様式Ｆ－１９

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成２５年４月１日現在

機関番号：２０１０１
研究種目：若手研究（Ｂ）
研究期間：2011～2012
課題番号：２３７９１７６５
研究課題名（和文）　前立腺神経内分泌細胞による前立腺癌進展機構の解明

研究課題名（英文）　The secretions from neuroendocrine cell promotes gelsolin-mediated motility of prostate cancer

研究代表者
橋本　浩平（HASHIMOTO　KOHEI）
札幌医科大学・医学部・訪問研究員
研究者番号：４０４０４６７８

研究成果の概要（和文）：
本研究は前立腺神経内分泌細胞による前立腺癌のゲルゾリンを介する進展機構を明らかにすることが目的である。上皮成長因子(EGF)の刺激により前立腺神経内分泌細胞から分泌される神経内分泌(NE)因子の一つニューロテンシンが、前立腺癌細胞においてその受容体を介しホスホリパーゼ C を刺激・細胞内カルシウムを動員し、その結果ゲルゾリンの発現亢進、細胞内骨格の変形を誘導し、浸潤能を亢進させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：
The purpose of this study was to investigate the interactions between NE cells and LNCaP cells and the involvement of gelsolin in contributing to invasive potential of LNCaP cells. The present study indicates that neuroendocrine (NE) cells and neurotensin induced gelsolin-mediated motility of LNCaP cells through NTSR1 activation involving phospholipase C- intracellular calcium ion mobilization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：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：前立腺癌、神経内分泌細胞、去勢抵抗性、ゲルゾリン、進展

１．研究開始当初の背景

近年増加の一途をたどる前立腺癌において、アンドロゲン除去を目的としたホルモン(去勢)療法は有効な治療法の一つであるが、治療経過中にホルモン療法に抵抗性を示す去勢抵抗性前立腺癌に発展することが問題となっている。抵抗性を獲得すると急速に腫瘍が進展し癌死にいたってしまう。そのため抵抗性獲得・進展のメカニズムを解明し、治療戦略の構築やその発展を予測し未然に防ぐ取り組みが必要である。

去勢抵抗性獲得のメカニズムの一つとして併存する神経内分泌細胞の関与が示唆されている。前立腺神経内分泌細胞は前立腺上皮細胞の一つであり、biogenic amines や成長因子などの神経内分泌因子(NE 因子)を分泌している。NE 因子は、正常組織において自己分泌、傍分泌的に前立腺の恒常性を維持していると

考えられるが、癌組織においての役割は未だ不明である。申請者らはこれまで、前立腺神経内分泌から分泌されるNE因子が、アンドロゲン感受性ヒト前立腺癌細胞株LNCaPのホルモン非依存性増殖能の獲得、ならびにLNCaPの浸潤、転移能の亢進に関与していることを見出した。DNAマイクロアレイ法によりLNCaPにおける強発現を示す遺伝子としてゲルゾリンを同定した。

ゲルゾリンはカルシウム依存性のアクチン調整蛋白であり、細胞内骨格の構築に関与している。癌組織におけるゲルゾリンの役割は不明であるが、乳癌、非小細胞性肺癌、子宮頸癌ではその発現と予後不良の関係が示唆されている。これらのことから前立腺癌の進展機構において、神経内分泌細胞より分泌されたNE因子が、前立腺癌細胞のゲルゾリンを介した浸潤能に影響を及ぼす可能性が推察される。

ニューロテンシンは消化管に分布するニューロペプチドでありNR因子の一つである。消化管の運動調整に関与し、ニューロテンシン受容体を介してホスファチジルイノシトールのリン酸化による細胞内カルシウムの動員が、主なシグナル伝達経路と考えられている。このカルシウム動員の機序が、NE因子による前立腺癌のゲルゾリンを介する機序に関わっている可能性が示唆される。

２．研究の目的

本研究はNE因子が前立腺癌のゲルゾリンを介した進展メカニズムへ及ぼす影響を明らかにし、去勢抵抗性前立腺癌における予後予測・治療応用へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。

３．研究の方法

(1)前立腺癌細胞モデルとしてアンドロゲン感受性ヒト前立腺癌細胞株LNCaP細胞を、神経内分泌細胞モデルとして当教室で樹立したマウス前立腺神経内分泌細胞株NE-CS細胞を用いた。RPMI培養液を用い、37℃、5%CO2環境下で培養した。実験に沿ってウシ血清FBS10%および無血清(0.1%アルブミン:BSA)および成長因子を加えた。

(2)NE-CS細胞におけるニューロテンシンの発現を検討するため、ニューロテンシンmRNAはRT-PCR法にて検討した。EGF10ng/mlを添加した無血清培地下でNE-CS細胞を培養し、48時間RNAを抽出し、ニューロテンシン、コントロールとしての内在因子GAPDHに対するそれぞれプライマー：5’-GTGTGGACCTGCTTGTCAGA,5’-TGCTTTGCTGATCTTGATG、5’-TACAGCAACAGGGTGGTGGA,5’-ACCACAGTCCATGCCATCACを用いてmRNA発現を検討した。

(3)NE-CS細胞の培養上清によるLNCaP細胞におけるゲルゾリン遺伝子の発現検討に、real-timePCR法を用いた。血清培地および無血清培地でのNE-CS細胞培養上清とNE-CS細胞なしでの培地にてLNCaP細胞を6時間培養し、RNAを抽出後ゲルゾリンの発現を比較検討した。無血清培地ではそれぞれ成長因子：上皮成長因子(EGF)10ng/ml、神経成長因子(2.5S-NGF)10ng/ml、トランスフォーミング増殖因子(TGFβ)10ng/ml、インスリン様成長因子(IGF)100ng/mlを添加して検討した。

(4) NE-CS細胞およびLNCaP細胞培養上清中のニューロテンシン濃度はニューロテンシンEIAキットを用いて検討した。無血清培地下で48時間培養した上清を用いた。

(5) NE-CS細胞の培養上清およびニューロテンシンによるLNCaP細胞におけるゲルゾリンの発現および形態的変化は蛍光免疫染色を用いて検討した。EGF10ng/mlを添加または無添加の無血清培地下でのNE-CS細胞培養上清およびニューロテンシン0.5ng/mlでLNCaP細胞を24時間培養した後、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、一次抗体としてウサギ抗ゲルゾリン抗体、マウス抗βアクチン抗体、二次抗体としてAlexa Fluor 488抗ウサギ抗体、抗マウスCy3抗体を用いた。核はDAPIにて染色し、蛍光顕微鏡にて形態的変化を検討した。

(6)LNCaP細胞においてゲルゾリン遺伝子のノックダウンはRNA干渉法を用いた。ゲルゾリン遺伝子をターゲットとしたsiRNA Trioカクテル(①5’-CCAACGAGGUGGUGGUGCA[dT],
5’-UGCACCACCACCUCGUUGG[dT],　②
5’-GGAAAGGCAAGCAGGCAAA[dT],
5’-UUUGCCUGCUUGCCUUUCC[dT],　③
5’-CAACAAGAUUGGACGUUUU[dT],
5’-AAAACGUCCAAUCUUGUUF[dT]) と、何も干渉しないコントロールとしてのsiRNA(5’-ATCCGCGCGATAGTACGTA)をそれぞれLNCaP細胞に導入し、siGel-LNCaPおよびsiCont-LNCaPを作成した。ノックダウン効率はreal-timePCR法およびWesternblot法で確認した。

(7)LNCaP細胞の浸潤能解析には8μmのポアサイズトランスチャンバーを用いて評価した。上室の底に10μgのマトリジェルと下面に5μgのファイブロネクチンを添加した。24時間で上室から下室へ浸潤によりポアを通過する細胞数を1000個あたりの割合をinvasion indexとして計算した。ニューロテンシンの濃度変化によるLNCaP細胞の浸潤能

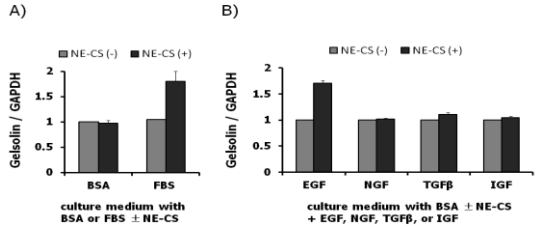
の変化では、無血清培地下にてニューロテンシン 0.1-20ng/ml にて評価した。LNCaP 細胞のゲルゾリンを介する浸潤能について、siCont-LNCaP および siGel-LNCaP を用いて、無血清培地に EGF10ng/ml の添加の有無で検討した。下室に NE-CS 細胞または NE-CS 細胞なしでニューロテンシン 0.5ng/ml を添加し 48 時間培養した後、上室に siCont-LNCaP または siGel-LNCaP を入れ、invasion index を評価した。

(8)ニューロテンシン受容体(NTSR1)、ゲルゾリンの蛋白質レベルの発現について、westernblot 法にて評価した。EGF10ng/ml 添加無血清培地下での NE-CS 培養上清およびニューロテンシン 0.5ng/ml にて LNCaP 細胞を 48 時間培養した後、電気泳動用ライセートサンプルを作成し、SDS-PAGE にて電気泳動後、polyvinylidene difluoride(PVDF)膜に転写した。転写膜における NTSR1、ゲルゾリン、βアクチンをそれぞれの抗体を用いて描出した。

４．研究成果

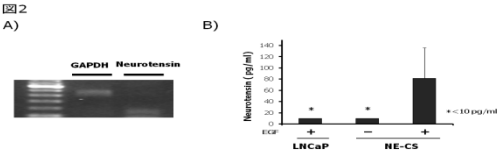
(1) NE-CS 細胞の培養上清が LNCaP 細胞のゲルゾリン発現に及ぼす影響について検討した。LNCaP 細胞のゲルゾリン遺伝子は、血清培地下(FBS 添加)にて培養された NE-CS 細胞の培養上清では、NE-CS 細胞なしの培養液で培養した時と比較して発現が亢進した(図 1A)。一方で、無血清培地下(BSA 添加)にて培養された NE-CS 培養上清では、LNCaP 細胞のゲルゾリン遺伝子の発現は亢進しなかった。無血清培地に成長因子を添加した NE-CS 培養上清では、上皮成長因子(EGF)10ng/ml を添加した無血清培地下でのみ LNCaP 細胞のゲルゾリン遺伝子の発現は亢進した(図 1B)。この結果から、EGF 存在下において NE-CS 細胞より分泌される NE 因子により LNCaP 細胞のゲルゾリンの発現が亢進することが明らかとなった。

図1



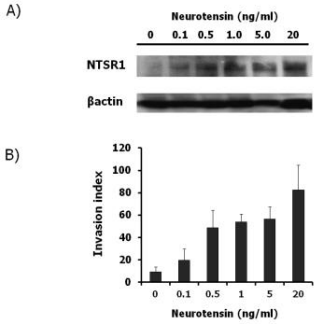
(2)NE-CS 細胞におけるニューロテンシンの発現を検討した。NE-CS 細胞にてニューロテンシンの発現を確認した(図 2A)。EGF10ng/ml を添加した無血清培地下での NE-CS 細胞の培養上清中のニューロテンシン濃度は 81.3±54.8pg/ml であった(図 2B)。EGF を添加しなかった無血清培地下および、LNCaP 細胞の培養上清中にはニューロテンシンを確認できなかった。

図2



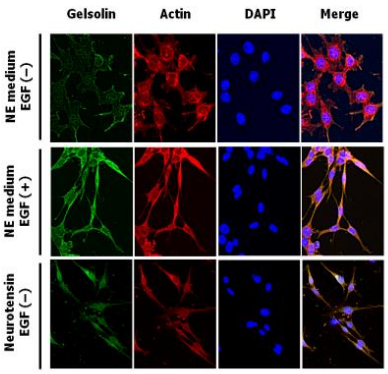
(3) LNCaP 細胞におけるニューロテンシン受容体(NTSR1)の発現および浸潤能を検討した。無血清培地下での LNCaP 細胞における NTSR1 の発現はニューロテンシンの濃度に依存して亢進した(図 3A)。LNCaP 細胞の浸潤能もニューロテンシンの濃度に伴い亢進した(図 3B)。

図3



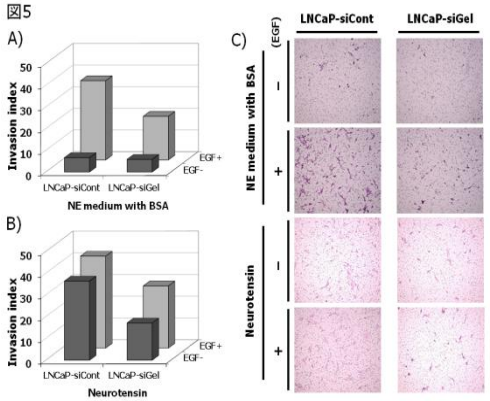
(4)NE-CS 細胞の培養上清およびニューロテンシンによる LNCaP 細胞の形態学的変化を検討した。EGF10ng/ml を添加した無血清培地下での NE-CS 培養上清により、LNCaP 細胞 におけるゲルゾリンの発現が亢進し、細胞の形態学的変化(扁平、突出化)が生じた(図 4)。同様の変化は、EGF を添加しない無血清培地にニューロテンシン 0.5ng/ml を加えた場合にも生じた。この結果より、EGF 存在下にて NE-CS 細胞より分泌された NE 因子およびニューロテンシンにて LNCaP 細胞のゲルゾリンを介したアクチンダイナミックスに影響を及ぼし、細胞骨格が再構築されることを確認した。

図4



(5) NE-CS 細胞の培養上清およびニューロテンシンによる LNCaP 細胞のゲルゾリンを介する浸潤能への影響を検討するため、ゲルゾリン遺伝子をノックダウンした siGel-LNCaP とコントロール siRNA を導入した siCont-LNCaP を作成した。mRNA、蛋白レベルで 60%以上のノックダウン効率を確認した。siGel-LNCaP と siCont-LNCaP の浸潤能を比較検討した。EGF10ng/ml を添加した無血清培地下での NE-CS 細胞培養上清存在下において、EGF を添加しなかった NE-CS 細胞培養上清と比較して、siCont-LNCaP の浸潤能は亢進した。siGel-LNCaP において、EGF10ng/ml を添加した無血清培地下での NE-CS 細胞培養上清下において、siGel-LNCaP の浸潤能は siCont-LNCaP と比較して抑制された(図 5A,C)。ニューロテンシン 0.5ng/ml を添加した無血清培地下において、EGF 添加の有無に関わらず siCont-LNCaP の浸潤能は亢進し、siGel-LNCaP で抑制された(図 5B,C)。この結果から、EGF 存在下にて NE-CS 細胞より分泌された NE 因子およびニューロテンシンにて LNCaP 細胞のゲルゾリンを介した浸潤能が亢進することが明らかとなった。

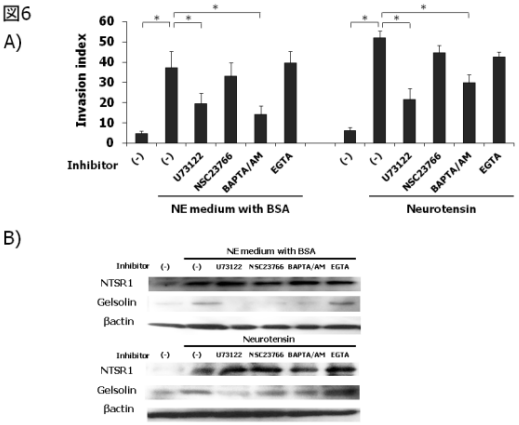
図5



(6) NE-CS 細胞の培養上清およびニューロテンシンによる LNCaP 細胞のゲルゾリンを介する浸潤能への影響を及ぼす機序を検討した。EGF10ng/ml を添加した無血清培地下での NE-CS 培養上清にて亢進した LNCaP 細胞のゲルゾリンの発現および浸潤能は、PLCγ阻害薬および細胞内カルシウムキレート剤 BAPTA/AM により阻害された。Rac1 阻害薬および細胞外カルシウムキレート剤 EGTA では阻害されなかった(図 6A,B)。ニューロテンシン 0.5ng/ml を添加した無血清培地下での LNCaP 細胞のゲルゾリンの発現および浸潤能も同様、PLCγ阻害薬および細胞内カルシウムキレート剤 BAPTA/AM により阻害された(図 6A,B)。以上の結果から、NE 因子によるゲルゾリンを介する浸潤能亢進の機序の一つとして PLCγ-細胞内カルシウムの動員が示唆され、NE 因子の一つであるニューロテンシンにより再現されることを確認した。

本研究から、EGF の刺激により前立腺神経内分泌細胞から分泌される NE 因子の一つニューロテンシンが前立腺癌細胞におけるゲルゾリンを介する浸潤能を亢進させる可能性が示唆された。神経内分泌細胞を制御することは去勢抵抗性前立腺癌に対する治療戦略の構築に寄与することができると考えられた。

図6



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 0 件）

〔学会発表〕（計 4 件）

① 橋本浩平、前立腺神経内分泌細胞を介した前立腺癌の進展機構、・第 383 回日本泌尿器科学会北海道地方会、2011 年 6 月 18 日、札幌.

② Hashimoto K, Masumori N, Tanaka T, Kitamura H, Tsukamoto T, Neuroendocrine cell-cancer interaction induced by EGF promotes gelsolin-mediated invasion of prostate cancer cells, American Urological Association annual meeting 2011 , May 16, 2011 USA, Washington DC.

③ 橋本浩平、舛森直哉、田中俊明、北村　寛、塚本泰司、前立腺神経内分泌細胞による前立腺癌の gelsolin 1 を介する進展機構の解明、第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011 年 4 月 22 日、名古屋.

④ 橋本浩平、舛森直哉、田中俊明、北村　寛、塚本泰司、前立腺神経内分泌細胞による前立腺癌のゲルゾリンを介する進展機構の解明、第 20 回泌尿器科分子・細胞研究会、2011 年 3 月 12 日、津市.

〔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

６．研究組織
(1)研究代表者
橋本　浩平（HASHIMOTO　KOHEI）
札幌医科大学・医学部・訪問研究員
研究者番号：４０４０４６７８