

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791768

研究課題名(和文) 腫瘍内部環境に適応したLNCaP細胞亜株の性状解析

研究課題名(英文) Characterization of the low pH-resistant LNCaP cell subline

研究代表者

井口 和弘 (Iguchi, Kazuhiro)

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10295545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌細胞LNCaP-F10細胞は腫瘍内部環境の一つである細胞外低pH環境下においても生存可能なLNCaP細胞の亜株である。LNCaP-F10細胞の低pH耐性機序を明らかにする目的で、LNCaP-F10細胞に特徴的な発現遺伝子を解析した結果、いくつかの遺伝子発現量は親株のLNCaP細胞との間に差が認められた。その中で、TNFSF10、BIRC5およびCASP10について、細胞外低pHにより誘導されるアポトーシスに関与している可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Intratumoral region of low extracellular pH is common feature of solid tumors. The subline LNCaP-F10, of the prostate cancer cell line LNCaP, was isolated and its low pH-resistant property was examined. LNCaP-F10 cells were grown under low-pH condition, which caused apoptosis of the LNCaP cells. Significant differences in the expression of TNFSF10, BIRC5 and CASP10 were detected between LNCaP-F10 and LNCaP cells. These factors were related with the apoptosis induction by extracellular low pH.

研究分野：泌尿器科学, 薬局薬学

キーワード：LNCaP細胞 LNCaP-F10細胞 細胞外低pH アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

進行前立腺癌の薬物療法として、体内のアンドロゲンを枯渇させる薬剤を用いた内分泌療法が広く浸透している。この治療法は初期には高い効率で奏功するものの、数年後に内分泌療法に耐性の前立腺癌細胞の出現を来し、高頻度で再発する。再発を来した内分泌療法耐性前立腺癌の治療にドセタキセルが一定の効果を示すことが明らかにされている。しかしながら、ドセタキセルに無効になった前立腺癌の治療は非常に難しい。

前立腺癌をはじめ、固形癌の抗癌剤治療後の治療不良・癌の進行の原因として、腫瘍の内部環境で生存している癌細胞の寄与が考えられている。我々の樹立した前立腺癌由来 LNCaP-F10 細胞は、過酷な腫瘍内部環境（低栄養および低 pH）において長期間生存できるため、腫瘍内部の細胞の性質を一部反映するものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍内部環境で生存する癌細胞の性状の解明を目的として、LNCaP-F10 細胞の細胞外低 pH による細胞死の性質の解析および細胞外低 pH に対する耐性に関する原因遺伝子（群）の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) DNA フラグメンテーションアッセイ

細胞を lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) にて懸濁させ、proteinase K および RNase A で処理したものをサンプルとし、1.75% のアガロースゲルにて分離後、UV 照射により検出した。

(2) ウェスタンブロット

調製したサンプルを sample buffer 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 Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare 社) を用いた。

(3) 定量的リアルタイム RT-PCR

細胞内の total RNA の抽出は TRIzol (Invitrogen) を用いて行った。抽出した total RNA を PrimeScript RT reagent Kit (Takara 社) による一本鎖 complementary DNA (cDNA) の合成に使用した。Real-time RT-PCR は Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo 社) を用いて Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (Takara 社) にて行った。各 mRNA の発現量は、ACTB、HPRT1 もしくは B2M の発現量で補正した。

(4) 細胞生存率の測定

細胞生存率は alamar blue (Invitrogen) の

蛍光を測定することによって評価した。細胞を播種し、各濃度の薬物を添加した。24 時間後に alamar blue 溶液を終濃度で 10% になるように添加し、1 時間インキュベートした後、POLARstar Galaxy (BMG Labtechnologies 社) を用いて励起波長 544 nm、検出波長 612 nm にて蛍光強度を測定した。

(5) シーケンス

LNCaP 細胞および LNCaP-F10 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 (Takara 社) により増幅させた。得られた PCR 産物を、GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter 社) を用い、添付のプロトコルに従ってサイクルシーケンス反応を行った後に、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。

(6) ルシフェラーゼアッセイ

細胞へのプラスミドのトランスフェクションには Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いた。ルシフェラーゼ活性の測定は Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega 社) を用いて行った。トランスフェクション効率の補正は、同時にトランスフェクトした pHRL-TK もしくは pRL-CMV の活性を測定することにより行った。

(7) マイクロアレイ

LNCaP 細胞と LNCaP-F10 細胞を RPMI1640-PIPES (pH6.3)+0.5%FBS にて 12 時間維持した後の細胞より total RNA を調製した。サンプルを蛍光標識し、CodeLink Human Whole Genome Bioarray にハイブリダイゼーション後、スキャニングした。得られた画像データから解析ソフトウェア Microarray Data Analysis Tool により各スポットの発現強度を求めた。低 pH 耐性の面から興味深い遺伝子であり、かつ両細胞間で発現量の 2 倍以上異なるものを抽出した。

4. 研究成果

(1) 前立腺癌 LNCaP 細胞の亜株 LNCaP-F10 細胞の諸性質

LNCaP-F10 細胞は低 pH / 低栄養 (pH6.3 / 0.5%FBS) 環境下においても細胞生存率の低下は観察されなかった。一方、親株の LNCaP 細胞は低 pH / 低栄養により細胞死が引き起こされた。さらに、低栄養環境のみでは LNCaP 細胞の細胞死は観察されなかったものの、低 pH 環境のみにより細胞形態の変化と細胞死の誘導が認められた。また、細胞外の低 pH による細胞内 pH の変化を pH 感受性色素である BCECF を用いて測定した結果、両細胞間で違いがなかった。

定常状態および低 pH / 低栄養環境における両細胞の Akt, Erk1/2, p38, AMPK, mTOR

の細胞内シグナル系の活性について、リン酸化特異的抗体を用いたウェスタンブロットにより評価した。その結果、検討した条件では何れの場合においても細胞内シグナルの活性に両細胞間での大きな違いを観察するに至らなかった。

LNCaP 細胞で観察される低 pH / 低栄養環境下での細胞死のタイプを判定する目的で、アポトーシスを DNA フラグメンテーションアッセイ procaspase-3 および PARP の限定分解、オートファジーを LC3-I から LC3-II への変換を指標に判定した。その結果、LNCaP 細胞で観察される低 pH / 低栄養環境下での細胞死はアポトーシスであることを明らかにした。

以上の結果から、LNCaP-F10 細胞は低 pH によるアポトーシス誘導に対し抵抗性をもつ細胞であることが示唆された。

(2) LNCaP-F10 細胞の抗癌剤感受性

LNCaP 細胞と LNCaP-F10 細胞に各種抗癌剤を処理した結果、エトポシド、ドセタキセル、パクリタキセルはどちらの細胞にも細胞生存率の低下を引き起こし、両細胞間で作用の差は観察されなかった。一方、抗アンドロゲン剤であるピカルタミド処理は、LNCaP 細胞の増殖を有意に抑制するものの、LNCaP-F10 細胞に対しては増殖抑制を引き起こさなかった。LNCaP-F10 細胞はピカルタミドに耐性を示したことより、LNCaP-F10 細胞のアンドロゲン受容体の変異の有無について調べたが、LNCaP 細胞のアンドロゲン受容体の塩基配列と同一であった。LNCaP-F10 細胞のアンドロゲン感受性について、ジヒドロテストステロンによるアンドロゲン応答性遺伝子発現量、アンドロゲン応答性転写活性、細胞増殖率により評価したところ、LNCaP-F10 細胞は LNCaP 細胞に比べてアンドロゲン感受性が低いことを認めた。ジヒドロテストステロンにより刺激されたアンドロゲン応答性転写活性のピカルタミドによる抑制は LNCaP 細胞と LNCaP-F10 細胞のどちらの細胞においても観察されたものの、LNCaP-F10 細胞は LNCaP 細胞に比べ応答性が低かった。また、ホルモンの存在下もしくは非存在下のどちらの場合においても、LNCaP-F10 細胞のアンドロゲン受容体発現量は LNCaP 細胞の発現量に比べ低値を示した。アンドロゲン受容体共役因子の発現量に相違は観察されなかった。以上の結果から、LNCaP-F10 細胞はピカルタミドによる細胞増殖抑制作用に対し抵抗性をもつ細胞であり、LNCaP-F10 細胞のピカルタミド耐性はアンドロゲン受容体の低発現が関与しているかもしれないことが考えられた。

(3) LNCaP 細胞と LNCaP-F10 細胞の間での発現量の異なる遺伝子の同定

発現遺伝子の網羅的解析を DNA マイクロアレイ法により行い、LNCaP 細胞と LNCaP-F10

細胞の間で発現量が 2 倍以上異なり、かつ低 pH 適応の面から興味深い遺伝子を抽出した。抽出された遺伝子として、TNFSF10、BIRC5、CASP10、GPR68 などがあった。TNFSF10、BIRC5、CASP10 はアポトーシスに關与する因子であり、GPR68 はプロトン感受性 G タンパク質共役受容体である。これらの遺伝子について、両細胞間での発現量の差の有無を定量的リアルタイム RT-PCR 法にて確認し、LNCaP-F10 細胞では TNFSF10 および CASP10 の発現が著しく低いこと、BIRC5 の発現が亢進していること、さらには GPR68 の発現は LNCaP-F10 細胞においてほぼ認められないことを明らかにした。これらの遺伝子の細胞間での発現量の相違は通常の培養条件下だけでなく、低 pH もしくは低栄養・低 pH での培養条件下でも同様に観察された。また、上述の遺伝子のうちアポトーシスに關連する因子については、細胞外低 pH 環境により発現が変動することを見出した。

(4) 低 pH 条件により誘導される細胞生存率低下における TRAIL, survivin, caspase-10 の関与

低 pH による TRAIL (遺伝子名 TNFSF10) の発現上昇

TRAIL の低 pH による発現上昇は遺伝子レベルのみならず、タンパク質レベルにおいても観察された。TRAIL 遺伝子上流約 2000 bp を組み込んだレポータープラスミドを構築し、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、低 pH による TRAIL 発現変化は転写レベルでの調節であることを明らかにした。また、TRAIL 抗体存在下、低 pH で誘導される LNCaP 細胞の細胞生存率低下作用の抑制が観察された。これらの結果より、低 pH 条件で引き起こされる LNCaP 細胞の細胞生存率低下に TRAIL の発現誘導が関与している可能性が示唆された。

低 pH による survivin (遺伝子名 BIRC5) の発現低下

Survivin の低 pH による発現低下は遺伝子レベルのみならず、タンパク質レベルにおいても観察された。Survivin 遺伝子上流を組み込んだレポータープラスミドを構築し、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、低 pH による survivin 発現低下は転写レベルでの調節であることを明らかにした。

低 pH による caspase-10 (遺伝子名 CASP10) の発現上昇

CASP10 には複数の variant が存在している。Variant 特異的なプライマーを作成し、低 pH 条件下発現上昇が引き起こされる variant の同定を試みた。その結果、通常の培養条件下 LNCaP 細胞で発現している variant は増幅断片の大きさの違いより主に caspase-10d であることが推察された。また、CASP10 遺伝子上流を組み込んだレポータープラスミドを構築し、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、

低 pH による survivin 発現低下は転写レベルでの調節であることを明らかにした。低 pH 条件で引き起こされる LNCaP 細胞のアポトーシスにおける survivin および caspase-10 の関与が興味深い。

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)

Iguchi K, Hashimoto M, Kubota M, Yamashita S, Nakamura M, Usui S, Sugiyama T, Hirano K. Effects of 14 frequently used drugs on prostate-specific antigen expression in prostate cancer LNCaP cells. *Oncology Lett.* 査読有, 7, 2014, 1665-1668.
Shakui T, Iguchi K, Ito T, Baba M, Usui S, Oyama M, Tosa H, Iinuma M, Hirano K. Anti-androgenic activity of hydroxyxanthones in prostate cancer LNCaP cells. *Fitoterapia* 査読有, 92, 2014, 9-15.
Otsuka T, Hamada A, Iguchi K, Usui S, Hirano K. Suppression of metallothionein 3 gene expression by androgen in LNCaP prostate cancer cells. *Biomed. Rep.* 査読有, 1, 2013, 614-618.
Iguchi K, Hayakawa Y, Ishii K, Matsumoto K, Usui S, Sugimura Y, Hirano K. Characterization of the low pH/low nutrient-resistant LNCaP cell subline LNCaP-F10. *Oncol. Rep.* 査読有, 28, 2012, 2009-2015.

[学会発表](計6件)

平田紗希, 曾田翠, 井口和弘, 臼井茂之, 北市清幸. 低 pH 曝露による前立腺癌細胞死における Caspase-10 の関与. 日本薬学会東海支部例会, 2014年11月9日, 静岡.
岸上さやか, 曾田翠, 井口和弘, 臼井茂之, 北市清幸. 前立腺癌細胞の低 pH 耐性化におけるプロトン感受性 GPCR の関与, 日本薬学会東海支部大会, 2014年7月5日, 三重.
齋尾真希, 曾田翠, 井口和弘, 臼井茂之, 北市清幸. 低 pH 曝露による前立腺がん細胞死と抗アポトーシス因子 survivin の発現低下. 日本薬学会東海支部大会, 2014年7月5日, 三重.
霞聡子, 井口和弘, 早川友里, 臼井茂之, 平野和行. 低 pH 環境による前立腺癌細胞 LNCaP 細胞における TRAIL の発現誘導. 日本薬学会第133年会, 2013年3月27日~3月30日, 横浜.
早川友里, 井口和弘, 石井健一朗, 松本芳, 臼井茂之, 杉村芳樹, 平野和行. 低栄養・低 pH 耐性前立腺癌細胞 LNCaP-F10 細胞の性状解析. 第70回日本癌学会学術総会,

2011年10月3日~10月5日, 名古屋.
Iguchi K, Hayakawa Y, Ishii K, Matsumoto K, Usui S, Sugimura Y, Hirano K. Prostate cancer LNCaP-F10 cells are resistant against cell death induced by low pH and low nutrition culture condition. The 39th Meeting of the International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM2011), Oct. 15th-19th, 2011, Firenze (Italy).

6. 研究組織

(1)研究代表者

井口 和弘 (IGUCHI, Kazuhiro)
岐阜薬科大学・実践薬学大講座・薬局薬学研究室・講師
研究者番号: 1 0 2 9 5 5 4 5

(2)研究分担者

なし