

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791646

研究課題名(和文) 前立腺癌ホルモン非依存性進展および抗癌剤耐性獲得における IL - 6 の役割

研究課題名(英文) Inhibition of tumor growth and sensitization to chemotherapy by RNA interference targeting interleukin-6 in the androgen-independent human prostate cancer PC3 model

研究代表者

酒井 伊織 (SAKAI, IORI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20533772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌のアンドロゲン非依存性増殖機構の解明あるいはドセタキセル療法に対する耐性化の克服は進行前立腺癌治療の最重要課題である。アンドロゲン非依存性ヒト前立腺癌細胞株PC3におけるRNA干渉を用いたIL-6発現抑制の意義を検討し、アンドロゲン非依存性増殖メカニズムの解明およびドセタキセル療法に対する耐性化の克服を試みた。IL-6の自己分泌はアンドロゲン非依存性増殖に直接的に作用し、その増殖を刺激した。また、IL-6の過剰分泌はドセタキセルに対する抗癌剤耐性化に関与していることが示され、IL-6の分泌抑制によりその耐性を克服できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Suppression of IL6 production by androgen independent (AI) human prostate cancer PC3 cells using shRNA technology inhibited their growth both in vitro and in vivo through the modulation of apoptotic and signal transduction pathways. Furthermore, the administration of docetaxel failed to induce marked cytotoxic effects even on PC3/shIL6 due to the formation of positive autocrine loops between PC3/shIL6 and NFkB signaling pathways. However, combined treatment with bortezomib and docetaxel could successfully suppress the docetaxel induced IL6 production via the inactivation of NFkB signaling, resulting in a satisfactory enhancement of docetaxel sensitivity in vivo. These findings suggest that inhibition of IL-6 secretion using shRNA, either alone or in combination with docetaxel and bortezomib, emerges as an attractive approach by suppressing growth and enhancing chemosensitivity in AI prostate cancer.

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：若手研究B

キーワード：前立腺癌 IL6 siRNA

1. 研究開始当初の背景

進行前立腺癌に対する内分泌療法は当初 90% 以上の症例で有効であるが、内分泌療法開始後、多くの症例で時間の経過とともにアンドロゲン非依存性となり、内分泌療法に抵抗性を示すホルモン不応性前立腺癌 (hormone refractory prostate cancer :HRPC) となることが知られている。近年、HRPC に対する治療法としてドセタキセルを用いた抗癌化学療法の有効性が示されているが、その奏効率、奏効期間は満足できるものではなく、HRPC に対して有効な治療は極めて限られているのが現状である。それゆえに、HRPC の予後は不良であり、アンドロゲン非依存性増殖メカニズムの解明および抗癌剤耐性化の克服は進行前立腺癌治療の最重要課題である。インターロイキン-6 (IL-6) は多くの細胞において、増殖、アポトーシス、血管新生、等の多彩な機能に関わっており、前立腺癌をはじめ様々な腫瘍の癌化や進行に関与している。近年、IL-6 が HRPC の進行に重要な役割を果たしていることが報告されており、種々の検討がなされている。通常、前立腺癌細胞においてアンドロゲンはアンドロゲン受容体 (AR) に結合し、これを活性化することによって細胞増殖を促す。一方で AR はリガンドの結合に依存しない活性化の経路を有しており、アンドロゲン非依存性増殖に IL-6 と AR とのクロストークが関与していることが示唆されている。代表的なアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞においては、当初 IL-6 は増殖抑制的に作用するが、長期間 IL-6 に暴露されることにより IL-6 を自己分泌するようになり、IL-6 は細胞増殖促進的な作用を有するに至る。一方で、アンドロゲン非依存性前立腺癌株である PC3 細胞においては IL-6 が過剰に自己分泌されており、オートクライン制御により細胞増殖を促進的に制御している。ところが、この PC3 細胞は AR を発現しないため、IL-6 による AR

活性化を介さない細胞増殖機構が関与している可能性が考えられているが、その分子機構は未だに不明な点が多い。そのため、本研究においては、AR を介さない IL-6 の前立腺癌細胞に対する影響に焦点を当てて、内分泌療法によりアンドロゲン-AR のシグナルが抑制されている状態でのアンドロゲン非依存性前立腺癌増殖機構あるいはドセタキセル耐性化機構における IL-6 の役割を検討した。

2. 研究の目的

前立腺癌のアンドロゲン非依存性増殖およびドセタキセル耐性化における RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) を用いた IL-6 自己分泌抑制の意義を検討した。

3. 研究の方法

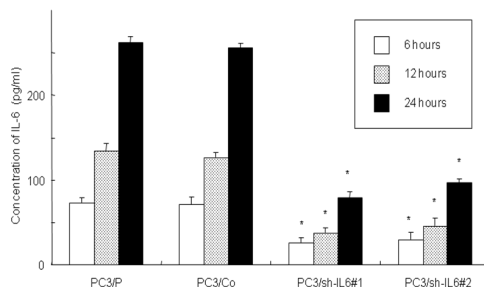
今回、IL-6 の自己分泌抑制を意図して用いた手法である RNA 干渉は、塩基配列特異的な遺伝子サイレンシングのメカニズムであり、治療標的分子を特異的に阻害することが可能で、今後の臨床応用が期待されている。そこで、まず、AR を発現しないアンドロゲン非依存性ヒト前立腺癌細胞株 PC3 に IL-6 を標的とした short hairpin RNA (shRNA) 発現プラスミドベクターおよびコントロールベクターを安定的にトランスフェクションし、コントロールベクター導入株 (PC3/Co) に比し IL-6 shRNA 導入株 (PC3/sh-IL6) において IL-6 の自己分泌が有意に抑制されていることを ELISA 法にて確認した。次いで、PC3/Co および PC3/sh-IL6 の細胞増殖能およびドセタキセルに対する感受性を *in vitro* および *in vivo* にて評価した。また、*in vitro* において IL-6 自己分泌抑制によるアポトーシス関連蛋白および下流シグナルの変化を Western blot 法にて、さらには、ドセタキセル投与時の両クローンにおける IL-6 分泌量の変化を ELISA 法にて解析した。

4. 研究成果

PC3/sh-IL6 の細胞培養上清中の IL-6 の分泌

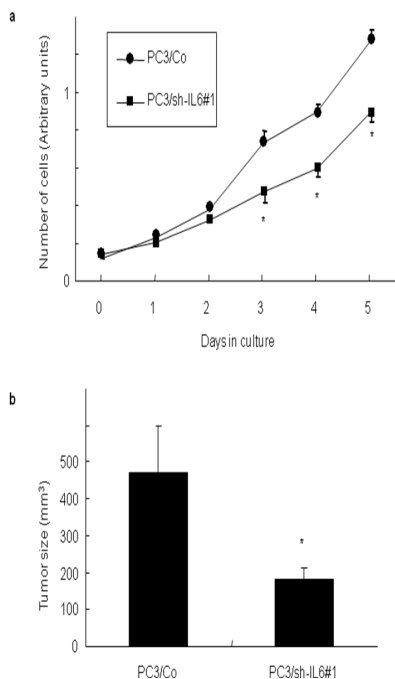
量は PC3/Co のそれと比較して約 20% に抑制されていることが確認された (Fig. 1)。

Fig. 1



in vitro および in vivo において、PC3/sh-IL6 の細胞増殖能は PC3/Co と比較して有意に低下しており (Fig. 2)、さらにその下流シグナルおよびアポトーシス関連蛋白の変化を Western blot 法にて比較検討した結果、PC3/Co に比し PC3/sh-IL6 では Bcl-2、Bcl-xL の発現低下および AKT、p44/42MAPK、STAT3 のリン酸化抑制が認められた。

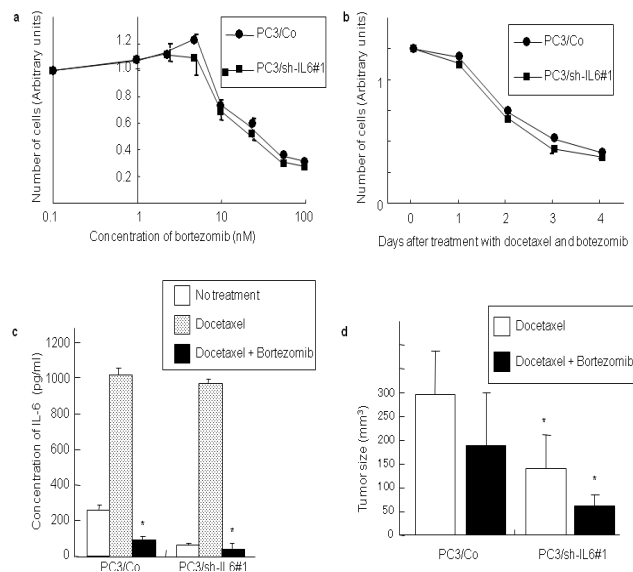
Fig. 2



さらに両クローンにおけるドセタキセルに対する感受性の変化を in vitro で検討したところ、PC3/sh-IL6 では PC3/Co に比しドセタキセルに対する感受性が亢進していたが、その差は IL-6 分泌量から想定されるほど顕著なものではなかった。また、両クローンにおいてドセタキセル投与後、NF B 活性化に

伴う顕著な IL-6 自己分泌の亢進が確認された。そこで、ドセタキセル投与による IL-6 分泌亢進を抑制することを意図してプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブとドセタキセルの併用療法の効果を検討した。ドセタキセル単剤投与時と比較してドセタキセルおよびボルテゾミブ併用療法により IL-6 の自己分泌は顕著に抑制された。また、in vitro および in vivo においてドセタキセルおよびボルテゾミブ併用療法の細胞増殖抑制効果を検討した結果、ドセタキセル単剤群と比較して併用療法群において有意に細胞増殖が抑制された (Fig. 5)。

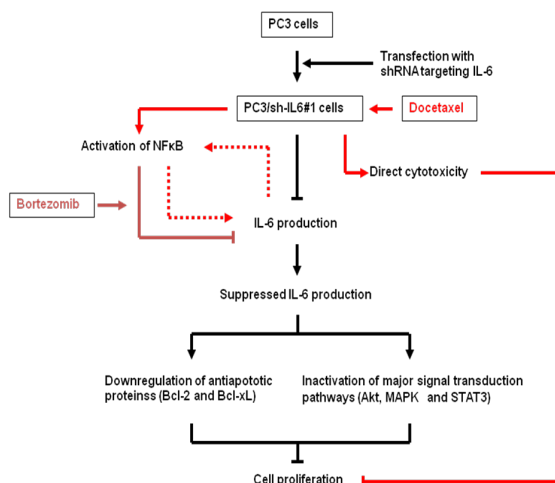
Fig. 5



前立腺癌のアンドロゲン非依存性増殖機構の解明あるいはドセタキセル療法に対する耐性化の克服は進行前立腺癌治療の最重要課題である。臨床においては前立腺癌患者の血中 IL-6 高値は未治療および HRPc 患者の予後因子として重要であることが報告されており、また種々の検討から IL-6 は前立腺癌の増殖、アンドロゲン不応化、ドセタキセル耐性化などと関連していることが示唆されているが、その分子機構の詳細は未だ解明されていない。そこで我々は、アンドロゲン非依存性ヒト前立腺癌細胞株 PC3 における RNA 干渉を用いた IL-6 発現抑制の意義を検討し、アンドロゲン非依存性増殖メカニズムの解

明およびドセタキセル療法に対する耐性化の克服を試みた。

今回のアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 PC3 における検討では、IL-6 の自己分泌はアンドロゲン非依存性増殖に直接的に作用し、その増殖を刺激した。また、IL-6 の過剰分泌はドセタキセルに対する抗癌剤耐性化に関与していることが示され、IL-6 の分泌抑制によりその耐性を克服できる可能性が示唆された。以上より、RNA 干渉を用いた IL-6 発現抑制はホルモン不応性前立腺癌において有用な治療法となりうる可能性が示唆され、また、ドセタキセルに対する抗癌剤耐性化克服においても重要な役割を果たす可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等 〔学会発表〕(計2件)

第97回日本泌尿器科学会総会

ヒト前立腺癌細胞株 PC3 における IL-6 発現抑制の意義

105th AUA annual meeting

Chemosensitization and inhibition of tumor growth by short hairpin RNA targeting interleukin-6 in androgen-independent human prostate cancer PC3 cells.

6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井 伊織 (SAKAI, Iori)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：20533772

(2)研究分担者

藤澤 正人 (FUJISAWA, Masato)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30243314

三宅 秀明 (MIYAKE, Hideaki)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60379435