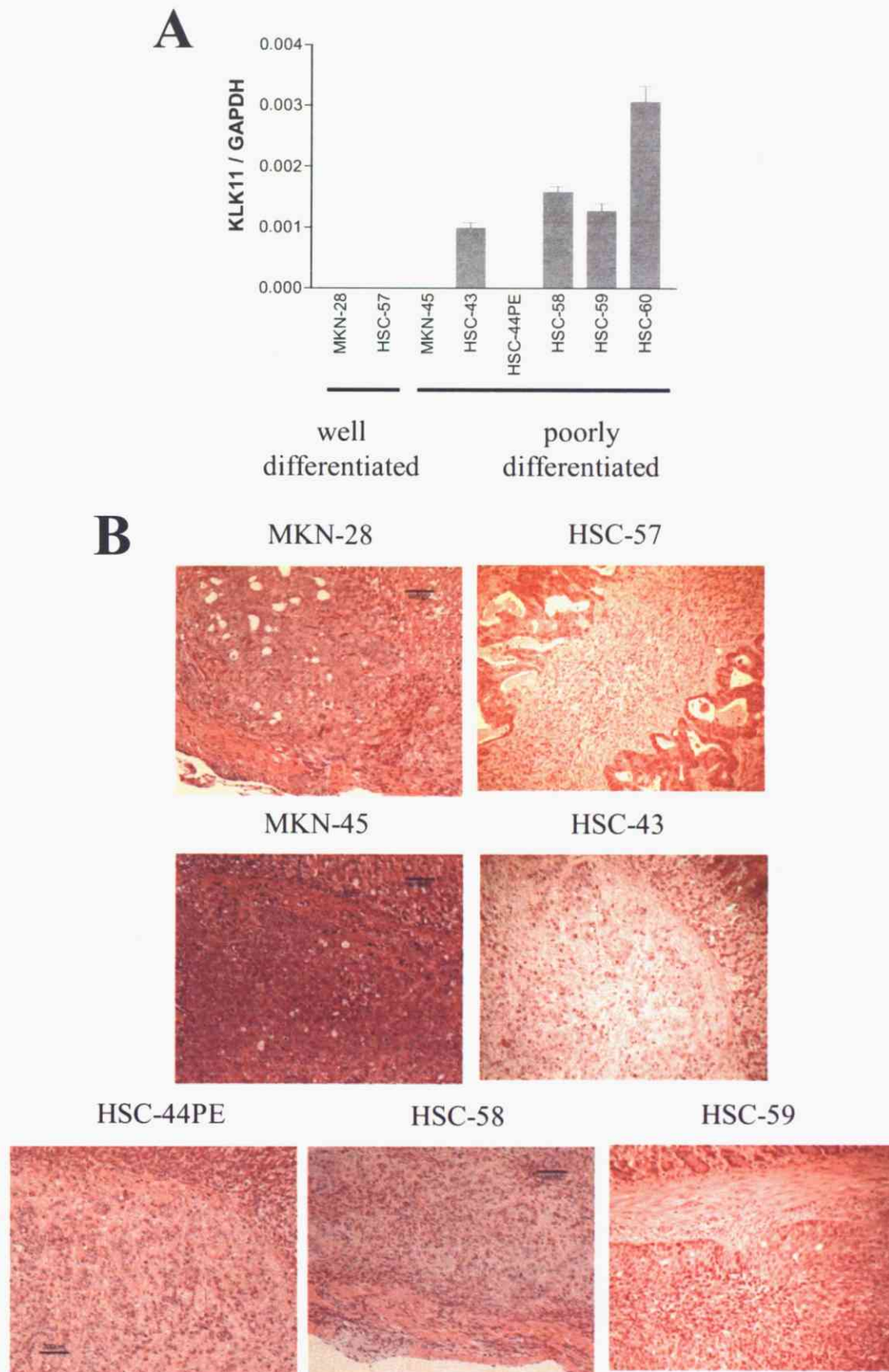
P/D : poorly differentiated type

sci : scirrhous type



**Fig.1** ヒト細胞株21株における*KLK11* mRNAの発現

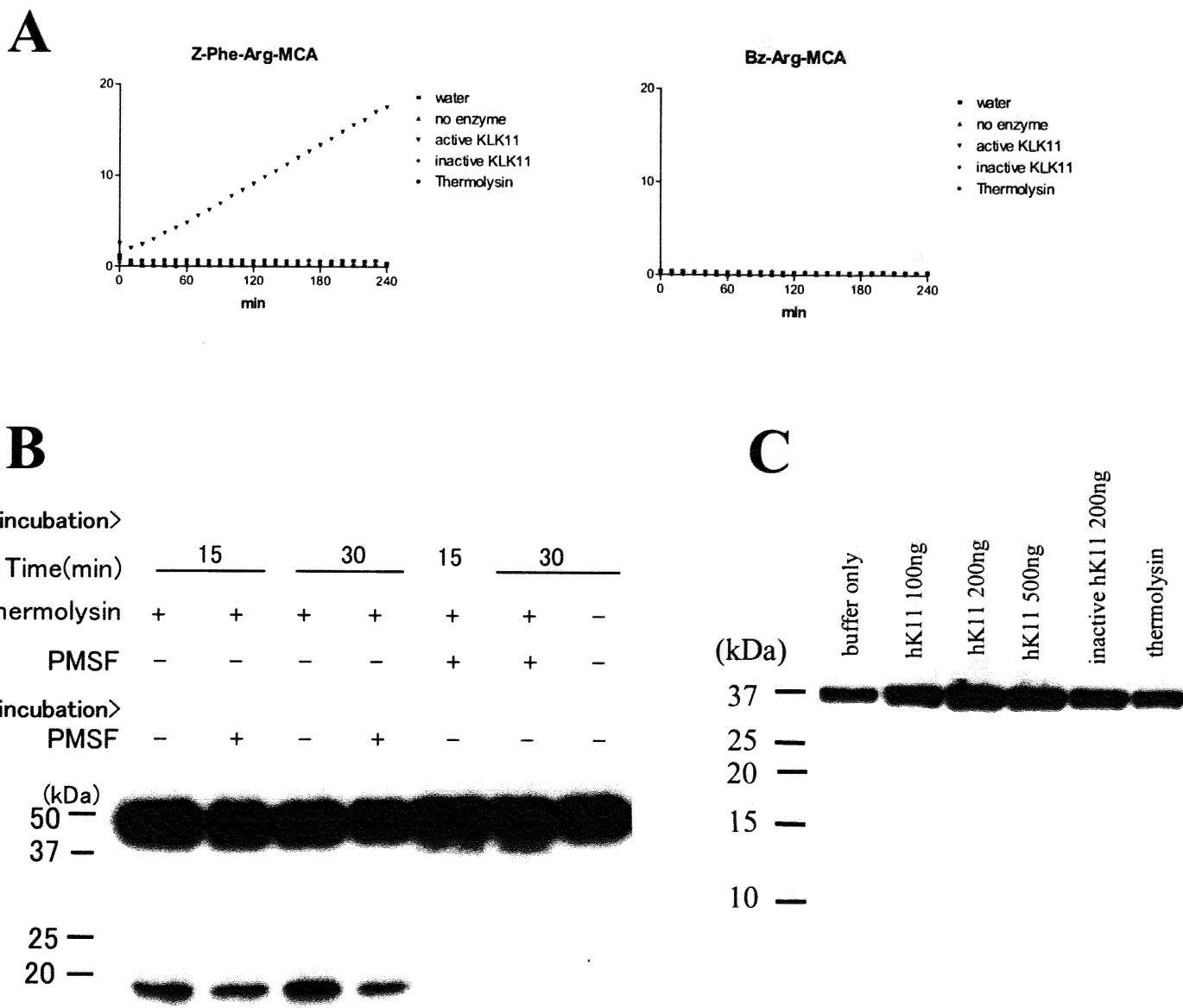
定量PCRによりヒト細胞株21株を用いて*KLK11*の発現を検量線で定量化した。その際、ハウスキーピング遺伝子*GAPDH*の発現量により補正を行った。



**Fig.2** 胃がんと*KLK11*の発現に関する検討

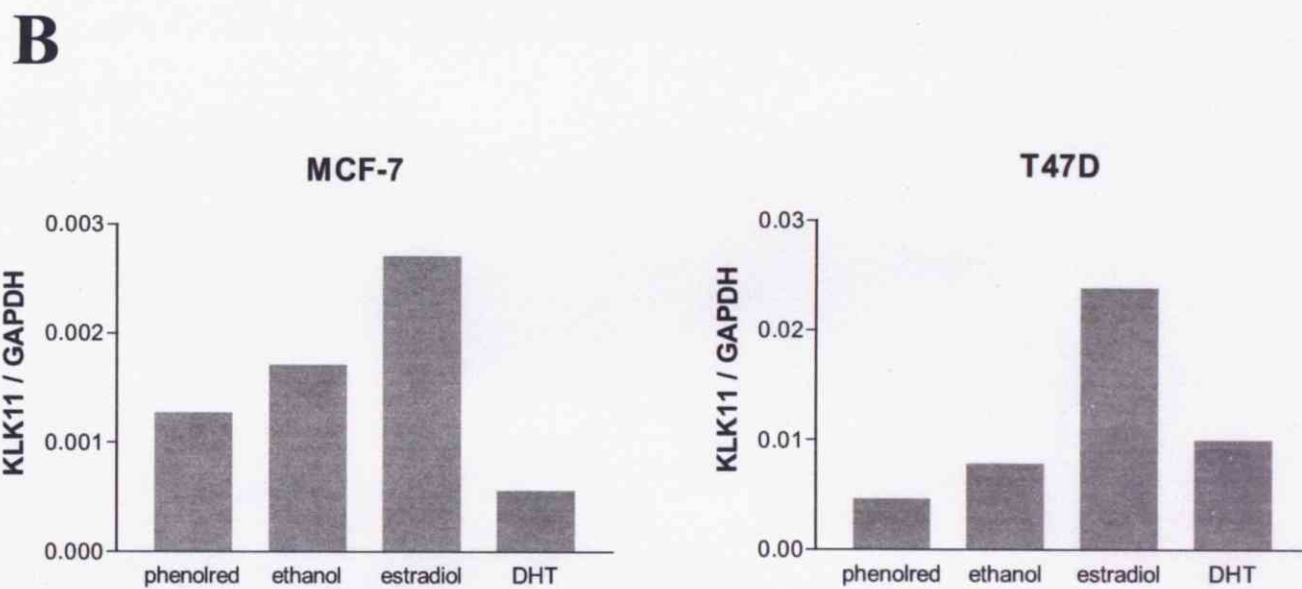
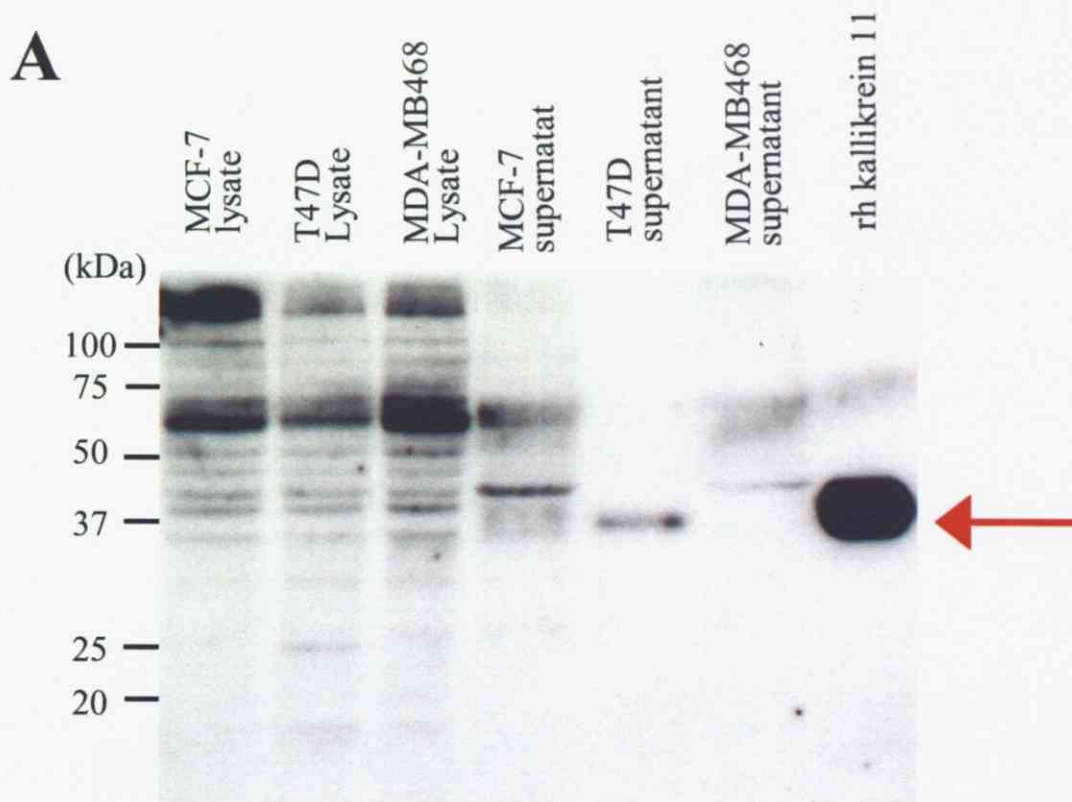
(A)高分化型胃がん細胞株2株および低分化型胃がん細胞株6株における定量PCRによる*KLK11*の発現。低分化型胃がん細胞株6株中MKN-45を除く5株葉スキルス胃がん由来細胞株。(B)SCIDマウスの胃壁に $1 \times 10^6/50 \mu\text{l}$ で胃がん細胞株8種を同所移植し、モデルを構築した。(HSC-60では同所移植で腫瘍を形成せず。)その後、腫瘍組織中における組織線維化間質の有無を顕微鏡的に評価をした。





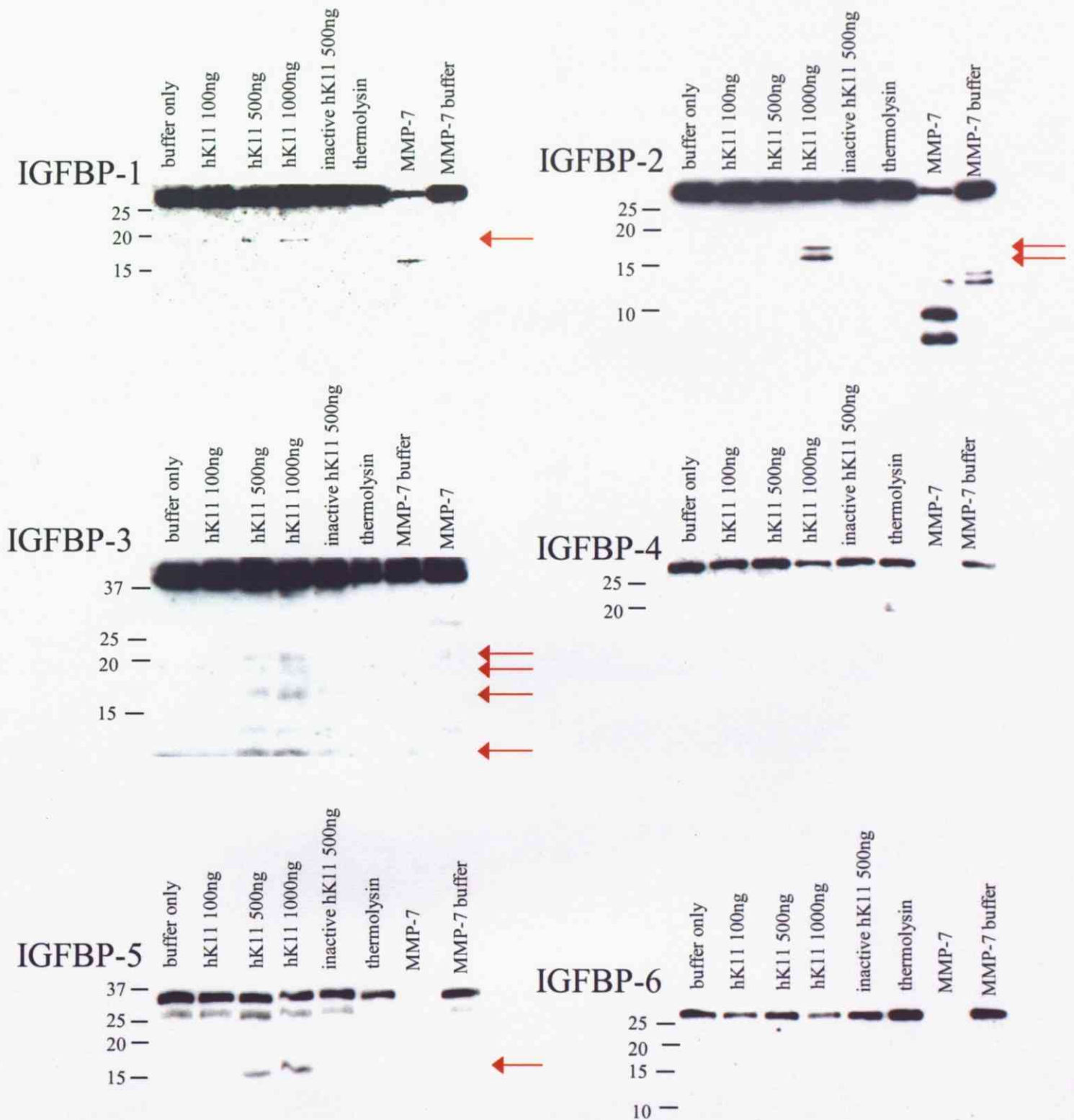
**Fig.3** hK11の基質候補の探索

(A) (左)hK11の既知の基質ペプチド、Z-Phe-Arg-MCAを用いて蛍光で遊離AMCを反応開始から10分間隔で240分間測定しhK11の酵素活性を確認した。(右)ネガティブコントロールにはhK11が切断しないことが報告されているBz-Arg-MCAを用いた。■が水、▲がペプチド+反応バッファー、▼がペプチド+活性化型hK11、◆がペプチド+不活性化型hK11(thermolysinで活性化せず)、●がペプチド+thermolysin。縦軸は蛍光強度。(B)hK11の自己分解をhK11抗体を用いて検証。37kDa付近のバンドが分解前のhK11、20kDa付近のバンドが分解後と予測されるhK11。プレインキュベーションに関しては、時間を15分(左からlane1, 2, 5)、30分(lane3, 4, 6, 7)、hK11の活性化に用いるthermolysinのあり(lane1~6)、なし(lane7)、セリンプロテアーゼ阻害剤PMSFのあり(lane1~4, 7)、なし(lane5, 6)、で条件を分けた。プレインキュベーション後にEDTA処理によりthermolysinを不活化した後の1時間のインキュベーションにおけるPMSFもあり(lane2, 4)なし(1, 3, 5~7)とした。(C) hK11のTGF- $\beta$ 活性化能についての検討。潜在型TGF- $\beta$ とhK11を反応させることで潜在型TGF- $\beta$ に含まれるLAPがhK11によって分解され、TGF- $\beta$ の活性化に結びつくか検討した。37kDa付近のバンドは全長のLAP。TGF- $\beta$  50ngに対しhK11は100ng, 200ng, 500ngを使用、活性化していないhk11 200ngもネガティブコントロールに用いた。



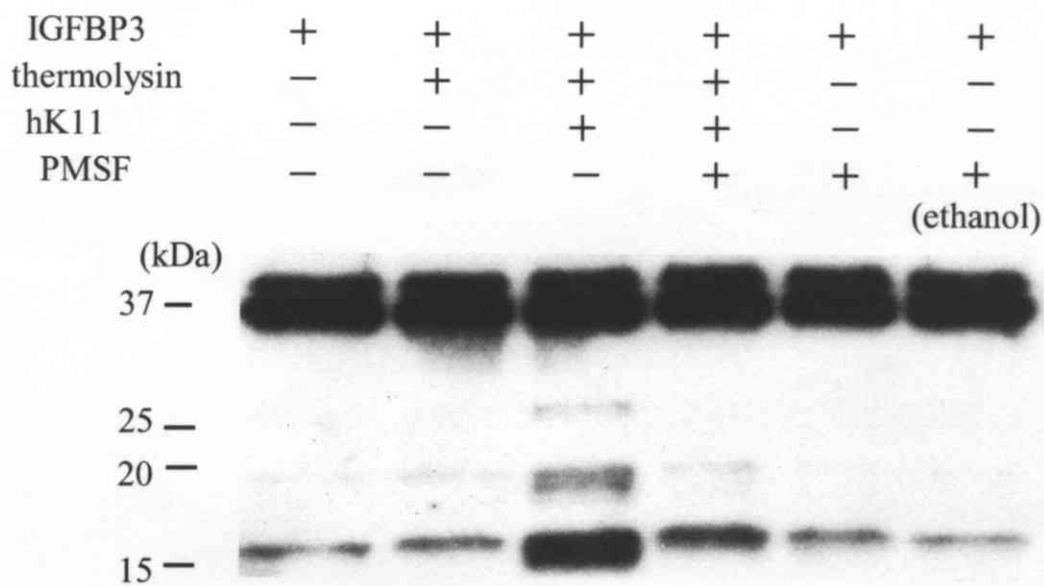
**Fig.4** 乳がんにおけるhK11の発現とエストロゲン刺激下でのKLK11の発現変化

(A)乳がん細胞株3種を用いてライセート及び上清中のhK11をhK11抗体を用いWestern blotにより検出した。37kDa付近の矢印の部分hK11と思われるバンド。(B)KLK11の発現の見られたER陽性のMCF-7とT47Dの乳がん細胞株2株に対してエストラジオールとジヒドロテストステロンをそれぞれ $1 \times 10^{-8}$ Mで用いてステロイドホルモン刺激を行い、24時間後に細胞のmRNAを回収し、定量を行った。ネガティブコントロールには100%エタノールを用いた。刺激実験はフェノールレッド無添加培地で行ったため、フェノールレッド添加の通常培養下の細胞もコントロールとして提示した。



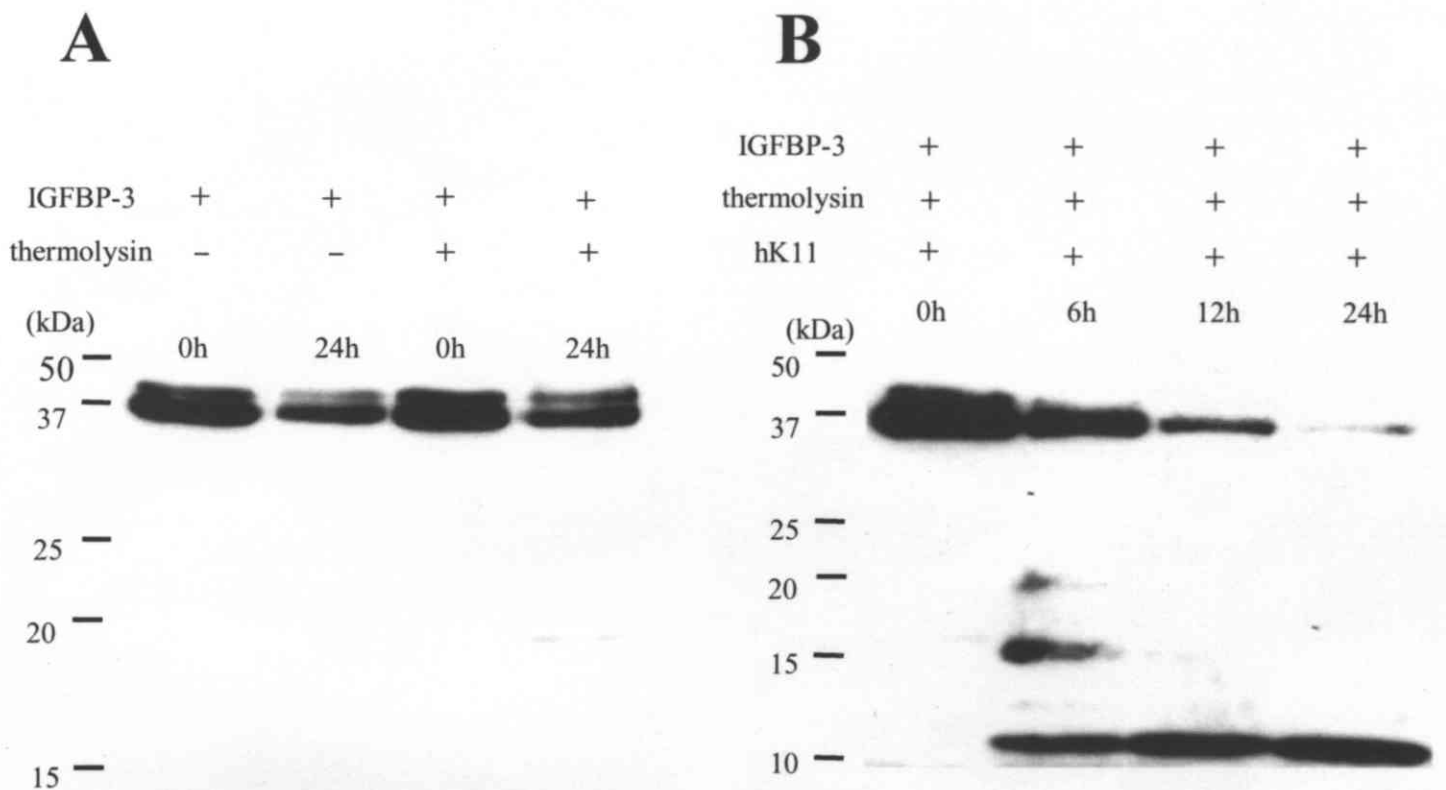
**Fig.5** 6種のIGFBPsに対するhK11の分解能の検討

6種類のIGFBPs(IGFBP-1~6)に対し、hK11が分解能を持つ可能性を検討した。hK11は活性型のものを、100ng、500ng、1000ngで使い、コントロールとして活性化を行っていないhK11 500ngも用いた。IGFBPsを分解するポジティブコントロールには6種全てを分解することが知られているMMP-7を使用した。MMP-7はhK11と反応バッファーの条件が異なるためMMP-7に対するネガティブコントロールもおいた。それぞれのIGFBPに対する抗体を用いて分解断片を検出した。矢印は検出されたIGFBPsの分解断片を示す。



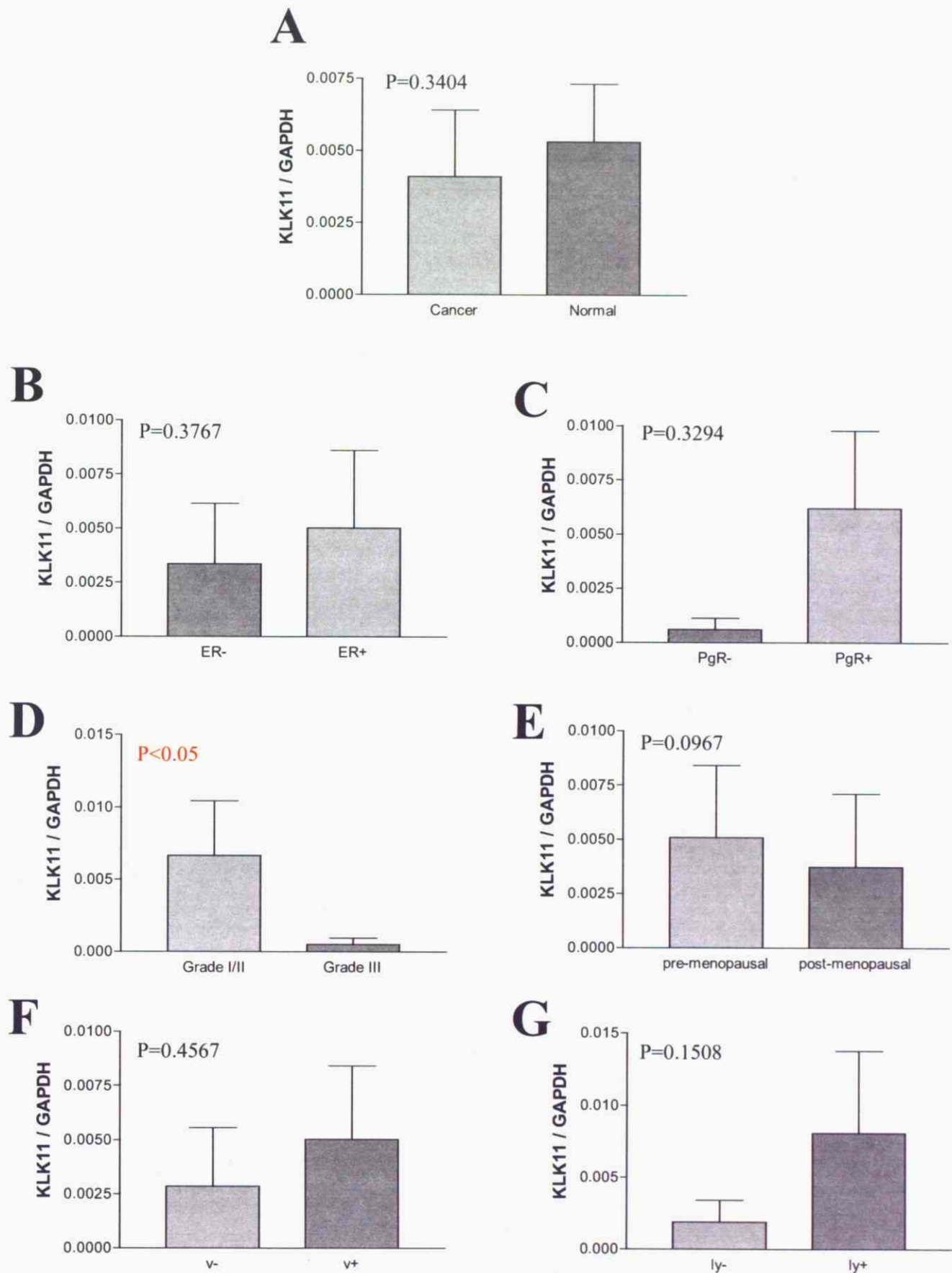
**Fig.6** hK11のIGFBP-3分解確認

hK11とIGFBP-3を37°C4時間反応させ、Western blotでIGFBP-3抗体を用いて分解断片を検出。hK11の阻害剤として100%エタノールに溶解したPMSFを使用。IGFBP-3に対するPMSF及び100%エタノールの影響もコントロールとして確認した。



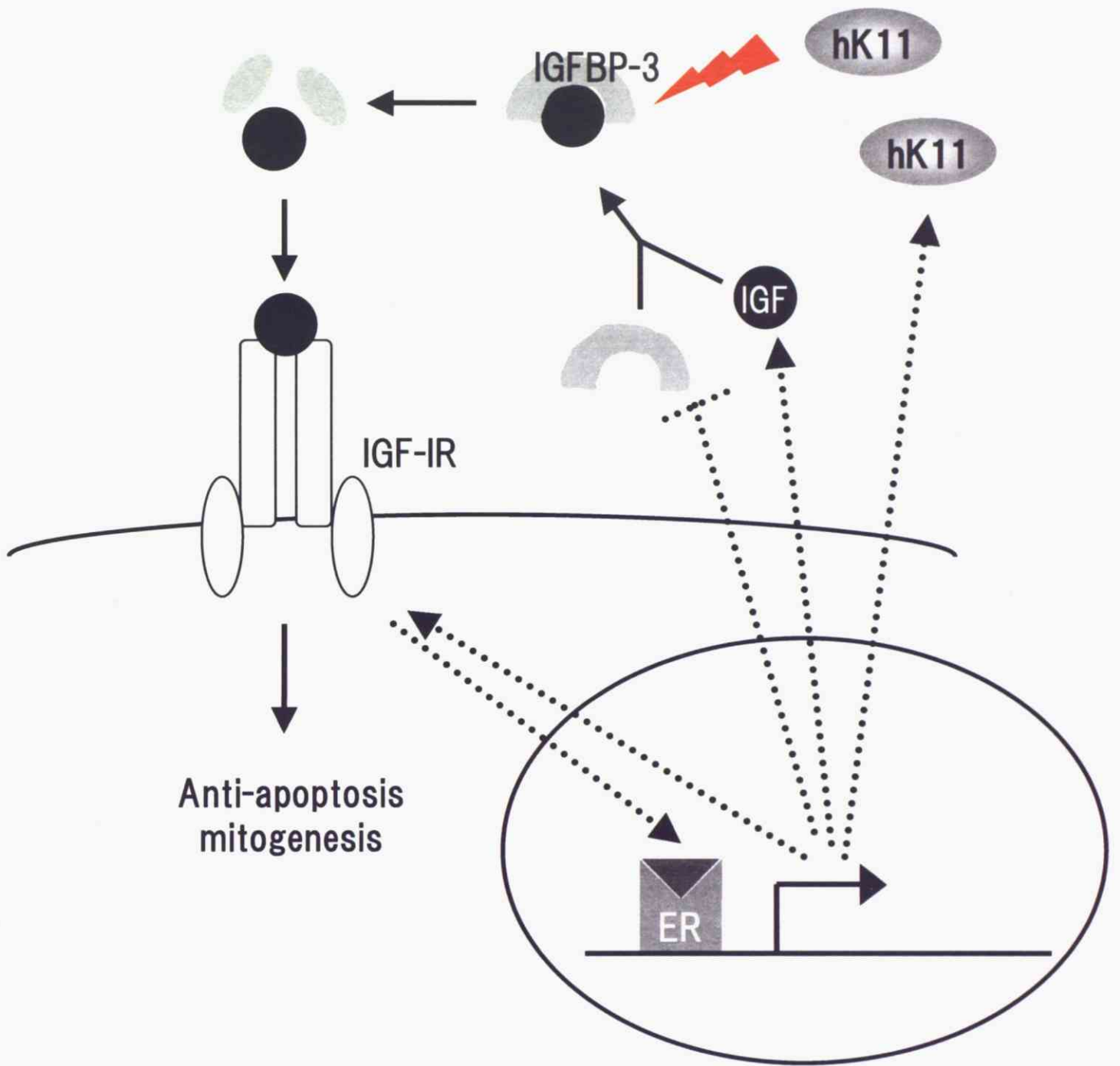
**Fig.7** hK11によるIGFBP-3の経時的分解

(A)IGFBP-3のみ、あるいはIGFBP-3とthermolysinでは24時間インキュベートしてもIGFBP-3が分解されないことをwestern blotにより確認。(B)hK11とIGFBP-3を37℃で0時間、6時間、12時間、24時間インキュベートし、経過時間とIGFBP-3分解度の検討。37kDa付近のバンドが元のIGFBP-3であり、20kDa、15kDa、10kDa付近に見えるのが分解された3本の分解断片。



**Fig.8** ヒト乳がん組織における*KLK11* mRNA発現と予後因子との関連性の検討

ヒト乳がん手術材料27症例(サンプル16の腫瘍部、サンプル30の非腫瘍部は欠損のためデータは26症例ずつ)の腫瘍部と非腫瘍部における*KLK11* mRNAの発現を定量PCRで測定。(A)腫瘍部・非腫瘍部26例の平均の比較。その後、腫瘍部の*KLK11*発現量を用いて(B)ER陰性/陽性、(C)PgR陰性/陽性、(D)組織異型度、(E)閉経前後、(F)血管浸潤有無、(G)リンパ管浸潤有無、とそれぞれ相関関係を調べた。(A)はPaired *t* testで、(B)~(G)はMann-Whitney *U* testで検定を行った。



**Fig.9** 乳がんにおいて予想されるIGF・エストロゲン・hK11のクロストーク概略図

## 参考文献

1. Puente, X.S., et al., *Human and mouse proteases: a comparative genomic approach*. Nat Rev Genet, 2003. 4(7): p. 544-58.
2. Borgono, C.A., I.P. Michael, and E.P. Diamandis, *Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer*. Mol Cancer Res, 2004. 2(5): p. 257-80.
3. Yoshida, S., et al., *cDNA cloning and expression of a novel serine protease, TLSP*. Biochim Biophys Acta, 1998. 1399(2-3): p. 225-8.
4. Mitsui, S., et al., *A novel isoform of a kallikrein-like protease, TLSP/hippostasin, (PRSS20), is expressed in the human brain and prostate*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 272(1): p. 205-11.
5. Nakamura, T., et al., *Alternative splicing isoforms of hippostasin (PRSS20/KLK11) in prostate cancer cell lines*. Prostate, 2001. 49(1): p. 72-8.
6. Nakamura, T., et al., *Molecular cloning and expression of a variant form of hippostasin/KLK11 in prostate*. Prostate, 2003. 54(4): p. 299-305.
7. Yousef, G.M., et al., *Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 276(1): p. 125-33.
8. Komatsu, N., et al., *Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases*. Br J Dermatol, 2005. 153(2): p. 274-81.
9. Shigemasa, K., et al., *Human kallikrein gene 11 (KLK11) mRNA overexpression is associated with poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2004. 10(8): p. 2766-70.
10. Bhattacharjee, A., et al., *Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(24): p. 13790-5.
11. Diamandis, E.P., et al., *Human kallikrein 11: a new biomarker of prostate and ovarian carcinoma*. Cancer Res, 2002. 62(1): p. 295-300.
12. Borgono, C.A., et al., *Favorable prognostic value of tissue human kallikrein 11 (hK11) in patients with ovarian carcinoma*. Int J Cancer, 2003. 106(4): p. 605-10.



13. Diamandis, E.P., et al., *Human kallikrein 11: an indicator of favorable prognosis in ovarian cancer patients*. Clin Biochem, 2004. **37**(9): p. 823-9.
14. Nakamura, T., et al., *The usefulness of serum human kallikrein 11 for discriminating between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia*. Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6543-6.
15. Yousef, G.M., et al., *Parallel overexpression of seven kallikrein genes in ovarian cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(9): p. 2223-7.
16. Nakamura, T., et al., *Quantitative analysis of hippostasin/KLK11 gene expression in cancerous and noncancerous prostatic tissues*. Urology, 2003. **61**(5): p. 1042-6.
17. Stephan, C., et al., *Three new serum markers for prostate cancer detection within a percent free PSA-based artificial neural network*. Prostate, 2005.
18. Stavropoulou, P., et al., *Expression analysis and prognostic significance of human kallikrein 11 in prostate cancer*. Clin Chim Acta, 2005. **357**(2): p. 190-5.
19. Fukamachi, H. and K. Ito, *Growth regulation of gastric epithelial cells by Runx3*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4330-5.
20. Annes, J.P., J.S. Munger, and D.B. Rifkin, *Making sense of latent TGFbeta activation*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 217-24.
21. Osborne, C.K. and R. Schiff, *Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications*. J Clin Oncol, 2005. **23**(8): p. 1616-22.
22. Yousef, G.M., et al., *Kallikrein gene downregulation in breast cancer*. Br J Cancer, 2004. **90**(1): p. 167-72.
23. Furstenberger, G. and H.J. Senn, *Insulin-like growth factors and cancer*. Lancet Oncol, 2002. **3**(5): p. 298-302.
24. Foulstone, E., et al., *Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer*. J Pathol, 2005. **205**(2): p. 145-53.
25. LeRoith, D. and C.T. Roberts, Jr., *The insulin-like growth factor system and cancer*. Cancer Lett, 2003. **195**(2): p. 127-37.
26. Firth, S.M. and R.C. Baxter, *Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins*.

- Endocr Rev, 2002. **23**(6): p. 824-54.
27. Miyamoto, S., et al., *Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3*. Cancer Res, 2004. **64**(2): p. 665-71.
  28. Nakamura, M., et al., *Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **333**(3): p. 1011-6.
  29. Cohen, P., et al., *Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma*. J Clin Endocrinol Metab, 1992. **75**(4): p. 1046-53.
  30. Rehault, S., et al., *Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) as potential physiological substrates for human kallikreins hK2 and hK3*. Eur J Biochem, 2001. **268**(10): p. 2960-8.
  31. Matsumura, M., et al., *Substrates of the prostate-specific serine protease prostase/KLK4 defined by positional-scanning peptide libraries*. Prostate, 2005. **62**(1): p. 1-13.
  32. Sutkowski, D.M., et al., *Growth regulation of prostatic stromal cells by prostate-specific antigen*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(19): p. 1663-9.
  33. Sachdev, D. and D. Yee, *The IGF system and breast cancer*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(3): p. 197-209.
  34. Bruning, P.F., et al., *Insulin-like growth-factor-binding protein 3 is decreased in early-stage operable pre-menopausal breast cancer*. Int J Cancer, 1995. **62**(3): p. 266-70.
  35. Allen, N.E., et al., *A prospective study of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-3 and breast cancer risk*. Br J Cancer, 2005. **92**(7): p. 1283-7.
  36. Hamelers, I.H. and P.H. Steenbergh, *Interactions between estrogen and insulin-like growth factor signaling pathways in human breast tumor cells*. Endocr Relat Cancer, 2003. **10**(2): p. 331-45.
  37. Yee, D. and A.V. Lee, *Crosstalk between the insulin-like growth factors and estrogens in breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000. **5**(1): p. 107-15.