

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592339

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌における Dkk-1 の機能解析及びその治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of Dkk-1 function in castrate-resistant prostate cancer

研究代表者

河野 吉昭 (Kawano, Yoshiaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：30593793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌細胞株を用いて Dkk1 発現をウェスタンブロット法にて確認したところ、去勢抵抗性前立腺癌細胞株である PC-3 の細胞上清中に Dkk1 発現を認めた。去勢感受性前立腺癌細胞株である LNCaP を用いてテトラサイクリン依存性 Dkk1 誘導発現株を樹立した。同細胞を用いて生化学的去勢条件下での培養を行ったところ、Dkk1 誘導発現による去勢抵抗性獲得は認められなかった。一方、PC-3 細胞で siRNA による Dkk1 ノックダウンを行ったところ、boyden chamber での浸潤能低下を認めた。以上から、Dkk1 発現は去勢抵抗性前立腺癌の浸潤能に寄与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Amongst prostate cancer cell lines, we found Dkk1 was expressed in the culture supernatant of castrate-resistant PC-3 cells by western blot. We established LNCaP cell line inducibly expressing Dkk1 in a tetracycline dependent manner. However, those cells did not exhibit castration resistance in vitro by inducible Dkk1 expression. On the other hand, invasion of PC-3 in boyden chamber was significantly inhibited by Dkk1 knockdown by siRNA. These results suggest that Dkk1 expression does not directly contribute to acquisition of castration resistance but is rather involved in invasiveness of castrate resistant prostate cancer cells.

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

1. 研究開始当初の背景

わが国において前立腺癌は急速に増加しているが、アンドロゲン除去療法や抗アンドロゲン療法が有効なホルモン感受性癌と異なり、去勢抵抗性癌 (CRPC) には有力な治療法は確立されておらず、その治療標的の同定が急務である。

Wnt シグナルはリガンドである Wnt がその受容体である Frizzled 及び LRP5/6 と複合体を形成することによって誘導されるシグナル伝達である。Wnt/ β -catenin を介する経路 (canonical pathway) と Rho/JNK を介する経路 (non-canonical pathway) が存在するが、Dickkopf-1 (Dkk-1) は LRP5/6 のみと結合して canonical pathway を選択的に抑制し、Wnt シグナル全体を non-canonical pathway 優位にシフトさせることが考えられている。多くの癌において Dkk-1 が高頻度に高発現しており、同分子の癌進展への積極的関与が示唆されている。

我々の研究グループはこれまでに、(1) Dkk-1 の mRNA が CRPC の細胞株に高発現していること、(2) アンドロゲン依存性前立腺癌由来の細胞株である LNCaP をアンドロゲン除去下にて培養すると non-canonical pathway の活性化が誘導され、これを抑制すると同細胞株は去勢抵抗性を獲得することなくアポトーシスによる細胞死へ誘導されること、(3) 去勢抵抗性前立腺癌由来細胞株では通常の培養条件下ですでに non-canonical pathway が活性化しており、同 pathway の阻害により浸潤能抑制及びアポトーシス誘導が生じること、を報告してきた。これらの結果より、non-canonical pathway の活性化はアンドロゲン依存性前立腺癌が去勢抵抗性を獲得する過程で大変重要な事象であり、この過程において Dkk-1 発現による non-canonical pathway 優位状態への Wnt シグナルのシフトが関与しているという仮説を立てた。

2. 研究の目的

Dkk-1 発現が去勢抵抗性獲得、抗アポトーシス、浸潤・転移といった前立腺癌進展における重要な現象に大きく関与していることを分子生物学的及び細胞生物学的手法を用いて確認する。

Rho/JNK pathway やその他の細胞内シグナル伝達が Dkk-1 によって前立腺癌細胞で活性化されるかどうかを検証する。

Dkk-1 により前立腺癌が去勢抵抗性を獲得できるか否か、またその他の癌進展に関与する事象に影響を及ぼすかどうかを検証する。

3. 研究の方法

生化学的手法を用いて、各種前立腺癌細胞株における Dkk-1 及びその受容体である LRP5/6 の発現を検討した。前者は分泌蛋白であるため、無血清培地に StrataClean Resin (Stratagene) を添加し、吸着・濃縮をおこなった。後者は RIPA buffer による cell lysate を用いた。検出には Western Blot 法を用いた。

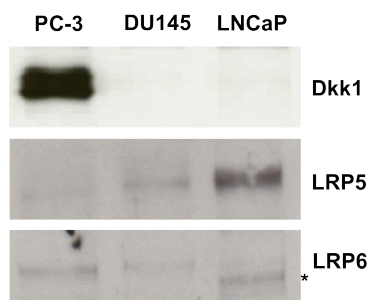
テトラサイクリン誘導性発現システムを用いて、申請者によって樹立されたテトラサイクリン受容体発現株 (LNCaP/TR2、Kawano *et al.*, Oncogene 2006) を用いて、同細胞株にテトラサイクリン調節配列を有する Dkk-1 誘導発現ベクターを stable transfection することにより、去勢感受性前立腺癌細胞株である LNCaP の Dkk-1 誘導発現株を作成した。この細胞を用いて Dkk-1 発現による去勢抵抗性獲得の有無、Rho/JNK pathway やその他の細胞内シグナル伝達の活性化の有無、Wnt/ β -catenin シグナルへの影響について検討した。去勢抵抗性獲得の有無については、10%活性炭処理済胎児ウシ血清入り培地を用いた培養条件による colony formation assay を行った。各種シグナルへの影響についてはリン酸化抗体などを用い

た Western Blot 法 (WB 法) により評価を行った。

Dkk-1 発現 CRPC 細胞株に Dkk-1 siRNA を導入し、細胞増殖・浸潤能への影響について検討した。前者は colony formation assay により、後者は boyden chamber による invasion assay により評価した。

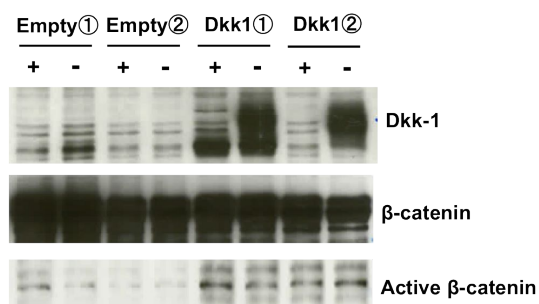
4. 研究成果

Fig.1 前立腺癌細胞株における Dkk-1 及びその受容体の発現



CRPC 細胞株である PC-3 の細胞上清中に Dkk1 蛋白の発現を認めた。一方、もう一つの CRPC 細胞株である DU145 と去勢感受性前立腺癌細胞株の LNCaP では Dkk1 蛋白の発現を認めなかった。Dkk1 受容体である LRP5/6 については全ての細胞株で発現を認め、LRP5 の発現量は LNCaP>DU145>PC3 の順で、LRP6 発現量は PC3>DU145>LNCaP の順となっており、相互に逆相関の関係となっていた。

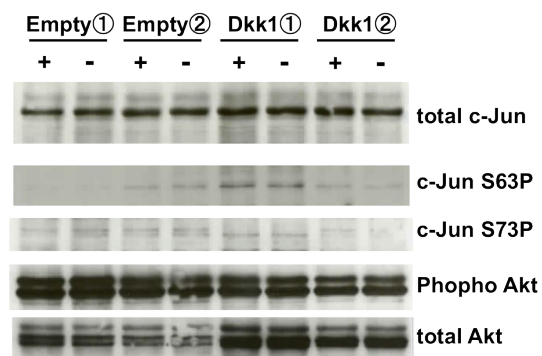
Fig.2. LNCaP 細胞を用いた Dkk-1 誘導発現株の樹立



LNCaP を用いてテトラサイクリン依存性 Dkk1 誘導発現株を樹立した。上記 WB 法により、

2つのクローンにおいてドキシサイクリンによる Dkk1 の誘導発現を認めた。これまでの文献上の報告と異なり、この細胞では Dkk1 誘導発現による活性化 β -catenin 蛋白量の低下を認めなかった。

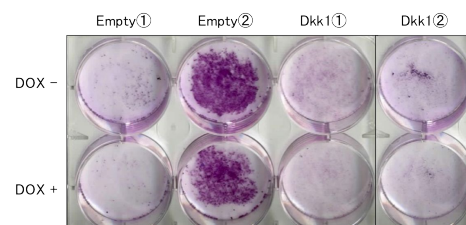
Fig.3. Dkk-1 誘導発現による c-Jun と Akt のリン酸化の評価



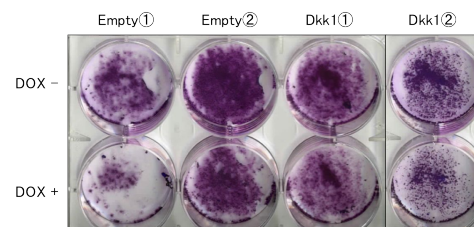
上記 Dkk1 誘導発現株を用いて JNK の活性化を、c-Jun のリン酸化抗体を用いて評価した。C-Jun Serine63 及び 73 のいずれにおいても、Dkk1 誘導発現によるリン酸化亢進を認めなかった。また PI3K 及び ERK の活性化を Akt 及び ERK1/2 のリン酸化抗体によって評価したが、いずれも Dkk1 誘導発現によるリン酸化亢進を認めなかった (Akt リン酸化のみ示す)。

Fig.4. Dkk1 誘導発現による LNCaP 細胞増殖への影響の評価

a. 10% CSS 入り培地



b. 10%FCS 入り培地



生化学的去勢条件下にて Dkk-1 誘導発現株を用いた colony formation assay を行ったところ、Dkk1 誘導発現による colony formation に変化を認めなかった。また通常培養条件下においても、Dkk1 誘導発現は colony formation に影響を及ぼさなかった。

Fig.5. Dkk1 ノックダウンによる PC-3 細胞への影響

a. siRNA を用いた PC-3 細胞での Dkk1 ノックダウン

Ctrl si Dkk1 si rDkk1

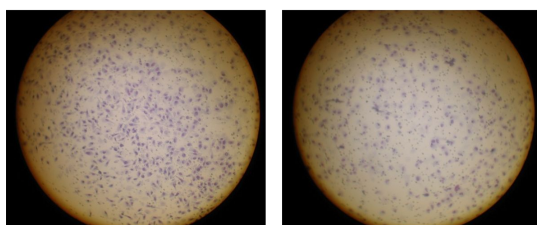


PC-3 細胞への siRNA 導入により、Dkk-1 ノックダウンが可能であった。

b. Dkk1 の PC-3 細胞浸潤能への関与の評価

Control siRNA

Dkk1 siRNA



Dkk1 ノックダウンにより、PC-3 細胞の浸潤能の低下を認めた。Dkk1 ノックダウンにて明らかな細胞形態の変化を生じなかったため、Dkk1 は細胞外マトリックス分泌やその活性を安定化させることにより、PC-3 細胞の浸潤能に寄与する可能性が示唆された。

結果のまとめ：

Dkk1 が前立腺癌の去勢抵抗能獲得へ関与するというを示す実験上のデータは得られなかったが、同分子が CRPC の浸潤能に関与していることが示唆された。今後は同分子が浸潤能に寄与する分子機序について解析を進めたいと考えている。

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 4 件)

(1) Diana Romero^{*}, Yoshiaki Kawano^{*}, Nora Bengoa, Marjorie M. Walker, Nicole Maltry, Christof Niehrs, Jonathan Waxman and Robert Kypta. Downregulation of Dickkopf-3 disrupts prostate acinar morphogenesis through TGF- β /Smad signaling. *J Cell Sci.* 126:8 1858-1867. 2013 (査読あり)

(2) Hidetoshi Nitta, Yoshihiro Wada^{*}, Yoshiaki Kawano^{*}, Yoji Murakami, Atsushi Irie, Keisuke Taniguchi, Ken Kikuchi, Gen Yamada, Kentaro Suzuki, Jiro Honda, Masayo Wilson-Morifuji, Norie Araki, Masatoshi Eto, Hideo Baba and Takahisa Imamura. Enhancement of human cancer cell motility and invasiveness by anaphylatoxin C5a via aberrantly expressed C5a-receptor (CD88). *Clin Cancer Res.* 19:8 2004-2013. 2013 (査読あり)

(3) Siobhan Darrington R, Campa VM, Walker MM, Bengoa-Vergniory N, Gorrone-Etxebarria I, Uysal- Onganer P, Kawano Y, Waxman J, Kypta RM. Distinct expression and activity of GSK-3 and GSK-3 in prostate cancer. *Int J Cancer.* 131:6 E872-E883. 2012 (査読あり)

(4) Wada Y, Uchiba M, Kawano Y, Kai N, Takahashi W, Honda J, Tanoue K, Maeda Y, Murakami Y, Eto M, Imamura T. Severe bleeding tendency caused by a rare complication of excessive fibrinolysis with disseminated intravascular

coagulation in a 51-year-old Japanese man with prostate cancer: a case report. J Med Case Rep.19:4 284-295.2012 (査読あり)

[学会発表](計 12 件)

(1) Yoshiaki Kawano, Masatoshi Eto Wnt/ β -catenin signalling pathway is a potential target for prostate cancer. 第 72 回日本癌学会学術総会 (2013 年 10 月 3-5 日 パシフィコ横浜 横浜)

(2) Yoshiaki Kawano, Masatoshi Eto, Robert Kypta. Loss of Dickkopf-3 expression impairs prostate acinar morphogenesis via aberrant TGF- β /SMAD signalling activation. American Urological Association 2013 Annual Meeting. (2013 May 4-8 San Diego, USA)

(3) 河野吉昭 江藤正俊 前立腺癌細胞における β -catenin の生物学的意義 第 101 回日本泌尿器科学会総会 (2013 年 04 月 25 - 28 日 ロイトン札幌 札幌)

(4) Yoshiaki Kawano, Masatoshi Eto, Robert Kypta. Loss of Dickkopf-3 expression impairs prostate acinar morphogenesis via aberrant TGF- β /Smad signalling activation. 28th European Association of Urology Annual Congress (2013 March 15-19 Milan, Italy)

(5) Yoshiaki Kawano, Masatoshi Eto, Robert Kypta. Crucial role of Dickkopf-3 in prostate morphogenesis in vitro and in vivo. 第 71 回日本癌学会学術総会 (2012 年 09 月 19-21 日 ロイトン札幌 札幌)

(6) Yoshiaki Kawano, Masatoshi Eto, Robert Kypta. Crucial role of Dickkopf-3 in prostate morphogenesis in vitro and in vivo. [American Urology Association 2012 Annual Meeting] (2012 May 19 - 23 Atlanta, USA)

(7) 河野吉昭 江藤正俊 Robert Kypta 正常前立腺上皮細胞の増殖抑制及び腺房構造維持における Dkk-3 の生物学的意義 第 100 回日本泌尿器科学会総会 (2012 年 04 月 21 - 24 日 パシフィコ横浜 横浜)

(8) Yoshiaki Kawano, Masatoshi Eto, Robert Kypta. Crucial role of Dickkopf-3 in prostate morphogenesis in vitro and in vivo. 27th European Association of Urology Annual Congress (2012 Feb 24-28 Paris, France)

(9) 河野吉昭 江藤正俊 Robert Kypta 前立腺上皮細胞の増殖及び腺構造形成における Dickkopf-3 の生物学的意義. 第 21 回泌尿器科分子・細胞研究会 (2012 年 02 月 10-11 日 北海道大学医学部 札幌)

(10) 河野吉昭 江藤正俊 Robert Kypta Crucial role of Dickkopf-3 in prostate cell proliferation and morphogenesis. 第 70 回日本癌学会総会 (2011 年 10 月 3 - 5 日 名古屋国際会議場 名古屋)

(11) Yoshiaki Kawano, Masatoshi Eto, Robert Kypta. Secreted Frizzled-related Protein-1 is a negative regulator of Androgen Receptor. American Urological Association 2011 Annual Meeting. (2011 May 14 - 19 Washington DC, USA)

(12) 河野吉昭 江藤正俊 Robert Kypta

正常前立腺上皮細胞の増殖抑制及び腺房構造維持における Dickkopf-3 の生物学的意義 第 99 回日本泌尿器科学会総会 (2011 年 04 月 21-24 日 名古屋国際会議場 名古屋)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

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

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/urology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 吉昭 (KAWANO YOSHIAKI)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：30593793

(2) 研究分担者

江藤 正俊 (ETO MASATOSHI)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：90315078

(3) 連携研究者

()

研究者番号：