



Enhanced sensitivity to androgen withdrawal due to overexpression of interleukin-6 in androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells.

寺川, 智章

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5023

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005023>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	寺川 智章
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 5023 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 22 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Enhanced sensitivity to androgen withdrawal due to overexpression of interleukin-6 in androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells.(アンドロゲン依存性前立腺細胞株 LNCaP におけるアンドロゲン除去環境下での IL-6 高発現の意義)

審 査 委 員

主 査	教 授	南 博信
	教 授	具 英成
	准教授	佐々木 良平

(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Enhanced sensitivity to androgen withdrawal due to overexpression of interleukin-6 in androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells

アンドロゲン依存性前立腺細胞株 LNCaP におけるアンドロゲン除去環境下での IL-6 高発現の意義

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
腎泌尿器科学
(指導教員：藤澤正人教授)

寺川 智章

【緒言】

前立腺癌のホルモン非依存性進展の正確な分子メカニズムは、いまだ解明の途上にあるが、アンドロゲン以外の分子によるリガンド非依存性のアンドロゲンレセプター(AR)活性化が、重要な役割を果たしている可能性がある、近年注目を集めている。サイトカインの一種である IL-6 が、リガンド非依存性の AR 活性化に関与する key molecule であると認識されつつあるが、IL-6 が前立腺癌進展に促進的に作用するという報告が多くなされる一方で、負に制御する可能性も示唆されている。さらに、多くの研究は、前立腺癌を IL-6 にて処理する、つまり、外分泌もしくは傍分泌様式を再現したものであり、本来、進行性前立腺癌自体が分泌すると考えられる IL-6 の作用を再現したのではない。

以上のように、前立腺癌のアンドロゲン非依存性進展における IL-6 の役割については、未だにその全容の解明には至っていないのが現状である。

そこで、我々は本研究において、IL-6 高発現前立腺癌細胞株を作製し、アンドロゲン除去前後での形質の変化を調べることで、IL-6 が前立腺癌のホルモン不応性進展に果たす役割の解明を試みた。

【方法】

(1)IL-6 高発現前立腺癌細胞株(LNCaP/IL-6)の樹立および腫瘍増殖能の評価
ヒトアンドロゲン依存性前立腺癌細胞 LNCaP に、IL-6 発現 cDNA プラスミドベクターを遺伝子導入した。得られた IL-6 遺伝子導入細胞株の培養上清中の IL-6 の発現量を ELISA 法にて確認し、高発現株 LNCaP/IL-6 を樹立した。同時に expression vector プラスミドのみを導入したコントロール LNCaP 細胞(LNCaP/Co)も樹立し、in vitro および in vivo で、アンドロゲン除去前後での増殖能を比較した。12 well plate にて細胞を標準およびステロイドホルモン除去培地で培養し、連日細胞数を計測して in vitro での増殖曲線を調べた。また、 5×10^6 個の細胞を同系マウスの側腹部に皮下接種し in vivo での腫瘍サイズを castration 前後で経時的に計測した。

(2)アンドロゲン除去前後での IL-6 の下流シグナル伝達系の評価
IL-6 がアンドロゲン非依存性に AR を活性化する系として報告されている下流伝達シグナル経路である JAK-STAT、Ras-MAPK 及び PI3K-Akt 系の活性化を、標準およびステロイドホルモン除去培地で培養した際の LNCaP/Co および LNCaP/IL-6 において評価した。両細胞を標準培地で培養、および、ステロイドホルモン除去培地で 6 日間培養して、連日細胞を回収し、Western blot 法にて下流シグナル経路の蛋白リン酸化レベルを評価した。また、ステロイドホルモン除去培地で、両細胞を培養し、そこに ERK および Akt のリン酸化 inhibitor を加え、増殖能の変化を評価した。

(3)網羅的遺伝子発現解析

上記の実験にて、LNCaP/IL-6 では、アンドロゲン除去により増殖が抑制されたが、その分子機構を解明するため、アンドロゲン除去前後での LNCaP/IL-6 および

LNCaP/Co の網羅的遺伝子発現解析を行った。通常および、ステロイドホルモン除去培地で培養した後の細胞を回収し、cDNA microarray にて解析し、両細胞間で発現差がある遺伝子を検討した。

【結果】

(1)IL-6 高発現前立腺癌細胞株(LNCaP/IL-6)の樹立および腫瘍増殖能の評価
LNCaP/IL-6 の培養上清中には 1000-1500pg/ml の IL-6 の分泌が認められ、IL-6 を高発現するヒトホルモン非依存性前立腺癌細胞株 PC3 と同程度の分泌が認められた。アンドロゲン存在下では、LNCaP/IL-6 の in vitro における細胞増殖は、LNCaP/Co と同等であったが、アンドロゲン除去後の増殖は、LNCaP/Co に比し顕著に低下した。In vivo においては、両株をヌードマウス皮下に移植し、一定の腫瘍径に達したマウスに castration を施行すると、ヌードマウス皮下に移植した LNCaP/Co は、castration 後に一旦増殖が停止するが、約 2 週間後からアンドロゲン不応癌として徐々に増大したのに対して、IL-6 高発現 LNCaP (LNCaP/IL-6)は、castration 後に完全に消退した。

(2)アンドロゲン除去前後での IL-6 の下流シグナル伝達系の変化

アンドロゲン除去後において、LNCaP/IL-6 では LNCaP/Co に比し、p44/42 ERK および Akt のリン酸化が亢進していた。さらに、アンドロゲン除去環境下で、ERK および Akt のリン酸化 inhibitor を加えると、LNCaP/IL-6 では LNCaP/Co に比し、より顕著にその増殖が抑制された。

(3)網羅的遺伝子発現解析

アンドロゲン除去後、LNCaP/IL-6 では MAPK 系遺伝子の発現が亢進していた。また、relaxin や VEGF といった前立腺癌の進行に関与する遺伝子の発現は低下していた。全体として、アンドロゲン除去前後での両群間の増殖能に合致するようなかたちで、増殖やアポトーシスに関連する遺伝子の発現に相違を認めた。

【考察】

IL-6 が前立腺癌の悪性形質獲得に関与する可能性が示唆されているが、その分子機構はいまだ不明であり、IL-6 の前立腺癌に対する作用も報告により様々である。また、多くの実験系が、ヒトアンドロゲン依存性前立腺癌細胞 LNCaP に IL-6 を外因性に添加した影響を解析しており、自己分泌される IL-6 の影響を解析したものではない。よって我々は、LNCaP 細胞に IL-6 を導入し、アンドロゲン除去前後での形質変化を解析することで、ホルモン感受性前立腺癌が自己分泌する IL-6 の意義について検討した。

IL-6 高発現 LNCaP は、(1)アンドロゲンが除去されると、その増殖能は、著明に低下した。(2)アンドロゲン除去により、一般に腫瘍増殖促進に関与すると考えられている p44/42 ERK および Akt のリン酸化が亢進していた。これらの inhibitor を加えると、LNCaP/Co に比し、より顕著にその増殖が抑制された。(3)網羅的遺伝子解

析でも、LNCaP/IL-6 がアンドロゲン除去後に増殖が抑制されることに合致する遺伝子の発現変化を認めた。これらの結果により、ヒトアンドロゲン依存性前立腺癌細胞 LNCaP においては、前立腺癌細胞自身が過剰に分泌する IL-6 は、アンドロゲン除去環境下において、前立腺癌細胞のアンドロゲン非依存性進展を抑制的に制御している可能性が、初めて示唆された。また、その機序には Ras-MAPK 及び PI3K-Akt 系の活性化が関与しているが、それはアンドロゲン除去により誘導される apoptotic な変化に抵抗するいわゆる adaptive な現象と考えられた。本研究により、前立腺癌のホルモン非依存性進展において、IL-6 が作用する分子機構解明の一端に新しい知見が加えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2089号	氏 名	寺川 智章
論文題目 Title of Dissertation	<p>アンドロゲン依存性前立腺細胞株 LNCaP におけるアンドロゲン除去環境下での IL-6 高発現の意義</p> <p>Enhanced sensitivity to androgen withdrawal due to overexpression of interleukin-6 in androgen-dependent human prostate cancer LNCap cells.</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 南 博信 Chief Examiner</p> <p>副 査 具 英次 Vice-examiner</p> <p>副 査 佐々木 良平 Vice-examiner</p>		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

IL-6 の前立腺癌の悪性形質獲得への関与が示唆されているが、その分子機構はいまだ不明であり、IL-6 の前立腺癌に対する作用も報告により様々である。また、多くの実験系が、ヒトアンドロゲン依存性前立腺癌細胞 LNCaP に IL-6 を外因性に添加した影響を解析しており、自己分泌される IL-6 の影響を解析したものではない。よって我々は、LNCaP 細胞に IL-6 を導入し、アンドロゲン除去前後での形質変化を解析することで、ホルモン感受性前立腺癌が自己分泌する IL-6 の意義について検討した。

【方法】

（1）IL-6 高発現前立腺癌細胞株（LNCaP/IL-6）の樹立および腫瘍増殖能の評価

ヒトアンドロゲン依存性前立腺癌細胞 LNCaP に、IL-6 発現 cDNA プラスミドベクターを遺伝子導入した。得られた IL-6 遺伝子導入細胞株の培養上清中の IL-6 の発現量を ELISA 法にて確認し、高発現株 LNCaP/IL-6 を樹立した。同時に vector のみを導入したコントロール LNCaP 細胞（LNCaP/Co）も樹立し、*in vitro* および *in vivo* で、アンドロゲン除去前後での増殖能を比較した。

（2）アンドロゲン除去前後での IL-6 の下流シグナル伝達系の評価

IL-6 がアンドロゲン非依存性に AR を活性化する系として報告されている下流伝達シグナル経路である JAK-STAT、Ras-MAPK 及び PI3K-Akt 系の活性化を、標準およびステロイドホルモン除去培地で培養した際の両細胞株において評価した。

（3）網羅的遺伝子発現解析

アンドロゲン除去前後での両細胞株の cDNA を microarray にて解析し、両細胞間で発現差がある遺伝子を検討した。

【結果】

（1）IL-6 高発現前立腺癌細胞株（LNCaP/IL-6）の樹立および腫瘍増殖能の評価

LNCaP/IL-6 の培養上清中には 1000-1500pg/ml の IL-6 の分泌が認められた。アンドロゲン存在下では、LNCaP/IL-6 の *in vitro* における細胞増殖は、LNCaP/Co と同等であったが、アンドロゲン除去後の増殖は、LNCaP/Co に比し顕著に低下した。*In vivo* においては、両株をヌードマウス皮下に移植し、一定の腫瘍径に達したマウスに castration を施行すると、LNCaP/IL-6 は、castration 後に完全に消退した。

（2）アンドロゲン除去前後での IL-6 の下流シグナル伝達系の変化

アンドロゲン除去後において、LNCaP/IL-6 では LNCaP/Co に比し、p44/42 ERK および Akt のリン酸化が亢進していた。さらに、アンドロゲン除去環境下で、ERK および Akt のリン酸化 inhibitor を加えると、LNCaP/IL-6 では LNCaP/Co に比し、より顕著にその増殖が抑制された。

（3）網羅的遺伝子発現解析

アンドロゲン除去後、LNCaP/IL-6 では MAPK 系遺伝子の発現が亢進していた。また、relaxin や VEGF といった前立腺癌の進行に関与する遺伝子の発現は低下していた。全体として、アンドロゲン除去前後での両群間の増殖能に合致するようなかたちで、増殖やアポトーシスに関連する遺伝子の発現に相違を認めた。

【考察】

IL-6 高発現 LNCaP は、(1) アン드로ゲンが除去されると、その増殖能は、著明に低下した。(2) アン드로ゲン除去により、一般に腫瘍増殖促進に関与すると考えられている p44/42 ERK および Akt のリン酸化が亢進していた。これらの inhibitor を加えると、LNCaP/Co に比し、より顕著にその増殖が抑制された。(3) 網羅的遺伝子解析でも、LNCaP/IL-6 がアン드로ゲン除去後に増殖が抑制されることに合致する遺伝子の発現変化を認めた。これらの結果により、ヒトアン드로ゲン依存性前立腺癌細胞 LNCaP においては、前立腺癌細胞自身が過剰に分泌する IL-6 は、アン드로ゲン除去環境下において、前立腺癌細胞のアン드로ゲン非依存性進展を抑制的に制御している可能性が、初めて示唆された。また、その機序には Ras-MAPK 及び PI3K-Akt 系の活性化が関与しているが、それはアン드로ゲン除去により誘導される apoptotic な変化に抵抗するいわゆる adaptive な現象と考えられた。

以上のように、本研究は、サイトカインである IL-6 をヒトホルモン依存性前立腺癌細胞株に遺伝子導入し、アン드로ゲン除去前後での細胞の形質変化につき研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった、自己分泌される IL-6 の影響を解析し、前立腺癌のホルモン非依存性進展において、IL-6 が作用する分子機構に関する重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認められる。