

機関番号：23701

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791514

研究課題名 (和文) アンドロゲン不応性前立腺がん細胞のアポトーシスにおけるアンドロゲン受容体の役割

研究課題名 (英文) Effect of androgen receptor on apoptosis induction in androgen-independent prostate cancer cells

研究代表者

井口 和弘 (IGUCHI KAZUHIRO)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10295545

研究成果の概要 (和文)：

アンドロゲン応答性前立腺癌細胞 LNCaP 細胞から樹立したアンドロゲン低応答性 LNCaP-E9 細胞およびアンドロゲン抵抗性 AIDL 細胞を用いて解析を行った。各細胞にはアンドロゲン受容体の発現が観察された。LNCaP-E9 細胞のアンドロゲン低応答性は Akt の低リン酸化が関与していた。AIDL 細胞のアンドロゲン抵抗性はアンドロゲン受容体の変異 (T877A/W741C) が関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Low-androgen-sensitive LNCaP-E9 cells and androgen-independent AIDL cells were established from androgen receptor-positive prostate cancer LNCaP cells. Androgen receptor was expressed in LNCaP-E9 and AIDL cells. Low androgen sensitivity in LNCaP-E9 cells was associated with reduced Akt phosphorylation. W741C and T877A mutations were found in AIDL cells and the mutations may explain the androgen resistance of AIDL cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：生物薬剤学，泌尿器科学

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：LNCaP 細胞，LNCaP-E9 細胞，AIDL 細胞，アンドロゲン受容体，アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

アンドロゲン受容体によるシグナルは前立腺癌の進展に深く関わっており，体内のアンドロゲンの作用を抑制する治療法（内分泌療法）により，前立腺癌の退縮をはかることができる。しかしながら，この内分泌療法は初期の前立腺癌には効果的であるものの，治療が長期にわたると多くの場合その効果が失われ，アンドロゲンの存在に関係なく活発な増殖をするアンドロゲン抵抗性前立腺癌細胞が出現する。内分泌療法に抵抗性を獲得したアンドロゲン抵抗性癌は一般的に悪性

度が高く予後不良であるため，内分泌療法後のアンドロゲン抵抗性癌を如何に治療するかは現在の前立腺癌治療の課題である。アンドロゲン抵抗性前立腺癌はその増殖にアンドロゲンを必要としない。しかしながら，臨床で観察されるアンドロゲン抵抗性癌の多くにアンドロゲン受容体の発現が検出される。アンドロゲン抵抗癌におけるアンドロゲン受容体の役割についてこれまでいくつかの報告があるものの，その結果は互いに矛盾している。

2. 研究の目的

- (1) アンドロゲン抵抗性前立腺癌細胞の特性を理解する目的で、アンドロゲン応答性前立腺癌細胞 LNCaP 細胞から樹立したアンドロゲン低応答性 LNCaP-E9 細胞およびアンドロゲン抵抗性 AIDL 細胞のアンドロゲン感受性変化の原因を解明する。
- (2) アンドロゲン抵抗性前立腺癌細胞のアポトーシスにおけるアンドロゲン受容体の役割を明らかにする目的で、LNCaP 細胞および LNCaP-E9 細胞を用い、shRNA によりアンドロゲン受容体をノックダウンした時のアポトーシス関連因子の発現量に与える影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

LNCaP 細胞および LNCaP-E9 細胞は、10%FBS を含む RPMI-1640 培地にて維持した。AIDL 細胞は、10%の活性炭処理済み FBS を含むフェノールレッドフリーRPMI-1640 培地にて維持した。

(2) リアルタイム RT-PCR

細胞内の total RNA の抽出は TRIzol (Invitrogen 社) を用い、添付のプロトコルに従って行った。抽出した total RNA を SuperScript III による一本鎖 complementary DNA (cDNA) の合成に使用した。Real-time RT-PCR は、各目的遺伝子特異的プライマーを用いて SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ社) により Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (タカラバイオ社) を使用して行った。各 mRNA の発現量は、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase もしくは β -actin の発現量で補正した。

(3) ウェスタンブロット

調製したサンプルをサンプルバッファーで還元、加熱処理し、Laemmli の方法に従って SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE 後のゲル上タンパク質を PVDF 膜へ転写する方法は、Towbin らの方法により行った。検出は ECL Western Blotting Detection Reagent もしくは ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare 社) を用い、添付のプロトコルに従って行った。

(4) 塩基配列解析

LNCaP, LNCaP-E9, AIDL 細胞の cDNA を鋳型として、アンドロゲン受容体 mRNA の全塩基配列を PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ社) により増幅した。得られた PCR

産物を、GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter 社) を用い、サイクルシーケンス反応を行った後、マルチキャピラリー DNA 解析システム CEQ2000XL (Beckman Coulter 社) にて解析した。

(5) トランスフェクション

アンドロゲン受容体の shRNA プラスミド (SABiosciences 社) のトランスフェクションは、lipofectamine2000 (Invitrogen 社) を用い、添付のプロトコルに従って行った。

4. 研究成果

- (1) アンドロゲン低応答性 LNCaP-E9 細胞およびアンドロゲン抵抗性 AIDL 細胞のアンドロゲン感受性変化の原因

LNCaP 細胞, LNCaP-E9 細胞, AIDL 細胞に各濃度の合成アンドロゲン R1881 を処理した時のアンドロゲン応答性遺伝子 (prostate-specific antigen (PSA), prostatic acid phosphatase (ACPP), FK506 binding protein 5 (FKBP5)) の発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、図 1 に示すように、LNCaP 細胞および LNCaP-E9 細胞で R1881 による各遺伝子の発現量の増加が観察された。また、発現増加の程度は LNCaP 細胞に比べ LNCaP-E9 細胞では低かった。

一方、LNCaP 細胞, LNCaP-E9 細胞および AIDL 細胞の全ての細胞において、ジヒドロテストステロン処理 60 分以内において ERK1/2 のリン酸化が認められた。また、AIDL 細胞では p38MAP kinase リン酸化レベルの亢進が観察された。

次に、LNCaP-E9 細胞および AIDL 細胞のアンドロゲン感受性変化の原因を明らかにする目的で、アンドロゲン受容体およびその共役因子の発現量、アンドロゲン受容体の cDNA 配列、アンドロゲン受容体シグナルに影響を与える Erk1/2, p38MAP kinase, Akt のリン酸化の程度を調べた。その結果、LNCaP-E9 細胞および AIDL 細胞ともにアンドロゲン受容体とその共役因子の発現量は LNCaP 細胞における発現量に比べて大きな違いは認められなかった。一方、LNCaP-E9 細胞では LNCaP 細胞に比べ Akt のリン酸化の程度が著しく低いことが明らかになった。さらに、LNCaP-E9 細胞の Akt リン酸化を血清除去により亢進させた場合、アンドロゲン応答遺伝子 PSA の発現量は増加した。

また、AIDL 細胞では、アンドロゲン受容体のリガンド結合部位に W741C の変異が見つかった。LNCaP 細胞に見られる T877A の変異は AIDL 細胞においても認められた。すなわち、AIDL 細胞のアンドロゲン受容体には W741C と T877A の二重変異が存在していた。LNCaP-E9

細胞および AIDL 細胞のアンドロゲン感受性はこれらにより説明できる可能性が示唆された。

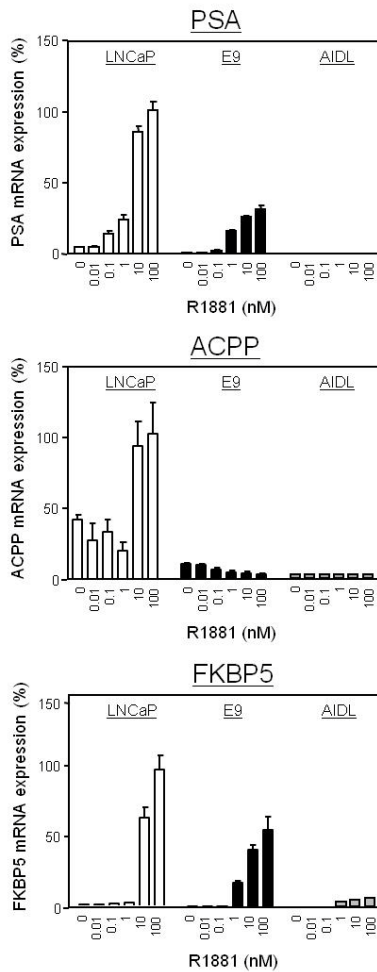


図 1 LNCaP 細胞, LNCaP-E9 細胞および AIDL 細胞のアンドロゲン応答性

(2) アンドロゲン低応答性前立腺癌細胞 LNCaP-E9 細胞のアポトーシスにおけるアンドロゲン受容体の役割について

LNCaP 細胞および LNCaP-E9 細胞のアポトーシスにおけるアンドロゲン受容体の役割を解析する目的で、アンドロゲン受容体に対する shRNA プラスミドをトランスフェクトした細胞におけるアポトーシス抑制因子およびアポトーシス促進因子のタンパク質発現量および mRNA 発現量を、それぞれウエスタンブロット法とリアルタイム RT-PCR 法により調べた。その結果、LNCaP 細胞および LNCaP-E9 細胞ともに、アポトーシス抑制因子である Bcl-2、アポトーシス促進因子である Bad および Bax のタンパク質発現量の変化は観察されなかった。また、mRNA レベルでは、両細胞

ともにアンドロゲン受容体の発現低下に伴う IGF1R 発現低下が観察された。検討した 30 種のアポトーシス関連因子の中で発現量が 2 倍以上変化する遺伝子は IGF1R 以外に認められなかった。また、両細胞間において発現変化パターンに大きな違いがあるものを見出すに至らなかった。なお、アンドロゲン受容体に対する shRNA のトランスフェクトは LNCaP 細胞, LNCaP-E9 細胞ともに mRNA およびタンパク質レベルで約 50% のアンドロゲン受容体発現低下が得られた。

アンドロゲン受容体に対する shRNA 導入によるアンドロゲン受容体の恒常的な発現抑制株取得を試みた。しかしながら、LNCaP-E9 細胞においては LNCaP 細胞と同様、アンドロゲン受容体を十分に発現低下しているクローンは得られなかった。すなわち、アンドロゲン低応答性の LNCaP-E9 細胞においてもアンドロゲン受容体は細胞生存に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

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 5 件)

1. Iguchi, K., Morihara, N., Usui, S., Hayama, M., Sugimura, Y., Hirano, K. Castration- and aging-induced changes in the expression of zinc transporter and metallothionein in rat prostate. *J. Androl.*, **32**, 144-150, 2011, 査読有.
2. Iguchi, K., Tatsuda, Y., Usui, S., Hirano, K. Pamidronate inhibits anti-apoptotic bcl-2 expression through inhibition of the mevalonate pathway in prostate cancer PC-3 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **641**, 35-40, 2010, 査読有.
3. Tatsuda, Y., Iguchi, K., Usui, S., Suzui, M., Hirano, K. Protein kinase C is inhibited by bisphosphonates in prostate cancer PC-3 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **627**, 348-353, 2010, 査読有.
4. Ishii, K., Imamura, T., Iguchi, K., Arase, S., Yoshio, Y., Arima, K., Hirano, K., Sugimura, Y. Evidence that androgen-independent stromal growth factor signals promote androgen-insensitive prostate cancer cell growth in vivo. *Endocr. Relat. Cancer*, **16**, 415-428, 2009, 査読有.
5. Ito, M., Iguchi, K., Usui, S., Hirano, K. Overexpression of thymosin beta4 increases pseudopodia formation in LNCaP prostate cancer cells. *Biol.*

Pharm. Bull., **32**, 1101-1104, 2009, 査読有.

[学会発表] (計1件)

1. Kazuhiro Iguchi, Kazuhiro Fukami, Kenichiro Ishii, Shigeyuki Usui, Yoshiki Sugimura, Kazuyuki Hirano: Characterization of androgen-low sensitive LNCaP subline, LNCaP-E9 cells, International Society for Onco-developmental Biology and Medicine (ISOBM), Sept. 4th-8th, 2010, Munich, Germany.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井口 和弘 (IGUCHI KAZUHIRO)
岐阜薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：10295545

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし