

機関番号：14501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791503
 研究課題名（和文） 前立腺癌のホルモン非依存性進展における Interleukin-6 の役割の解明
 研究課題名（英文） Enhanced sensitivity to androgen withdrawal due to overexpression of interleukin-6 in androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells
 研究代表者 寺川智章（TOMOAKI TERAKAWA）
 神戸大学・大学院医学系研究科 医学研究員
 研究者番号：50533759

研究成果の概要（和文）： ヒトアンドロゲン依存性前立腺癌細胞 LNCaP においては、前立腺癌細胞自身が過剰に分泌する IL-6 は、アンドロゲン除去環境下において、前立腺癌細胞のアンドロゲン非依存性進展を抑制的に制御している可能性が、初めて示唆された。本研究により、前立腺癌のホルモン非依存性進展において、IL-6 が作用する分子機構解明の一端に新しい知見が加えられた。

研究成果の概要（英文）： Excessive secretion of IL-6 by LNCaP cells in an autocrine manner may have a suppressive function in their growth and acquisition of androgen-independent phenotype under an androgen-deprived condition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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、IL-6

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、遠隔転移を来たした進行性症例であっても、多くの場合アンドロゲン除去を中心としたホルモン療法に反応し、自覚的および他覚的所見の著しい改善効果が期待出来る。

しかし、数年後には半数近くの症例でホルモン療法に抵抗性を示すようになり、アンドロゲン非依存性進展を来たし、やがては死に至る。この前立腺癌のホルモン非依存性進展を司る正確な分子メカニズムは、いまだ解明の途上にある。

しかし、現在までにその機序の一端に関する報告は多数なされており、それらはアンドロゲン受容体（AR）を介する経路と AR を介さない経路の二つに大きく分類することが出来る。

AR を介する経路のうち、アンドロゲン以外の分子によるリガンド非依存性の AR 活性化が、前立腺癌のホルモン非依存性進展に重要な役割を果たしている可能性があるため、近年注目を集めている。

IGF-1 や EGF といったいわゆる growth factor に加え、IL-6 を中心としたサイトカインにより、アンドロゲン非存在下において、アンドロゲンのターゲット遺伝子の活性を誘導する AR の活性が刺激されることが証明されてきた (Culig Z et al. Cancer Res. 1994;54:547478, Hobisch A et al. Cancer Res. 1998;58:4640-45)。

また、臨床的にホルモン不応性癌と診断された症例において、血清中の IL-6 値が有意に上昇しており、且つ血清 IL-6 値が高値である症例の予後が不良であるとの報告がなされている (George DJ et al. Clin Cancer Res. 2005;11:1815-20, Domingo-Domenech J et al. Clin Cancer Res. 2006; 12:5578-86)。

このような所見に基づき、IL-6 はリガンド非依存性の AR 活性化に關与する key molecule であると認識されるに至り、今日まで前立腺癌のホルモン非依存性進展と IL-6 との関係を明らかにし、それをホルモン不応性前立腺癌の治療に繋げることを目的とした多数の研究が行われてきた。

今日まで多くの研究者は、IL-6 による前立腺癌細胞の悪性形質亢進作用を示唆する結論を導いてきた。例えば、Okamoto および Lou 等は、IL-6 により前立腺癌細胞の増殖が活性化することを報告した (Okamoto et al. Prostate 1998;35:255-262, Lou et al. Prostate 2000;42:239-242)。

また、Lee 等は、ヒトアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP に IL-6 発現プラスミドベクターを導入し、IL-6 を高発現する LNCaP を樹立し、in vitro、および in vivo の双方において、アンドロゲン非存在下で IL-6 高発現株の細胞増殖能が亢進し、それが AR を介していることを証明した (Lee et al. Clin Cancer Res. 2003;9:370-76)。

その一方で、IL-6 が前立腺癌細胞の悪性化を負に制御する可能性を示唆した報告も僅かではあるが散見される (Chung et al. Prostate 1999;38:199-207, Jia et al. Cancer Res. 2004;64:2619-26)。

以上のように、前立腺癌のアンドロゲン非依存性進展における IL-6 の役割については、その分子機構に関して相反する結果も報告されており、未だにその全容の解明には至っていない。

2. 研究の目的

LNCaP 細胞に IL-6 を導入し、アンドロゲン除去前後での形質変化を解析することで、ホ

ルモン感受性前立腺癌が自己分泌する IL-6 の意義について検討し、それによって、前立腺癌のホルモン非依存性進展機構の一端が明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) IL-6 高発現前立腺癌細胞株 (LNCaP/IL-6) の樹立および腫瘍増殖能の評価

ヒトアンドロゲン依存性前立腺癌細胞 LNCaP に、IL-6 発現 cDNA プラスミドベクターを遺伝子導入した。得られた IL-6 遺伝子導入細胞株の培養上清中の IL-6 の発現量を ELISA 法にて確認し、高発現株 LNCaP/IL-6 を樹立した。同時に vector のみを導入したコントロール LNCaP 細胞 (LNCaP/Co) も樹立し、in vitro および in vivo で、アンドロゲン除去前後での増殖能を比較した。

(2) アンドロゲン除去前後での IL-6 の下流シグナル伝達系の評価

IL-6 がアンドロゲン非依存性に AR を活性化する系として報告されている下流伝達シグナル経路である JAK-STAT、Ras-MAPK 及び PI3K-Akt 系の活性化を、標準およびステロイドホルモン除去培地で培養した際の両細胞株において評価した。

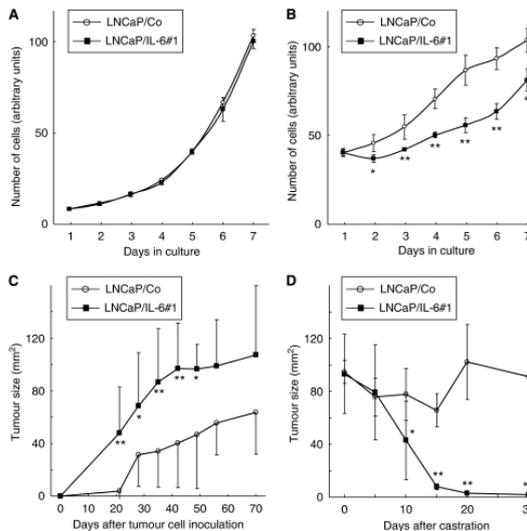
(3) 網羅的遺伝子発現解析

アンドロゲン除去前後での両細胞株の cDNA を microarray にて解析し、両細胞間で発現差がある遺伝子を検討した。

3. 研究成果

(1) IL-6 高発現前立腺癌細胞株 (LNCaP/IL-6) の樹立および腫瘍増殖能の評価

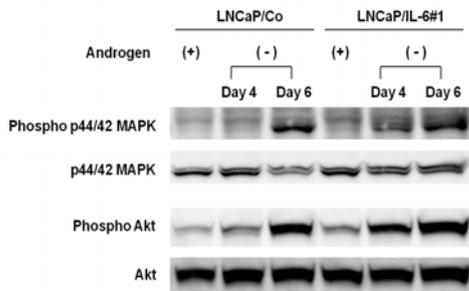
LNCaP/IL-6 の培養上清中には 1000-1500pg/ml の IL-6 の分泌が認められた。アンドロゲン存在下では、LNCaP/IL-6 の in vitro における細胞増殖は、LNCaP/Co と同等であったが、アンドロゲン除去後の増殖は、LNCaP/Co に比し顕著に低下した。In vivo においては、両株をヌードマウス皮下に移植し、一定の腫瘍径に達したマウスに castration を施行すると、LNCaP/IL-6 は、castration 後に完全に消退した。(図 1)



(図 1)

(2) アンドロゲン除去前後でのIL-6の下流シグナル伝達系の変化

アンドロゲン除去後において、LNCaP/IL-6ではLNCaP/Coに比し、p44/42 ERKおよびAktのリン酸化が亢進していた。さらに、アンドロゲン除去環境下で、ERKおよびAktのリン酸化inhibitorを加えると、LNCaP/IL-6ではLNCaP/Coに比し、より顕著にその増殖が抑制された。(図2)



(図 2)

(3) 網羅的遺伝子発現解析

アンドロゲン除去後、LNCaP/IL-6ではMAPK系遺伝子の発現が亢進していた。また、relaxinやVEGFといった前立腺癌の進行に関与する遺伝子の発現は低下していた。全体として、アンドロゲン除去前後での両群間の増殖能に合致するようなかたちで、増殖やアポトーシスに関連する遺伝子の発現に相違を認めた。(図3, 4)

Gene symbol	Genebank accession no.	Gene name	Fold change
PCPLN	BC022895	potassium broadly-coupling channel, subfamily 4, member 1	23.88
CELE2	BC038798	celexin 2 precursor	21.69
HLA-JCH2	BC018898	Class II (HLA-DQ) homology, subfamily C, member 15	18.92
HLNG1	BC023394	HIV homology domain containing 1	9.27
GM2C7	BC023394	glycosaminoglycan, heparan-6-sulfate 2	8.87
CAIY2	BC023395	calcitonin receptor type 2	8.28
GM2C2	BC023394	glycosaminoglycan, heparan-6-sulfate 2	8.18
ANGPTL1	BC049588	angiogenin like 1	3.78
IFNGR2	BC049588	Interferon gamma receptor 2 (proliferation gamma transducer 1)	3.08
NOXC12	AB019544	Interleukin C12	2.95
ANGPT17	BC049588	Angiogenin like 17	2.73
MAP3	BC049588	mitogen-activated protein kinase 3	2.69
ANGPT4	BC049588	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	2.57
MAP2K	BC049588	MAP kinase kinase 2	2.49
MAP1	BC072688	mitogen-activated protein kinase 1	2.42
MAP3B1	BC049588	dyad, cytoplasmic 1, intermediate chain 1	2.34
VELE2	BC023394	heparin 2	2.29
MAP7	BC049588	mitogen-activated protein kinase 7, cellular	2.27
CTSL1	BC049588	cathepsin L component 1, c subcomponent like 1	2.18
MAP3G	BC072719	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	2.08

(図 3)

Gene symbol	Genebank accession no.	Gene name	Fold change
MAPK1	BC049588	RAS protein kinase like 1 (ERK1) like	-2.99
VEGFR	BC049588	vascular endothelial growth factor A	-2.96
MAP2K2B	BC049588	MAP kinase kinase 2, H2B	-2.29
MAP2K2A	BC049588	MAP kinase kinase 2, H2A	-2.21
CPH2C	BC011668	C protein-coupled receptor, family C, group II, member C	-2.20
MAP2	BC049588	MAP kinase 2	-2.01
SH2B1	BC049588	SH2 domain containing protein 3	-1.87
MAP3C	BC049588	regulator of G-protein signaling 9	-1.86
MAPK	BC049588	MAP kinase 1, ERK1	-1.85
TKF4	BC049588	transcription factor 4	-1.69
EP300	BC049588	epithelial growth factor receptor pathway substrate 3	-1.52
PPP1R1A	BC049588	protein phosphatase 1, regulatory (high) subunit 1A	-1.48
MAPK13	BC049588	MAP kinase 13	-1.39
MAP	BC049588	MAP kinase	-1.38
PTPRB	BC049588	protein tyrosine phosphatase, receptor type, B	-1.25
MAP1B	BC049588	MAP kinase 1B	-1.13
VIM	U04104	vimentin	-10.91
AC301	BC049588	actin-Ca2 synthetase short-chain family member 1	-10.62
MAP3A	BC049588	MAP kinase kinase kinase 3A	-9.65
MAP3E	BC049588	regulator of G-protein signaling 2, 2BDE	-9.27

(図 4)

以上の結果から、IL-6 高発現 LNCaP は、(1) アンドロゲンが除去されると、その増殖能は、著明に低下した。(2) アンドロゲン除去により、一般に腫瘍増殖促進に関与すると考えられている p44/42 ERK および Akt のリン酸化が亢進していた。これらの inhibitor を加えると、LNCaP/Co に比し、より顕著にその増殖が抑制された。(3) 網羅的遺伝子解析でも、LNCaP/IL-6 がアンドロゲン除去後に増殖が抑制されることに合致する遺伝子の発現変化を認めた。これらの結果により、ヒトアンドロゲン依存性前立腺癌細胞 LNCaP においては、前立腺癌細胞自身が過剰に分泌する IL-6 は、アンドロゲン除去環境下において、前立腺癌細胞のアンドロゲン非依存性進展を抑制的に制御している可能性が、初めて示唆された。また、その機序には Ras-MAPK 及び PI3K-Akt 系の活性化が関与しているが、それはアンドロゲン除去により誘導される apoptotic な変化に抵抗するいわゆる adaptive な現象と考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Enhanced sensitivity to androgen withdrawal due to overexpression of interleukin-6 in androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells.

Terakawa T, Miyake H, Furukawa J, Ettinger SL, Gleave ME, Fujisawa M British Journal of Cancer 査読有、V0ol. 101、2009、pp1731-1739

[学会発表] (計 4 件)

①第 104 回 アメリカ泌尿器科学会

発表者； 寺川智章

発表表題；Enhanced sensitivity to androgen withdrawal due to overexpression of Interleukin-6 in androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells

発表年月日；2010/6/3

発表場所；サンフランシスコ

②第 19 回 泌尿器分子細胞研究会

発表者； 寺川智章

発表表題；アンドロゲン依存性前立腺細胞株 LNCaP における IL-6 高発現の意義

発表年月日；2010/2/20

発表場所；神戸

③第 67 回 日本癌学会

発表者； 寺川智章

発表表題；Enhanced sensitivity to androgen withdrawal by overexpression of IL-6 in androgen-dependent prostate cancer LNCaP cells

発表年月日；2008/10/29

発表場所；名古屋

④第 96 回 日本泌尿器科学会総会

発表者； 寺川智章

発表表題；アンドロゲン依存性前立腺細胞株 LNCaP における IL-6 高発現の意義

発表年月日；2008/4/26

発表場所；横浜

[図書] (計 0 件)

(1) 研究代表者

寺川 智章 (TERAKAWA TOMOAKI)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
研究者番号：50533759

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

6. 研究組織