

## 平成24年度名古屋市立大学医学会賞

### 受賞論文

# 前立腺癌転移動物モデルの樹立と標的遺伝子 Gst-pi の同定

内 木 拓

名古屋市立大学大学院医学研究科 腎・泌尿器科学分野

Organ specific Gst-pi expression of the metastatic androgen independent prostate cancer cells in nude mice

TAKU NAIKI

*Department of nephron-urology*

*of Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences*

### Summary

Elucidating the mechanisms of metastasis in prostate cancer, particularly to the bone, is a major issue for treatment of this malignancy. We previously reported that an androgen-independent variant had higher expression of glutathione S-transferase pi (Gst-pi) compared with a parent androgen-dependent transplantable rat prostate carcinoma which was established from the transgenic rat for adenocarcinoma of the prostate (TRAP). A new cell line, PCa11, was established from the androgen-independent prostate tumor and used to investigate its metastatic potential in nude mice. PCa11 had strong expression of Gst-pi as well as androgen-independent prostate tumor, therefore we knocked-down *Gst-pi* in PCa11 by iRNA strategy to examine the roles of Gst-pi on androgen-independency, cell proliferation, and oxidative stress. It was clearly demonstrated that PCa11 frequently formed metastatic lesions in the lung and lymph nodes after orthotopic implantation in the prostate, and in the lung and bone after intravenous injections. Immunohistochemically, Gst-pi expressions were demonstrated in prostate tumors derived from orthotopically implanted PCa11 cells, and metastasis to bone resulting from tail vein injections, but not in lung and lymph nodes. Attenuation of *Gst-pi* expression by *Gst-pi*-siRNA *in vitro* significantly suppressed cell proliferation rate and increased levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) in androgen depleted condition. These results suggest that Gst-pi has an important role in adapting prostate cancer for growth and metastasis involving an alteration of ROS signaling, and that Gst-pi expressions of the prostate cancers are dependent on metastatic sites.

### はじめに

わが国の前立腺癌の発病率は、1980年では10万人当たり10人程度だったが、2005年には4倍以上と著明に増大している。その死亡数は、1990年と比較して、2015年には約4倍になるとの報

告もあり、医学的・社会的関心の高い疾患のひとつである<sup>1)</sup>。ホルモン療法は前立腺癌の標準治療のひとつであるが、一定の時期を経るとホルモン療法抵抗性（アンドロゲン非依存性という）となる、解決すべき課題がある。そして、

前立腺癌がホルモン療法抵抗性となる過程には不明な点が多く、その病態を解明するためのモデルも少ない<sup>2)-5)</sup>。そこで、前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得し、進展・転移する過程を再現した動物モデルの作成を試みた。そして、そのモデル解析で得られた遺伝子に着目し、前立腺癌の新たな増殖メカニズムを解明することを目的とした。

### 1. トランスジェニックラットモデルから のアンドロゲン非依存性癌の作成

私たちはこれまで、前立腺に特異的に発現する *provasin promoter* 下に *SV40T antigen* をリンクし、受精卵に導入することで、高頻度に前立腺癌を発症するトランスジェニックラットモデルを樹立した<sup>6)-7)</sup>。そのラットモデルに生じる前立腺癌は全てアンドロゲン依存性で、ホルモン療法である去勢術を行うと癌は全て消失した。そこで、この前立腺癌をヌードマウス皮下に移植し、去勢術を施行し、移植継代を8代にわたり繰り返すことで、アンドロゲン非依存性前立腺癌を作成した。

### 2. ホルモン療法抵抗性前立腺癌転移モデルの樹立と治療標的遺伝子の同定

上記のアンドロゲン非依存性癌から細胞株を樹立し、その増殖能と転移能を検索した。PCa1と名付けた細胞株は、ヒトの前立腺癌と同様にアンドロゲンレセプターの発現を認めた。そして *in vitro* において、アンドロゲン除去培地でも安定的に増殖し、ヒト生体内で大部分を占める活性型アンドロゲンである DHT 添加によって、その増殖能は亢進された。これにより、PCa1 は、ホルモン療法に感受性のある、アンドロゲン非依存性前立腺癌の特徴を有することが分かった。*in vivo* において PCa1 は、去勢術後のヌードマウスの皮下移植によって100%造腫瘍性を認めた。そして、ヌードマウスの前立腺移植でも100%腫瘍を形成し、さらにリンパ節・肺に高頻度に転移を認めた。その転移頻度は去勢術後のマウスでも同様であった。さらに、ヌードマウス尾静脈投与にて、肺

Table 1. frequency of metastasis by PCa1 cell line

移植部位	去勢術	屠殺 (週)	No. of mice	造腫瘍性 (%)	転移頻度 (%)		
					リンパ節	肺	骨
皮下	-	10	4	100	-	-	-
	+	10	4	100	-	-	-
同所 (前立腺)	-	2	2	100	0	0	0
		5	3	100	100	33	0
	+	2	2	50	0	0	0
		6	3	100	100	75	0
尾静脈	-	5	5	-	40	80	20
		9	5	-	80	100	40

転移に加え、高頻度に骨転移も認めた (Table 1)。それらの病変を病理学的に検討すると、ヒトの前立腺癌病巣や転移病巣と類似したものであった。

そこで、ホルモン療法抵抗性前立腺癌の発症に関わる新たな遺伝子を探索するため、樹立した前立腺癌がホルモン療法抵抗性を獲得する前後で cDNA マイクロアレイを行った。その中で発現差を認めた、酸化ストレス応答遺伝子 *Glutathione S-transferase Pi (Gst-pi)* に着目して機能解析を行った。*Gst-pi* は肝臓に主に存在する解毒酵素の一つであるが、ほとんどの正常前立腺上皮に存在し、前癌病変や癌の初期の段階で、メチル化によって抑制化をうけているといわれている<sup>8)-11)</sup>。しかし、ホルモン療法抵抗性前立腺癌における報告はない。そこで、ホルモン療法抵抗性前立腺癌における *Gst-pi* の発現上昇と細胞内酸化ストレス処理過程の関わりを検証するため、次の研究を行った。

### 3. *Gst-pi* に着目した細胞増殖機構の機能解析

アンドロゲン除去を目的としたチャコール処理培地で訓化した細胞株である PCa1CS は、通常の PCa1 と比較して、*Gst-pi* の発現が著明に上昇した。そして、ヒトのアンドロゲン依存性細胞株 LNCaP と比較して、非依存性細胞株の PC-3 や DU145 でも *Gst-pi* の発現が上昇している事が分かった (Fig. 1)。siRNA にて PCa1 の *Gst-pi* 発現を抑えると、細胞増殖はアンドロゲンの有無に関わらず有意に抑制された。そして DCFH アッセイで、酸化ストレスの本体である reactive oxygen species (ROS)

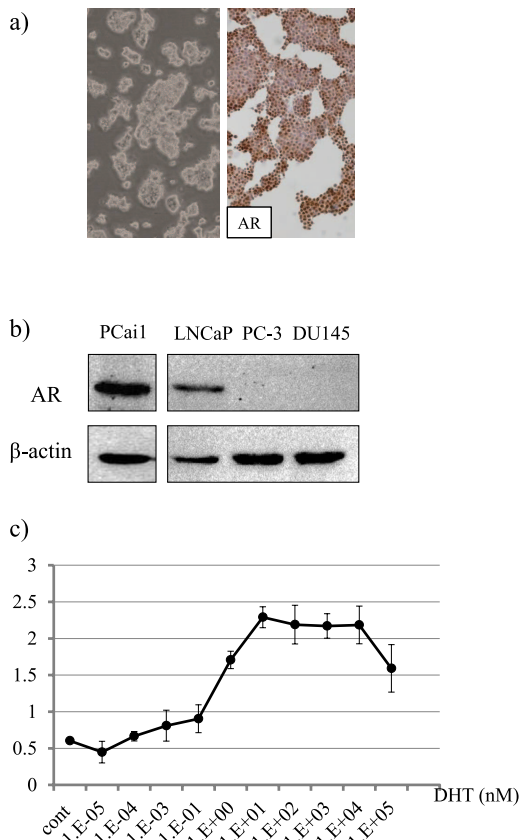


Figure 1. Androgen receptor expression and function in PCa1 cell line.

The established cell line, PCa1, grew with spheroid formation, and immunohistochemical analysis revealed intense nuclear staining for AR in androgen containing medium (a). Western blot analysis showed that PCa1 cells had AR expression similar to the human prostate cancer cell line LNCaP (b). WST-1 assay revealed that growth of PCa1 cells in CS-FBS medium was enhanced by 1-10 nM Dihydrotestosterone (DHT) (c).

の定量化を行うと, Gst-pi siRNA 処理群で有意に高い傾向を認めた. さらに Gst-pi 特異的抑制剤であるエタクリン酸 (Ethacrinic acid: EA) を投与し, 同様に細胞増殖活性と細胞内 ROS を定量した. すると, EA 投与によって濃度依存的に, 同様の結果を認めた (Fig. 2). これらのことより Gst-pi は, ROS を抑えることで

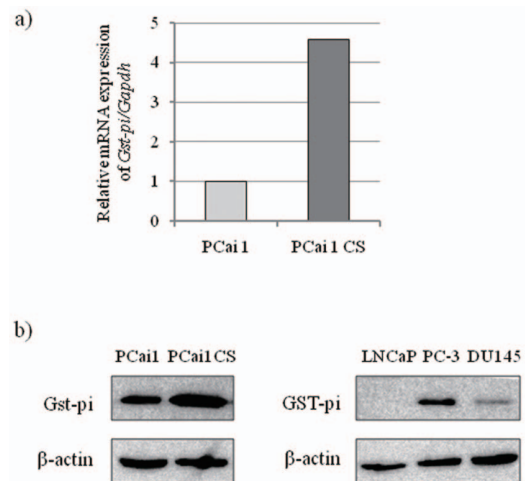


Figure 2. Gst-pi expressions in PCa1.

PCa1 in the CS-FBS medium (PCa1 CS) had higher expression levels of Gst-pi in RT-PCR (a) and Western blot (b) compared to cells in normal medium. Expressions of GST-pi in PC3 and DU145 were confirmed.

細胞増殖に促進的に働いていると思われた. 次に, Gst-pi siRNA をトランスフェクションした PCa1 を, 去勢術施行及び未施行のヌードマウスにそれぞれ皮下移植し, 造腫瘍性を検討した. すると, ネガティブコントロール群と比較して, Gst-pi siRNA をトランスフェクションした PCa1 では, その腫瘍増殖が有意に抑制された. 対照的に, 去勢術未施行のヌードマウスでは腫瘍増殖に差を認めなかった (Fig. 3).

#### 4. ホルモン療法抵抗性前立腺癌における Gst-pi のタンパク発現解析

前立腺癌の原発巣, 転移巣での Gst-pi の発現の違いを調べるため, PCa1 のヌードマウス移植によって生じる病変を用いて, 免疫組織学的に検討した. その結果, 非去勢群と比較して, 去勢術後の前立腺癌において, 著明な Gst-pi の発現亢進を認めた (Fig. 4). さらに, PCa1 の移植によって生じる転移臓器毎で検討すると, リンパ節転移巣, 肺転移巣では Gst-pi の発現を認めなかったが, 骨転移巣では強く発現を認めた (Fig. 5). これらのことより, ホル

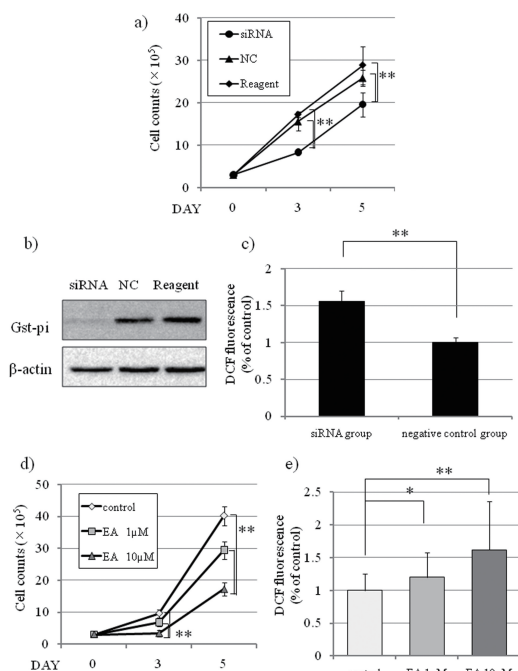


Figure 3. *Gst-pi* siRNA treatment in PCa1 cells in CS-FBS medium.

PCa1 cells in CS-FBS medium were treated with *Gst-pi*-siRNA. Significant growth inhibition (\*\*,  $P < 0.001$ ) was observed in the *Gst-pi*-siRNA treated PCa1 cells in CS-FBS medium (Figure 3a). *Gst-pi* expression was markedly decreased in *Gst-pi*-siRNA group, while negative control (NC) group and reagent group had clearly detectable *Gst-pi* signals (Figure 3b). DCFH assay revealed that ROS was significantly higher in *Gst-pi*-siRNA treatment group at day 3 after transfection (\*\*,  $P < 0.001$ , Figure 3c). At days 3 and 5, the numbers of PCa1 cells were counted after treatment with control, and 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M ethacrynic acid (EA). The suppression of proliferation was statistically significant by treatment of 1  $\mu$ M or 10  $\mu$ M (\*\*,  $P < 0.001$ , Figure 3d). DCFH assay revealed that the concentration dependence of ROS was higher in the EA treatment groups (\*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.001$ , Figure 3e).

モン療法が効かなくなった前立腺癌病巣や骨転移病巣で発現上昇をすることで細胞増殖を促進していることが示唆された。

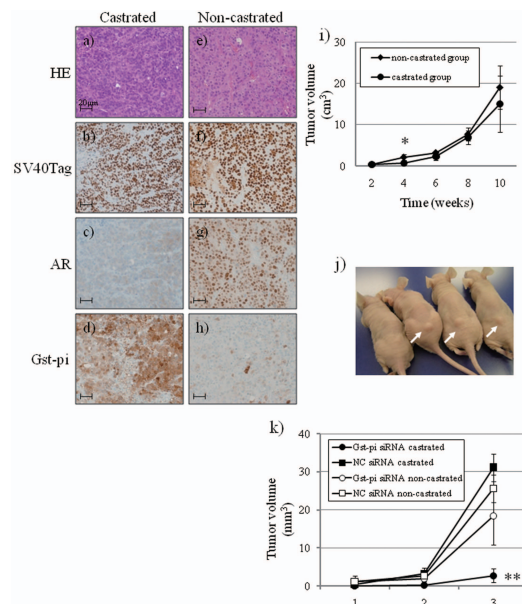


Figure 4. Representative histopathological appearance of subcutaneous PCa1 tumor in nude mice.

Figures 4a-d show the tumors in the castrated mice and the 4e-h show the tumors in the non-castrated mice. SV40 Tag was stained to confirm origin from the TRAP prostate tumor (b, f). Non castrated mice showed nuclear staining of AR (g), whereas castrated mice showed cytoplasmic staining (c), indicating non-active receptor function. The staining of *Gst-pi* was higher in castrated group (d) than in non-castrated group (h). The sequential changes are shown of subcutaneous PCa1 tumor volumes (i) ( $1 \times 10^5$  cells,  $n=4$  each, \*,  $P < 0.05$ ). Representative subcutaneous tumors at 2 weeks after injection in castrated or non-castrated groups (Figure 4k, left: *Gst-pi* siRNA group with castration, second from the left: negative control siRNA group with castration, third from the left: *Gst-pi* siRNA group with non-castration, right: negative control siRNA group with non-castration, white arrow: tumor). Figure 4j shows mean tumor volumes after subcutaneous injections ( $1 \times 10^5$  cells,  $n=5$  each). Interference of *Gst-pi* expression significantly inhibited tumor cell proliferation in castrated group compared with the corresponding negative control siRNA group (\*\*,  $P < 0.001$ ).



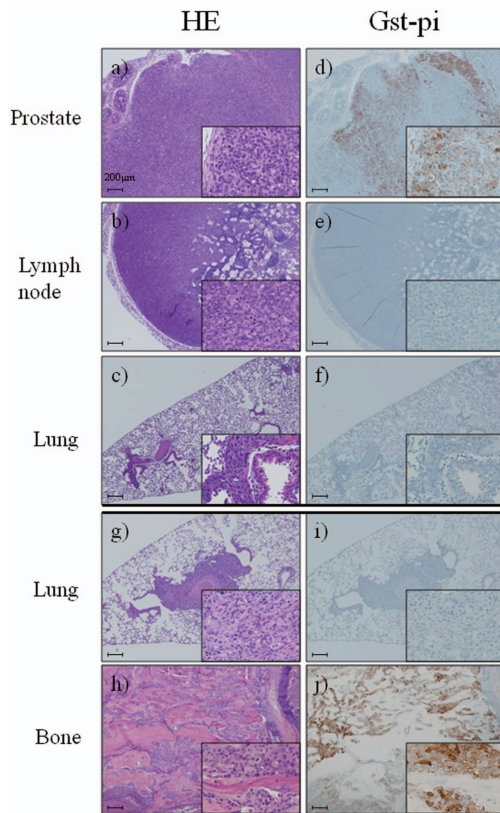


Figure 5. Representative histopathological appearance and immunohistochemical analysis in orthotopic transplantations and tail vein injections of PCa1 cells.

Figures 5a-5f show the prostate tumor and metastatic lesions 6 weeks after orthotopic transplantation of PCa1 in castrated nude mice and 5g-5j show lung and bone metastatic lesions from tail vein injections of PCa1 cells 9 weeks after injection. HE staining showed that all of the tumors and metastatic lesions induced by PCa1 cells are histopathologically similar to human cases, and these lesions are compatible with poorly differentiated adenocarcinomas (a, b, c, g, h). As for the orthotopic model, the staining of Gst-pi in the prostate was higher in castrated mice (d) than in non-castrated mice (data not shown), and metastatic lesions in lymph node (e) and in lung (f) were not detected by Gst-pi staining. In contrast, Gst-pi positive staining in bone metastatic lesions was apparent (j), but in lung metastatic lesions Gst-pi positive staining was not detectable in tail vein injection models (i).

## ま と め

前立腺癌がホルモン療法抵抗性となり、転移をする過程を再現した動物モデルの樹立に成功した。出現する転移病変は病理学的にヒトのそれと類似しているため、癌の進展予防物質などの評価に有用であると思われる。さらにその解析にて、ホルモン療法抵抗性前立腺癌には、Gst-piの発現レベルを調節することで、細胞内酸化ストレスを制御し、増殖を促進するメカニズムが存在することが新たに分かった。Gst-piは診断マーカーとなりうるのみならず、分子標的治療のターゲット遺伝子ともなりうる可能性があり、骨転移巣でGst-piの発現が高いことから、骨転移の治療に有用であると思われる。

## 謝 辞

栄誉ある賞を頂きました名古屋市立大学医学会に心より感謝申し上げます。また、本研究を直接指導頂きました朝元誠人先生（実験病態病理学）、研究の総括をしていただきました郡健二郎先生ならびに、共同研究者の高橋智先生（実験病態病理学）、白井智之先生（実験病態病理学）に深く感謝いたします。

## Reference

1. 国立がんセンターがん対策情報センター. 地域がん登録全国推計による癌罹患データ (1975-2006年) : available at: [http://ganjoho.jp/data/professional/statistics/odjrh3000000hwsa-att/cancer\\_incidence\(1975-2006\).xls](http://ganjoho.jp/data/professional/statistics/odjrh3000000hwsa-att/cancer_incidence(1975-2006).xls); accessed on September 17, 2011.
2. Huggins C. Endocrine-induced regression of cancers. *Cancer Res* 1967; 27 (11): 1925-1930.
3. Shirai T. Significance of chemoprevention for prostate cancer development: experimental in vivo approaches to chemoprevention. *Pathol Int* 2008; 58 (1): 1-16.
4. Shirai T, Takahashi S, Cui L, et al. Experimental prostate carcinogenesis - rodent models. *Mutat Res* 2000; 462 (2-3): 219-226.
5. Singh AS, Figg WD. In vivo models of prostate cancer metastasis to bone. *J Urol* 2005; 174

(3):820-826.

6. Asamoto M, Hokaiwado N, Cho YM, et al. Prostate carcinomas developing in transgenic rats with SV40T antigen expression under probasin promoter control are strictly androgen dependent. *Cancer Res* 2001; 61 (12): 4693-4700.
7. Said MM, Hokaiwado N, Tang M, et al. Inhibition of prostate carcinogenesis in probasin/SV 40T antigen transgenic rats by leuporelin, a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Cancer Sci* 2006; 97 (6): 459-467.
8. Pathak S, Singh R, Verschoyle RD, et al. Androgen manipulation alters oxidative DNA adduct levels in androgen-sensitive prostate cancer cells grown in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2008; 261 (1): 74-83.
9. Nose K. Role of reactive oxygen species in the regulation of physiological functions. *Biol Pharm Bull* 2000; 23 (8): 897-903.
10. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2001; 11 (4): 173-186.
11. Ripple MO, Henry WF, Rago RP, et al. Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89 (1): 40-48.