

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月1日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791487

研究課題名(和文) ラット前立腺癌モデル由来細胞株による前立腺癌転移モデルの確立とその機能解析

研究課題名(英文) Establishment of new prostate cancer metastatic model with androgen independent growth and identification of new mechanism of androgen-independency

研究代表者

内木 拓 (NAIKI TAKU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医

研究者番号：50551272

研究成果の概要(和文)：

トランスジェニックラットから新しく樹立した細胞株PCa11は、ヌードマウスへの移植で、リンパ節転移・肺転移を安定的に起こした。これにより、新たなホルモン療法抵抗性転移動物モデルの確立に成功した。

そこで、ホルモン療法抵抗性獲得前後で遺伝子解析を行い、発現上昇を認める遺伝子 Glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) に新たに着目し、機能解析を行った。siRNA を用いた解析で、GST-Pi は前立腺癌の細胞増殖に関わることが分かり、この遺伝子は骨転移の治療標的遺伝子となりうることを見出した。

研究成果の概要(英文)：

We established androgen-independent prostate cancer cell line from TRAP tumor, and named PCa11, and previously reported the orthotopic metastatic models, and tail vein injection model using PCa11 cells. We investigate the GST-P expression of PCa11 by RT-PCR and Western blot. In addition, using GST-P-siRNA, we investigated the relationship between the cell growth and Reactive Oxygen Species (ROS) in PCa11. PCa11 cells had higher GST-P expression in mRNA and protein levels in Charcoal Stripped-FBS medium than in normal medium. GST-P knocked down by siRNA resulted in significant decrease of the proliferation rate *in vitro*. On the contrary, DCFH assay revealed that ROS was induced by GST-P-siRNA treat. Tumors metastasized in the bone marrow after intravenous injection expressed high levels of GST-P, while metastatic lesions in the lung and lymph nodes failed to express GST-P as seen in the case of the orthotopic implantation. GST-P might have the important roles in the prostate cancer growth and metastasis by the restriction of ROS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：去勢抵抗性前立腺癌、転移動物モデル、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

ホルモン療法は前立腺がんの標準治療のひとつであるが、治療開始後約2年でホルモン療法抵抗性前立腺がんへと移行し骨へと転移するため、その増殖機構の解明に基づいた新たな治療法の開発が急務である。前立腺がんの骨転移メカニズムに関しては不明な点が多く、ヒトの病態を良く模倣した、安定的に骨に転移を起こす動物モデルはほとんどない。ホルモン療法が効かなくなり、転移へと至る過程を個体レベルで模倣し、遺伝子やタンパクの発現及び機能変化を、経時的にとらえることは、前立腺がんの骨転移メカニズムの解析に重要であると考えられる。これらを踏まえ、本研究では、新たな実験モデルの確立を試みると共に、その機能解析により新しいホルモン療法抵抗性前立腺がん治療の開発に向けた基礎研究を行う。

2. 研究の目的

三大生活習慣病の一つである「がん」は、1981年にわが国の死亡原因の第一位となって以来、死亡者数が増え続けている。中でも前立腺がん患者は欧米並みに急増しており、その対策は緊急課題である。前立腺がんの治療は、男性ホルモンを抑えるホルモン療法であるが、一定の時期を経ると効果がなくなる。これを「ホルモン療法抵抗性」と呼び、最終的には骨などに転移して死にいたる。前立腺がんがホルモン療法抵抗性となり、進行していく過程には不明な点が多くあるが、その病態を解明するためのモデルは非常に稀である。そこで私たちは、以前樹立した前立腺がんラットモデルから、新しくホルモン療法抵抗性前立腺がん細胞株を樹立した。そして、この細胞株が転移能を有することが確認できた。そこで本研究では、この細胞株を用いてホルモン療法抵抗性前立腺がん転移動物モデルを確立し、未解明だった転移メカニズムの解析を行うとともに、新しい治療法の開発を試みる。

3. 研究の方法

日本エスエルシー株式会社から購入した、10週令 KSN nu-nu 雄ヌードマウスを用いる。アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 PCa11 を、十分な麻酔下で、前立腺同所移植と尾静脈投与を行う。前立腺同所移植では 5×10^5 個、尾静脈投与では 3×10^7 個の細胞を、各マウスに移植する。前立腺癌の発生・進展・転移が除勢によってどのように変化するかを、肉眼像およびホルマリン固定標本にて確認する。腫瘍の大きさや転移の程度に関して、

除勢術の与える影響を、腫瘍およびマウスの前立腺・骨・肺・肝・腎・リンパ節で検索する。前立腺癌化学予防および進展防止物質の検討に用いることのできるモデルとして確立する。これまで前立腺がん転移病変の形成メカニズムにおいて着目されてきた TGF- β や IGF などの増殖因子や、転移形成に重要な役割を果たしているといわれる PTHrP、RANKL、そして前立腺がんにおいて、ホルモン療法抵抗性獲得に深くかかわっている事を、以前私たちが報告した、GST-P 等に注目して、新たに転移形成のメカニズムの解析を行っていく。さらに、ホルモン療法獲得の前後のがんで網羅的遺伝子解析を行い、発現差のあった遺伝子に着目し、定量的 RT-PCR にて mRNA 発現レベルを確認するとともに、免疫染色やウェスタンブロット法によりタンパクレベルの発現を確認する。それらの遺伝子がどのようにホルモン療法抵抗性前立腺がんの増殖・進展に関わっているかを、siRNA を用いて機能解析を行う。これらの遺伝子を分子標的治療の標的遺伝子として用いることで病変の進行を止めることができるかを、本モデルで詳細に検討する。

4. 研究成果

(1) 樹立した前立腺癌高発現トランスジェニックラットのホルモン療法依存性癌を、去勢術をおこなったヌードマウス皮下に移植継代を繰り返すことで、ホルモン療法抵抗性可移植腫瘍を作成した。そこから新たにアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 PCa11 を樹立し、*in vitro* でのアンドロゲンレセプターの発現、およびアンドロゲン刺激による細胞増殖能を WST-1 アッセイにて評価した。さらに、去勢術を行ったヌードマウスへ細胞株 PCa11 の移植を行い、その増殖能・転移能を評価した。(2) 今回作成した可移植腫瘍がホルモン療法抵抗性を獲得する前後で cDNA マイクロアレイを行い、発現差を認め、酸化ストレス応答遺伝子 Glutathione S-transferase Pi (Gst-pi) に着目して機能解析を行った。PCa11 において、*in vitro* で Gst-pi siRNA をトランスフェクションし、Gst-pi の発現を特異的に抑制することで、細胞増殖に与える影響と細胞内 ROS の量を、DCFH アッセイを用いて行った。さらに Gst-pi 特異的抑制剤であるエタクリン酸を投与し、同様に細胞増殖活性と細胞内 ROS を定量した。(3) Gst-pi siRNA をトランスフェクションした PCa11 を、去勢術施行及び未施行のヌードマウスにそれぞれ皮下移植し、造腫瘍性を検討した。さらに、PCa11 のヌードマウス移植

によって生じる転移性病変に関して、Gst-pi の発現を免疫組織学的に検討した。

【結果】(1) PCa1 はアンドロゲンレセプターの発現を認め、*in vitro*において、アンドロゲン除去培地でも安定的に増殖し、アンドロゲン添加によってその増殖能は促進された。PCa1 における Gst-pi のタンパク発現レベルは、アンドロゲンのない環境で促進された。これにより、PCa1 は、ホルモン療法に感受性のある、アンドロゲン非依存性前立腺癌の特徴を有することが分かった。*in vivo*においては、PCa1 は去勢術後のヌードマウスの皮下移植によって、100%造腫瘍性を認めた。そして、ヌードマウスの前立腺に PCa1 を移植すると、100%腫瘍を形成し、さらにリンパ節・肺に高頻度に転移を認めた。その転移頻度は去勢術後のマウスでも同様であった。また、PCa1 のヌードマウス尾静脈投与にて、肺転移に加え、高頻度に骨転移も認めた。それらの病変を病理学的に検討すると、ヒトの前立腺癌病巣や転移病巣と類似したものであった。(2) *in vitro*において PCa1 で、siRNA を用いて Gst-pi 発現を抑制すると、細胞増殖は有意に抑制され、その場合の細胞内 ROS は有意に上昇した。さらに、エタクリン酸投与においても同様の結果を、濃度依存的に認めた。(3) Gst-pi siRNA をトランスフェクションした PCa1 を、去勢術を施行したヌードマウスに移植すると、ネガティブコントロール群と比較して、その腫瘍増殖が有意に抑制された。対照的に、去勢術未施行のヌードマウスでは腫瘍増殖に差を認めなかった。免疫組織学的に検討すると Gst-pi は、去勢術後の腫瘍で発現の亢進を認めた。さらに、PCa1 の移植によって生じる転移臓器毎で、免疫組織学的に検討すると、リンパ節転移巣、肺転移巣では Gst-pi の発現を認めなかったが、骨転移巣では強く発現を認めた。

【考察】前立腺癌がホルモン療法抵抗性となり、転移をする過程を再現した動物モデルの樹立に成功した。出現する転移病変は病理学的にヒトのそれと類似しているため、癌の進展予防物質などの評価に有用であると思われる。さらにその解析にて、ホルモン療法抵抗性前立腺癌には、Gst-pi の発現レベルを調節することで、細胞内酸化ストレスを制御し、増殖を促進するメカニズムが存在することが新たに分かった。Gst-pi は診断マーカーとなりうるのみならず、分子標的治療のターゲット遺伝子ともなりうる可能性があり、骨転移巣で Gst-pi の発現が高いことから、骨転移の治療に有用であると思われる。

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3件)

- ① Naiki T, Asamoto M, Toyoda-Hokaiwado N, Naiki-Ito A, Tozawa K, Kohri K, Takahashi S, Shirai T : Organ specific Gst-pi expression of the metastatic androgen independent prostate cancer cells in nude mice. The Prostate 2011, Jul 11. (査読有)
- ② Naiki T, Okamura T, Nagata D, Mori Y, Kawai N, Ogawa K, Akita H, Hashimoro Y, Tozawa K, Kohri K : Preoperative Prediction of Neurovascular Bundle Involvement of Localized Prostate Cancer by Combined T2 and Diffusion-weighted Imaging of Magnetic Resonance Imaging, Number of Positive Biopsy Cores, and Gleason Score. Asian Pac J Cancer Prev 2011; 12: 909-13 (査読有)
- ③ Sato S, Takahashi S, Asamoto M, Naiki T, Naiki-Ito A, Asai K, Shirai T : Tranilast suppresses prostate cancer growth and differentiation in vivo and in vitro. The Prostate 2010; 70: 229-38 (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

- ① Naiki T, Asamoto M, Naiki A, Kawai N, Tozawa K, Kohri K : Glutathione oxidation-reduction system facilitates androgen independent prostate cancer growth. 第70回日本癌学会総会、2011.10.3-5、名古屋市
- ② 内木 拓 朝元 誠人 内木 綾 小島 祥敬 河合 憲康 戸澤 啓一 白井 智之 郡 健二郎 : 再燃前立腺癌における酸化ストレス応答因子の役割. 第99回日本泌尿器科学会総会、2011.4.21-24、名古屋市
- ③ Naiki T, Asamoto M, Naiki-Ito A, Tozawa K, Kohri K, Shirai T : Metastatic site specific different expression of GST-P in new androgen independent prostate cancer cells from TRAP model. 第69回日本癌学会学術総会シンポジウ

ム、2010.9.22-24、大阪市

- ④ 内木 拓 朝元 誠人 内木 綾 戸澤
啓一 白井 智之 郡 健二郎：ラット
前立腺癌モデル由来細胞株によるアン
ドロゲン非依存性前立腺癌転移モデル
の確立

第 98 回日本泌尿器科学会総会、
2010.4.27-30、盛岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内木 拓 (NAIKI TAKU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研
究医

研究者番号：50551272