



Inhibition of tumor growth and sensitization to chemotherapy by RNA interference targeting interleukin-6 in the androgen-independent human prostate cancer PC3 model

酒井, 伊織

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5209

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005209>

※ 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	酒井 伊織
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 5209 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 23 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Inhibition of tumor growth and sensitization to chemotherapy by RNA interference targeting interleukin-6 in the androgen-independent human prostate cancer PC3 model(RNA 干渉を用いた IL-6 発現抑制はアンドロゲン非依存性ヒト前立腺癌細胞株 PC3 の細胞増殖を抑制し抗癌剤感受性を増強する)

審 査 委 員

主 査	教 授	南 博信
	教 授	丹生 健一
	教 授	林 祥剛

(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Inhibition of tumor growth and sensitization to chemotherapy by RNA interference targeting interleukin-6 in the androgen-independent human prostate cancer PC3 model

RNA 干渉を用いた IL-6 発現抑制はアンドロゲン非依存性ヒト前立腺癌細胞株 PC3 の細胞増殖を抑制し抗癌剤感受性を増強する

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

腎泌尿器科学

(指導教員：藤澤 正人 教授)

酒井 伊織

緒言)

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の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。

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。

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。

結果)

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。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、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。

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 κ 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。

考察)

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に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。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2176 号	氏 名	酒井 伊織
論文題目 Title of Dissertation	RNA干渉を用いたIL-6発現抑制はアンドロゲン非依存性ヒト前立腺癌細胞株 PC3 の細胞増殖を抑制し抗癌剤感受性を増強する Inhibition of tumor growth and sensitization to chemotherapy by RNA interference targeting interleukin-6 in the androgen-independent human prostate cancer PC3 model		
審査委員 Examiner	主 査 南 博信 Chief Examiner 副 査 林 祥剛 Vice-examiner 副 査 丹生 謙一 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

緒言)

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、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、ホルモン不応性前立腺癌 (hormone-refractory prostate cancer: HRPC) となる。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たが、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。したがって、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) は細胞の増殖、アポトーシス、血管新生などの機能に関わり、癌化や腫瘍の進行に影響する。IL-6 が HRPC の進行に重要な役割を果たすことも報告された。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り細胞増殖を促す。一方で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することが示唆されている。アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞は、当初 IL-6 により増殖が抑制されるが、長期間の IL-6 暴露により IL-6 を自己分泌し、IL-6 が細胞増殖を促進するようになる。一方、アンドロゲン非依存性前立腺癌株である PC3 細胞では IL-6 を過剰に自己分泌し、オートクライン制御により細胞増殖が促進される。この PC3 細胞は AR を発現していないため、AR 活性化を介さない細胞増殖機構が関与していると考えられる。しかし、その分子機構は未だに不明である。そのため、本研究では、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、内分泌療法によるアンドロゲン-AR シグナル抑制下でのアンドロゲン非依存性前立腺癌増殖およびドセタキセル耐性化における IL-6 の役割を検討した。

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。

方法)

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トし、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の自己分泌を抑制すること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。

結果)

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。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、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。

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に、NF κ 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。

考察)

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。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耐性化に関与していることが示唆された。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の治療法や、ドセタキセルの効果増強を目的とした併用療法として重要な役割を果たす可能性が示唆された。

本研究は IL-6 の抑制による前立腺癌細胞に対する抗腫瘍効果を検討したものであり、ホルモン不応性前立腺癌の治療法や、ドセタキセルの効果増強を目的とした併用療法の可能性を示唆した点に意義がある。前立腺癌治療に貢献しう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、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。