

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791105

研究課題名（和文） 前立腺癌細胞の薬剤耐性機序の解明

研究課題名（英文） The mechanism of chemoresistance in prostate cancer cell

研究代表者

小島 圭太郎 (KOJIMA KEITARO)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30444285

研究成果の概要（和文）：前立腺癌の薬剤耐性機序の解明を目的にホルモン不応性前立腺癌細胞を用い、パクリタキセル耐性細胞を樹立し microRNA 34a, SIRT1, HuR, Bcl-2 の役割について報告した。

研究成果の概要（英文）：The paclitaxel-resistant prostate cancer cell lines were established from hormone-refractory prostate cancer cell line (PC3) to elucidate the mechanism of chemoresistance in prostate cancer. We examined the role of microRNA 34a, SIRT1, HuR, and Bcl-2 in paclitaxel-resistant prostate cancer cell line.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
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、薬剤耐性、PC3、PC3PR、microRNA、SIRT1、Bcl2、Paclitaxel

1. 研究開始当初の背景

本邦における前立腺癌患者は増加している。前立腺癌は一般的にホルモン療法に感受性が高いといわれているがホルモン療法に不応性となった場合は治療に難渋する。近年ドセタキセルを中心とするタキサン系抗癌剤が治療法として確立されつつあるがドセタキセル耐性時の予後は不良である。

2. 研究の目的

以上より、ドセタキセル耐性前立腺癌に対す

る作用機序の解明は喫緊の課題でもある。我々はホルモン不応性前立腺癌のタキサン系抗癌剤を中心とする薬剤耐性機序の解明を目的とし以下の実験を行うに至った。

3. 研究の方法

(1)ホルモン不応性前立腺癌細胞(PC3)を用い、パクリタキセルを5nMより添加開始し Stepwise 法にて Paclitaxel 耐性前立腺癌細胞株(PC3PR)を樹立した。Docetaxel を含む他の抗癌剤との交叉耐性についても確認した。

(2)PC3 および PC3PR について microRNA 34a (miR-34a) の発現量につき比較検討した。

(3)PC3PR に対し miR-34a を導入した後の細胞の増殖変化について実験した。また miR-34a 導入後における Paclitaxel, VP-16 および Daunorubicin の感受性変化についても検討した。

(4)PC3 および PC3PR において SIRT1・HuR・Bcl2 の蛋白・mRNA の発現量について比較検討した。SIRT1 についてはプロモーター領域および 3' UTR 領域の活性上昇についてレポーターアッセイを行い比較検討した。

(5)PC3PR に対し miR-34a 導入時のプロモーター活性・3' UTR 活性の変化について比較検討した。

(6)PC3PR において miR-34a 導入時の SIRT1・HuR・Bcl2 等の蛋白・mRNA の発現量の変化について比較検討した。

(7)PC3PR に対し HuR siRNA 導入し HuR 蛋白発現量を抑制した後の SIRT1、Bcl2 の発現量の変化について比較検討した。

以上の実験の検証として PC3 parental 細胞を用い以下の実験を行った。

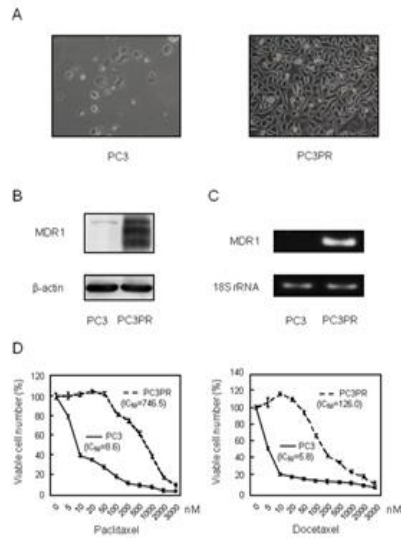
(8)上記 PC3 に対し、Anti-miR-34a を導入することにより miR-34a の発現量を上昇させ、Paclitaxel の感受性変化について比較検討した。また、Anti-miR-34a 導入時の HuR・SIRT1・Bcl2 の蛋白発現量の変化についても比較検討した。

(9)PC3 における miR-34a 導入時の HuR の発現量の変化について比較した。また、HuR siRNA 導入時の SIRT1・Bcl2 の発現量の変化についても比較検討した。

4. 研究成果

(1)Paclitaxel 耐性前立腺癌細胞の樹立 : Paclitaxel 投与 5 日後の Phenotype の比較 (A) : PC3 はアポトーシス所見を呈し細胞死に至っていたのに対し PC3PR は正常であった。MDR1 の蛋白 (B)・mRNA (C) 発現量が PC3PR にて増加しており、IC50 (D) にて増加がみられたことから耐性細胞の樹立と定義した。Docetaxel との交叉耐性についても実験し交叉耐性の獲得を確認した。

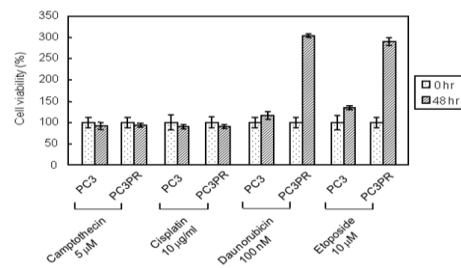
1. Establishment of paclitaxel-resistant PC3PR cells from parental PC3 cells



(A) Photographs of PC3 and PC3PR cells were taken after treatment with 70 nM paclitaxel for 5 days. (B) Cell lysates harvested from PC3 and PC3PR cells were subjected to Western blot analysis for MDR1 and β-actin. (C) Total RNA extracted from PC3 and PC3PR cells was subjected to semi-quantitative RT-PCR for MDR1 and 18S rRNA. (D) PC3 and PC3PR cells were exposed to paclitaxel or docetaxel at indicated concentrations for 48 h and then cell viability was determined.

(2)交叉耐性: PC3PR に対し、CPT, CDDP, VP-16, Daunorubicin 等の感受性につき検討したが、CPT, CDDP に対しては交叉耐性を認めなかった。一方で VP-16, Daunorubicin に対しては交叉耐性を認めた。

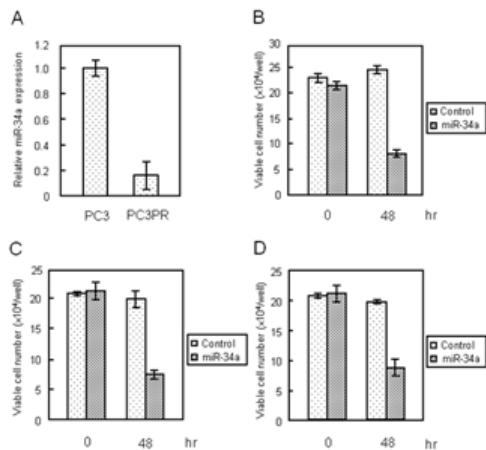
2. Cross-resistance of PC3PR cells to daunorubicin and etoposide.



After treatment of PC3 and PC3PR cells with camptothecin, cisplatin, daunorubicin and etoposide at indicated concentrations for 48 h, viable cell number was counted. The relative ratio of the viable cell number after and before treatment was calculated.

(3)miR-34a の発現量の比較 : PC3PR にて PC3 と比較して発現量が減少していた。また、miR-34a の導入にて Paclitaxel・VP-16・Daunorubicin に対する感受性の増大が認められた。

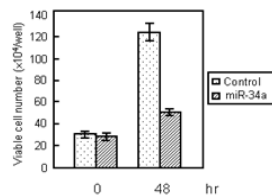
3. Down-regulation of miR-34a expression and attenuation by miR-34a over-expression of resistance to paclitaxel, daunorubicin and etoposide in PC3PR cells.



(A) Total RNA containing miRNA was extracted from PC3 and PC3PR cells and subjected to quantitative real-time RT-PCR for miR-34a. Data are expressed as mean \pm SD (n=4). (B), (C) and (D) PC3PR cells were transfected with either control or miR-34a precursor at 10 nM for 8 h. After incubation in fresh medium for 16 h, cells were replated onto 6-well plates and cultured for additional 24 h. Cells were then treated with 500 nM paclitaxel (B), 400 nM daunorubicin (C) or 50 mM etoposide (D) for 48 h. Viable cell number was counted at the beginning and end of the treatment. Data are expressed as mean \pm SD (n=3).

(4) miR-34a の導入の細胞増殖に及ぼす影響：PC3PR に対し miR-34a を導入することにより細胞増殖抑制効果が認められた。Fujita と共同で提出した Biochem Biophys Res Commun 2008;377(1):114-9 での miR-34a の PC3 増殖に及ぼす影響の結果と類似していた。

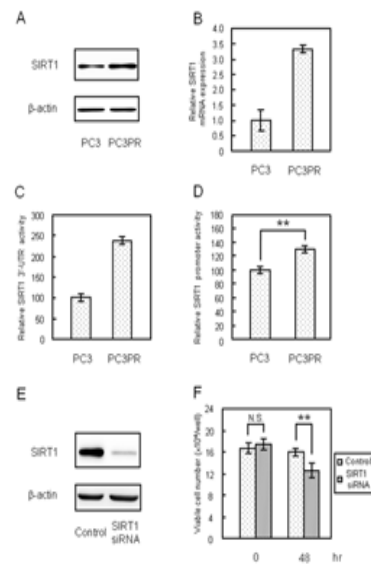
4. Effects of ectopic expression of miR-34a on proliferation of PC3PR cells



PC3PR cells were transfected with either control or miR-34a precursor at 10 nM for 8 h. After incubation in fresh medium for 16 h, cells were replated onto 6-well plates and cultured for additional 24 h. Viable cell number was counted at that time and 48 h later. Data are expressed as mean \pm SD (n=3).

(5) PC3PR における SIRT1 の役割：PC3PR において PC3 と比較し、蛋白、mRNA、3' UTR、プロモーター活性等の上昇が認められた。また、SIRT1 siRNA 導入にて Paclitaxel の感受性の増大が認められた。

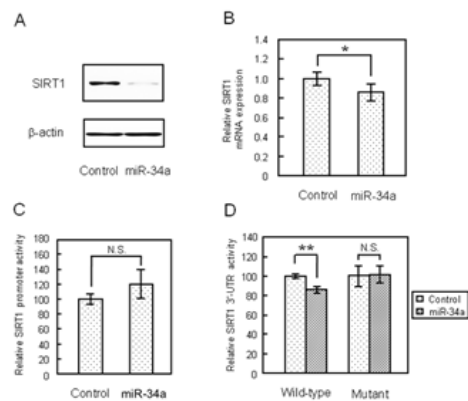
5. Up-regulation of SIRT1 expression and attenuation by SIRT1 knockdown of paclitaxel-resistance in PC3PR cells



(A) and (B) Cell lysates and total RNA harvested from PC3 and PC3PR cells were subjected to Western blot analysis (A) and quantitative real-time RT-PCR (B) for SIRT1. RT-PCR data are expressed as mean \pm SD (n=4). (C) and (D) The firefly luciferase reporter gene of the SIRT1 3'-UTR (20 ng) (C) or the SIRT1 promoter (250 ng) (D) was transfected into PC3PR cells along with the Renilla luciferase expressing plasmid (20 ng). Luciferase assay was performed 24 h after transfection. Relative luciferase activity was expressed as a ratio of firefly/Renilla luciferase activity. Data are expressed as mean \pm SD from three independent experiments. **p<0.01 vs. PC3 cells. (E) PC3PR cells were transfected with either control or SIRT1 siRNA at 10 nM for 8 h. Forty-eight hours after the initiation of transfection, cell lysates were harvested and subjected to Western blot analysis for SIRT1. (F) PC3PR cells transfected with either control or SIRT1 siRNA were incubated in fresh medium for 16 h. Cells were replated onto 6-well plates and cultured for additional 24 h. Cells were then treated with 300 nM paclitaxel for 48 h. Viable cell number was counted at the beginning and end of the treatment. Data are expressed as mean \pm SD (n=3). **p<0.01 vs. control. N.S. denotes non-significant.

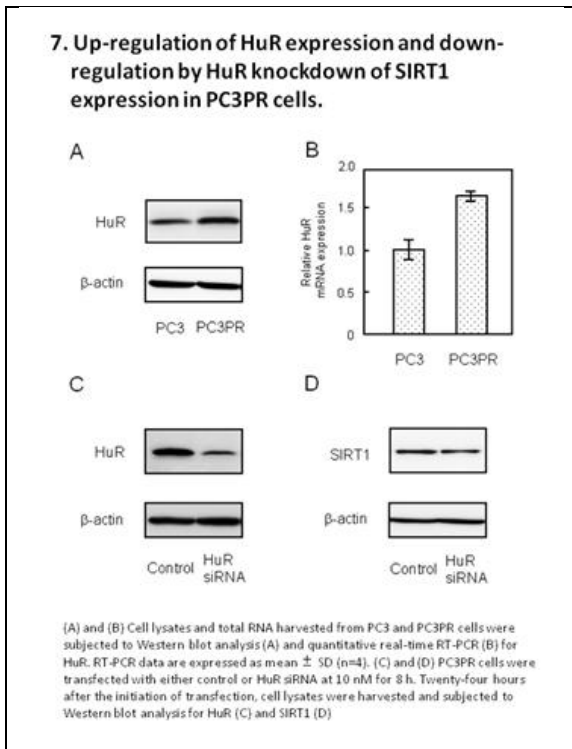
(6) miR-34a による SIRT1 に及ぼす影響：miR-34a 導入にて SIRT1 の蛋白・mRNA 等の低下が認められた。また、3' UTR の活性の低下が認められた。一方、プロモーター活性は変化がなかった。

6. Down-regulation by miR-34a of SIRT1 expression through modulating the SIRT1 3'-UTR activity in PC3PR cells

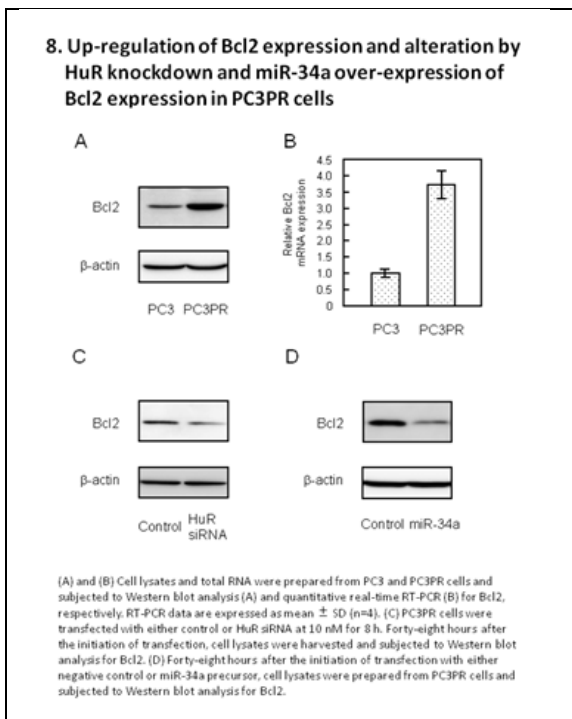


(A) and (B) Forty-eight hours after transfection with either negative control or miR-34a precursor, cell lysates and total RNA were prepared from PC3 and PC3PR cells and subjected to Western blot analysis (A) and quantitative real-time RT-PCR (B) for SIRT1, respectively. RT-PCR data are expressed as mean \pm SD (n=4). *p<0.05 vs. control. (C) and (D) The SIRT1 promoter reporter gene (250 ng) (C) or the wild-type or mutant reporter gene of the SIRT1 3'-UTR (20 ng) (D) was co-transfected into PC3PR cells with the Renilla luciferase expressing plasmid (20 ng) and with either negative control or miR-34a precursor. Luciferase assay was performed 24 h after transfection. Relative luciferase activity was expressed as a ratio of firefly/Renilla luciferase activity. Data are expressed as mean \pm SD from three independent experiments. **p<0.01 vs. control. N.S. denotes non-significant.

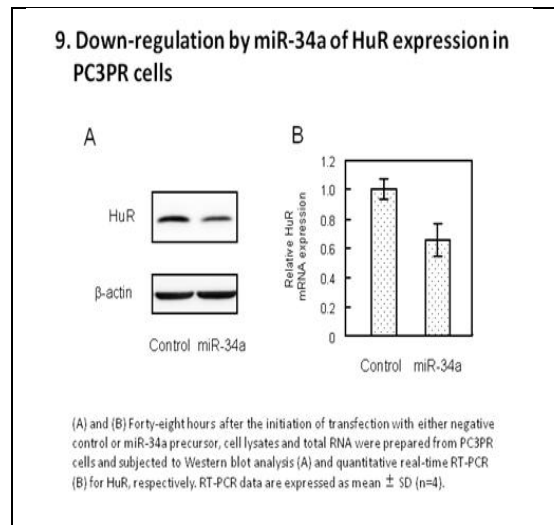
(7)PC3PR における HuR の役割 : PC3PR において PC3 と比べ HuR の蛋白・mRNA の発現が上昇していた。HuR siRNA の導入において HuR・SIRT1 の発現量の低下が認められた。



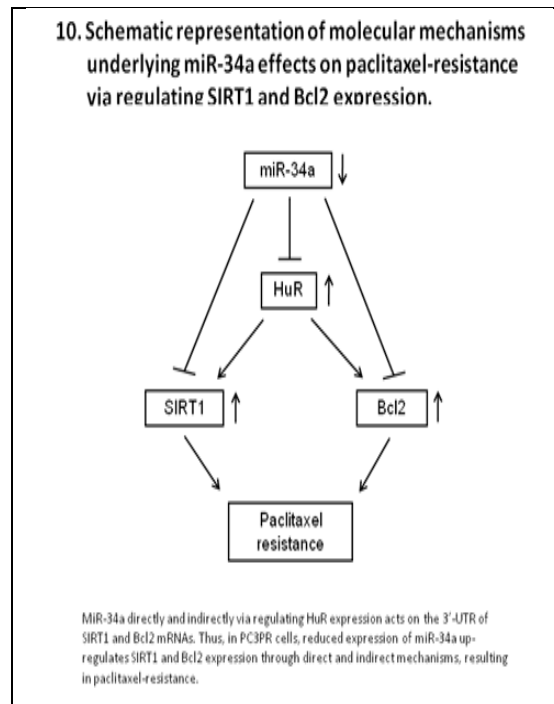
(8)PC3PR における Bcl2 の役割 : PC3PR において PC3 と比べ Bcl2 蛋白・mRNA の発現が上昇していた。HuR siRNA の導入において Bcl2 の発現量の低下が認められた。miR-34a 導入 にも Bcl2 の蛋白発現の低下が認められた。



(9)PC3PR に miR-34a 導入にて HuR の蛋白・mRNA 発現量の低下が認められた。



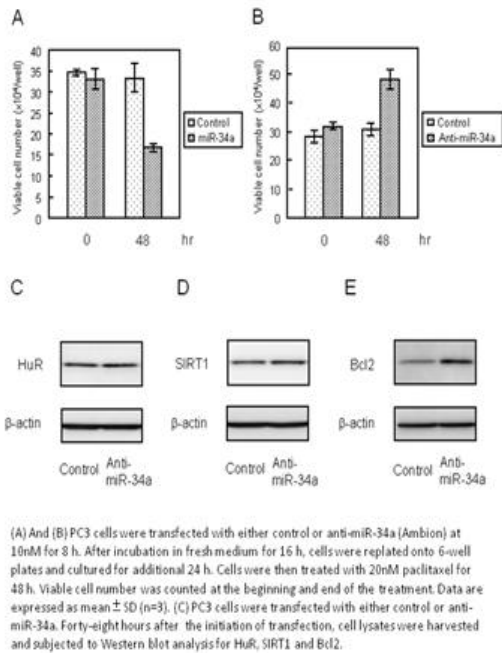
(10)Paclitaxel 耐性前立腺癌細胞の耐性化獲得機序の考案 : PC3 の Paclitaxel 耐性化獲得機序として以下を提案するに至った。



以上は上記結果を support するために追加施行したものである。

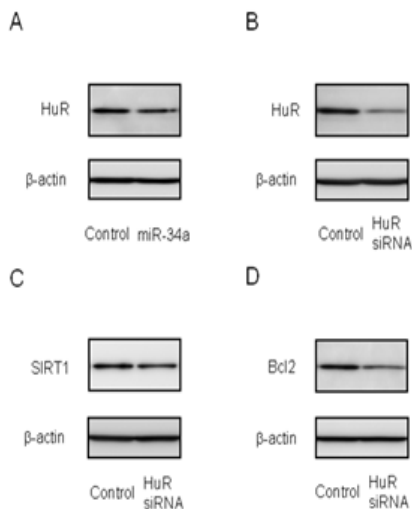
(11)PC3 に対し Anti-miR-34a を導入することにより Paclitaxel に対して感受性の低下が認められた。また、HuR・SIRT1・Bcl2 の発現量の上昇が認められた。

11. Effects of miR-34a and anti-miR-34a on paclitaxel sensitivity and of anti-miR-34a on HuR, SIRT1 and Bcl2 expression in PC3 cells



(12)PC3においてmiR-34a導入時にHuRの蛋白発現が低下した。HuR siRNA導入時においてSIRT1・Bcl2の発現量も共に低下することが示された。

12. Effects of miR-34a on HuR expression and of HuR knockdown on HuR, SIRT1 and Bcl2 expression in PC3 cells.



(A) PC3 cells were transfected with either control or miR-34a at 10nM for 8 h. Forty-eight hours after the initiation of transfection, cell lysates were harvested and subjected to Western blot analysis for HuR. (B), (C) and (D) PC3 cells were transfected with either control or HuR siRNA at 10nM for 8 h. Then, cell lysates were harvested and subjected to Western blot analysis for HuR, SIRT1 and Bcl2.

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3件)

① Kojima K, Fujita Y, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M. MiR-34a Attenuates Paclitaxel-Resistance of Hormone-Refractory Prostate Cancer PC3 Cells Through Direct and Indirect Mechanisms. The Prostate, 査読あり, 掲載決定

② Kojima K, Ohhashi R, Fujita Y, Hamada N, Akao Y, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M. A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. Biochem Biophys Res Commun, 査読あり, 2008;373(3):423-428.

③ Fujita Y, Kojima K, Hamada N, Ohhashi R, Akao Y, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M. Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. Biochem Biophys Res Commun, 査読あり, 2008;377(1):144-119

[学会発表] (計4件)

①2010年4月27日
第98回日本泌尿器科学会総会(盛岡)
パクリタキセル耐性前立腺癌細胞におけるmiR-34aおよびSIRT1の抗癌剤感受性に対する役割について

岐阜大学医学部泌尿器科
小島圭太郎、水谷晃輔、仲野正博、出口隆
朝日大学村上記念病院
江原英俊
岐阜県国際バイオ研究所
藤田泰典、伊藤雅史、野澤義則

②2009年2月14日
第18回泌尿器科分子・細胞研究会(鹿児島)
ホルモン抵抗性前立腺癌細胞およびPaclitaxel耐性細胞株におけるSIRT1の機能および抗癌剤感受性変化について

岐阜大学医学部泌尿器科
小島圭太郎、水谷晃輔、江原英俊、出口隆
岐阜県国際バイオ研究所
大橋里也子、赤尾幸博、伊藤雅史、野澤義則

③2008年12月12日
第81回日本生化学会(神戸)
SIRT1のホルモン抵抗性前立腺癌細胞における増殖および抗癌剤抵抗性に及ぼす影響について

岐阜大学医学部泌尿器科
小島圭太郎、水谷晃輔、江原英俊、出口隆
岐阜県国際バイオ研究所

大橋里也子、濱田奈々子、藤田泰典、赤尾幸博、伊藤雅史、野澤義則

④2008年11月16日

第58回日本泌尿器科学会中部総会（大津）
ホルモン抵抗性前立腺癌細胞における
SIRT1の関与

岐阜大学前立腺癌研究グループ：

小島圭太郎、加藤卓、清家健作、久保田恵章、
後藤高広、宇野裕己、仲野正博

岐阜大学：水谷晃輔、江原英俊、出口隆

岐阜県国際バイオ研究所：

大橋里也子、伊藤雅史、野澤義則

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 圭太郎 (KOJIMA KEITARO)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30444285

(2) 研究分担者：なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者：なし

()

研究者番号：