

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19591849

研究課題名(和文) アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株への IL6 遺伝子導入による細胞形質の変化

研究課題名(英文) Biological change of androgen dependent prostate cancer cell line by interleukin 6 gene transduction

研究代表者

原 勲 (HARA ISAO)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10263378

研究成果の概要(和文)：ヒトのアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP に IL-6 の遺伝子を組み込んだ発現ベクターを lipofectamine 法により導入し、IL-6 強制発現株を選別した(以下 LNCaP/IL-6 と略す)。コントロールとして発現ベクターのみを導入した LNCaP/Co を同時に作成した。IL-6 の濃度測定に関しては培養上清液を用い市販の ELISA kit を用いた。母細胞である LNCaP や LNCaP/Co では培養上清液中に IL6 は検出されなかったのに対し、LNCaP/IL-6 は約 1ng/ml の IL6 を分泌していた。さらに分泌された IL6 の生理活性を Bioassay を用いて確認した。

LNCaP、LNCaP/Co、LNCaP/IL6 との間で *in vitro* での増殖能の違いについて検討したが増殖能に関し細胞間に有意な差は認められなかった。LNCaP/IL6 をヌードマウスに移植したところ母細胞の LNCaP や LNCaP/Co と比較して腫瘍増殖能の亢進を認めた。一方、移植後に精巣摘除を行うとアンドロゲン依存性である LNCaP/Co は一時的な退縮を示した後、増殖能を再度獲得した。これに対し LNCaP/IL-6 は精巣摘除により腫瘍は著明な退縮を示し廃絶された。IL-6 導入によりアンドロゲン非依存性の獲得が予想されたが、実際には LNCaP/IL-6 はアンドロゲン除去に対する感受性が増大していた。*in vitro* においてメEDIUM中のアンドロゲンを除去すると *in vivo* と同様 LNCaP/IL-6 は LNCaP/Co と比較し増殖能は抑制されていた。LNCaP/Co、LNCaP/IL-6 を接種したヌードマウスの血清中の PSA 値を測定したところ精巣摘除により LNCaP/Co を接種したマウスの PSA 値は元に戻ったのに対し LNCaP/IL-6 では PSA 値の著明な減少を認めた。

研究成果の概要(英文)：We transfected expression vector containing IL6 mRNA gene into human androgen dependent prostate cancer cell line (LNCaP). The secretion of IL6 into supernatant in cultured medium from IL6 gene transduced LNCaP (LNCaP/IL6) was confirmed by enzyme linked immuno-solvent assay (ELISA). At the same time, only expression vector was transfected into LNCaP as control (LNCaP/Co).

There was no significant difference in *in-vitro* growth among LNCaP, LNCaP/Co and LNCaP/IL6. However, when they were inoculated to nude mice, LNCaP/IL6 showed significantly rapid tumor growth compared to LNCaP and LNCaP/Co. Since LNCaP is androgen dependent cell line, tumor retardation was observed after castration in nude mice. Interestingly, LNCaP/IL6 showed more severe retardation by castration compared to LNCaP and LNCaP/Co.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌、ホルモン依存性、IL6、遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

内分泌療法は前立腺癌に対する有効な治療法の一つであるが、致命的な欠点として治療中に前立腺癌が本療法に対する抵抗性を獲得することが挙げられる。内分泌療法抵抗性前立腺癌(以下 HRPC と略す)の耐性のメカニズムに関しては多くの研究が展開されてきたが詳細なメカニズムは未だ明らかにされていない。一つの機序として B リンパ球の増殖を促進するサイトカインである IL6 が autocrine fashion で前立腺癌細胞の増殖を促し HRPC の発症に関与する可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

内分泌感受性前立腺癌細胞株に IL6 の遺伝子を導入、発現させることにより内分泌依存性に変化が生じるか否かを明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

IL6 の遺伝子を RT-PCR 法を用いヒトリンパ球 RNA から単離した。ほ乳類発現ベクター(プラスミド)へ遺伝子を組み込んだ後、COS7 細胞を用いて一時的な遺伝子導入を行い培養上清中への IL6 の分泌を確認した。この発現ベクターをヒト前立腺癌細胞株である LNCaP に遺伝子導入した。薬剤による選択を行い、IL6 を分泌するクローンを得た。IL6 の分泌は培養上清中の IL6 の濃度を ELISA 法にて測定した。

4. 研究成果

(1)IL-6 遺伝子導入による IL-6 産生能の獲得
ヒトのアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP に IL-6 の遺伝子を組み込んだ発現ベクターを lipofectamine 法により導入し、IL-6 強制発現株を選別した(以下 LNCaP/IL-6 と略す)。コントロールとして発現ベクターのみを導入した LNCaP/Co を同時に作成した。IL-6 の濃度測定に関しては培養上清液を用い市販の ELISA kit を用いた。母細胞である LNCaP や LNCaP/Co では培養上清液中に IL6 は検出されなかったのに対し、LNCaP/IL-6 は約 1ng/ml の IL6 を分泌していた。LNCaP、LNCaP/Co、LNCaP/IL6 との間で in vitro での増殖能の違いについて検討したが増殖能に関し細胞間に有意な差は認められなかった。

(2)増殖能の比較

LNCaP/IL6 を nude mouse に移植したところ母細胞の LNCaP や LNCaP/Co と比較して腫瘍増殖

能の亢進を認めた。このことより、IL6 分泌により LNCaP がアンドロゲンに依存しない自律的な増殖能を獲得したことが示唆された(図 1)。

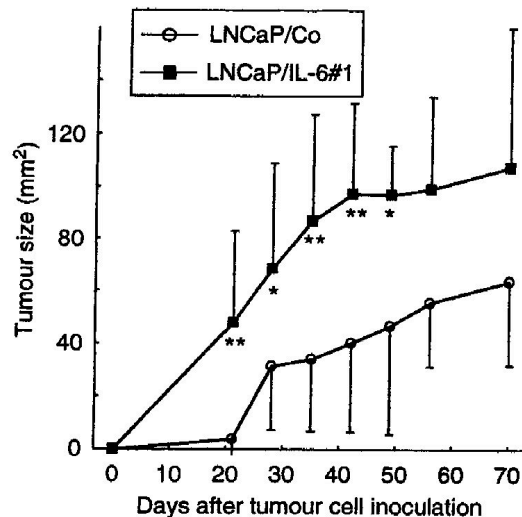


図 1 ヌードマウス移植後の増殖曲線

(3)アンドロゲン除去による増殖能の比較
一方、移植後に腫瘍がある一定の大きさになった段階で精巣摘除を行うとアンドロゲン依存性である LNCaP/Co は退縮を示した後に再度増殖を認めたのに対し、LNCaP/IL-6 は著明な退縮傾向を示した(図 2)。

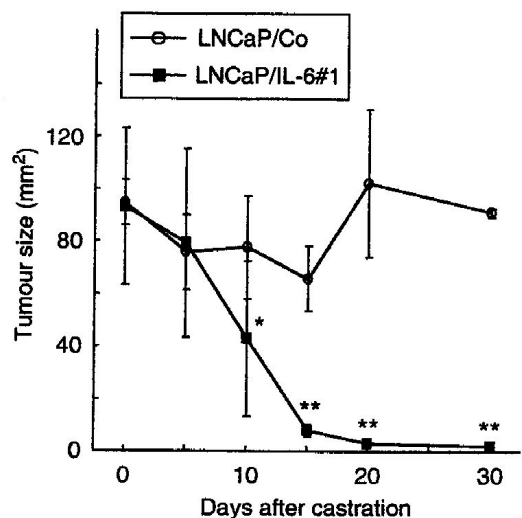


図 2 精巣摘除後の腫瘍増殖曲線

我々は当初 IL6 遺伝子導入によりアンドロゲン非依存性に増殖することを期待していただけにこの結果は予想とは正反対の結果となった。この結果を *in vitro* で再現すべく通常のメディウムにて 3 日間 LNCaP/Co、LNCaP/IL6 を培養した後、チャコールにてステロイドホルモンを除去したメディウムに変更しその後の腫瘍の増殖能を調べた。*in vivo* と同様にアンドロゲン除去による増殖抑制効果は LNCaP/IL6 においてより顕著であった(図 3)。

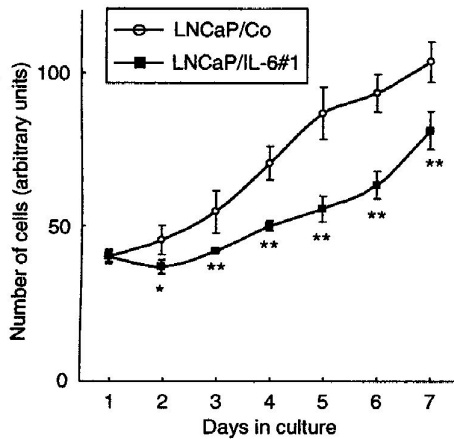


図3 アンドロゲン除去による *in vivo* での増殖能の比較

(4) PSA 分泌量の比較

次に腫瘍の産生する前立腺特異抗原 (PSA) の分泌量に関して検討を加えた。*in vitro* で通常のメディウムで培養している際の培養液中への PSA の分泌量は LNCaP/IL6 の方が有意に低かったが、アンドロゲンを除去したメディウムに変更した後の PSA 分泌量は LNCaP/Co、LNCaP/IL6 ともに著明な低下を認めた(図 4)。

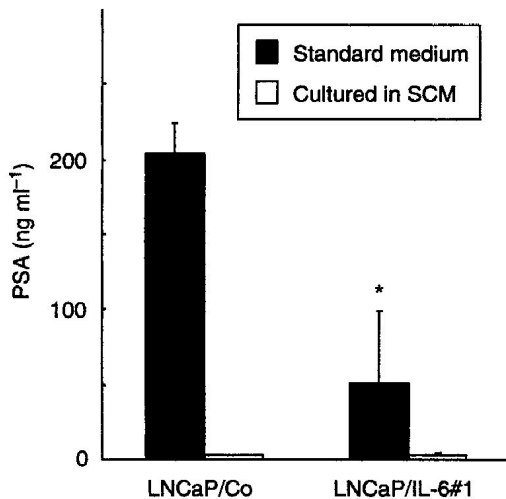


図4 *in vitro* での PSA 分泌能の比較

ヌードマウスへ接種した際の血清中の PSA 濃度に関しては *in vitro* の時と同様 LNCaP/IL6 の方が有意に低かった。興味深いことにヌードマウスの精巣摘除を行うと血清中の

PSA は LNCaP/Co ではしばらく経過すると PSA 分泌能を再度獲得するのに比べ、LNCaP/IL6 では腫瘍の著明な退縮に伴い PSA の分泌はほとんど認められなくなった(図 5)。

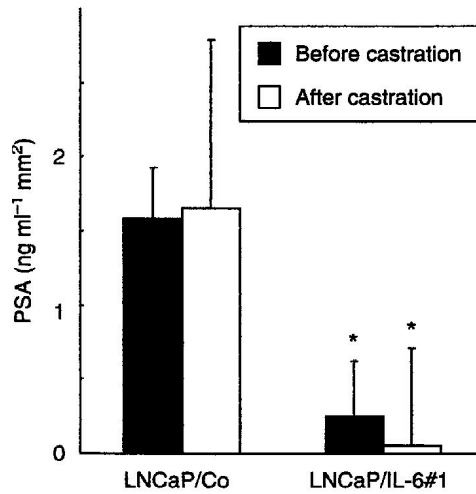


図5 *in vivo* での PSA 分泌能の比較

(5) 外因性 IL6 添加に伴う下流シグナルの変化

IL6 のシグナルの下流にある Mitogen activated protein kinase (MAPK) および Janus-activated kinase (JAK)/signal transducers and activation of transcription (STAT) のリン酸化につき検討した。LNCaP/Co においては IL-6 の添加により時間依存性に MAPK および STA3 のリン酸化が認められたのに対し LNCaP/IL6 では両者ともにリン酸化は認められなかった。

以上、述べてきたように IL-6 遺伝子導入に伴いアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株である LNCaP の生物学的特性は顕著な変化を示した。IL-6 は前立腺癌細胞のアンドロゲン非依存性に関与しているという報告が多く、我々も当初はアンドロゲン非依存性に傾くものと予想していた。結果は正反対であり IL-6 遺伝子導入により去勢による抗腫瘍効果は著明に増強された。IL-6 は前立腺癌細胞の増殖に関し大きな影響を持っていることは間違いないが、過去の文献を見てみるとその挙動は単純とは言えない。IL-6 が外因性に作用するのかあるいは本研究のように強制的に内因性に発現させるのかによってもその作用は大きく異なる。外因性に添加した IL-6 が LNCaP/Co においては MAPK および STA3 のリン酸化を引き起こしたのに対し、LNCaP/IL6 では両者ともにリン酸化は誘導されなかったこともこうした多様性を反映しているものと思われた。

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)
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 勲 (HARA ISAO)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10263378

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし