

—平成17年度 岐阜薬科大学特別研究費（奨励）—

## 前立腺癌細胞におけるアンドロゲンによる thymosin beta4 遺伝子発現調節機序の解明

井口和弘

### 1. 緒言

前立腺癌は欧米では男性で最も頻度の高い癌であり、本邦においても欧米の生活様式の普及および高齢化社会の到来により、その発生率が急増している。もしこのまま増え続けるとすれば、数年後には日本でも欧米と同様、男性の主要な癌になるものと推定され、その対策は急務である。

前立腺癌に対する有効な治療方法の1つに抗アンドロゲン療法がある。この治療法は、治療前の段階の前立腺癌がアンドロゲン依存性の増殖を示すことを利用したものである。すなわち、前立腺癌細胞はアンドロゲンの存在下でのみ増殖が可能であり、体内のアンドロゲンを枯渇させることにより癌の退縮を引き起こすことができる。抗アンドロゲン療法を適応した場合、たとえ末期の前立腺癌患者だとしても約80%以上の患者において数年間の寛解期間が得られる。そのため、抗アンドロゲン療法は手術の適応とならない患者（進行前立腺癌の患者や高齢の患者）に対する第一選択となっている。しかしながら、この治療による制癌効果は一時的であり、高頻度に抗アンドロゲン療法に耐性を示す癌細胞が出現し、数年の後に再燃を来す。抗アンドロゲン療法後の再燃前立腺癌の予後は著しく不良であり、現状では多くの泌尿器科医がその対応に苦慮している。従って、抗アンドロゲン療法耐性前立腺癌をいかに抑えるかは、前立腺癌治療において解決の急がれる重要な課題である。

Thymosin beta4 は癌転移浸潤および血管新生に関わる因子であり、その過剰発現は癌の悪性化に大きな影響を与えると考えられている<sup>1-8)</sup>。本研究では、前立腺癌が抗アンドロゲン療法に耐性を獲得する機序を明らかにすべく、低アンドロゲン環境（培地中のステロイドホルモン除去：抗アンドロゲン療法の1つである去勢を再現した環境）での前立腺癌細胞において発現変化する遺伝子の検索を試み、その結果、thymosin beta4 の発現亢進を見出した。さらに、現在臨床で使用されている各種抗アンドロゲン療法剤（去

勢、エストロゲン剤、アンチアンドロゲン剤、LH-RH 剤）による thymosin beta4 発現変化、およびステロイドホルモンによる thymosin beta4 の発現調節機序の解明を試みた。

### 2. 実験

#### 1) 細胞培養

ヒト前立腺癌細胞由来培養細胞株 LNCaP 細胞および PC-3 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FCS) を含む RPMI-1640 培地で培養した。ステロイドホルモンの影響を検討する際には、FCS の代わりにステロイドホルモンを活性炭処理により除去した FCS (charcoal stripped-FCS (CS-FCS)) を使用した。

#### 2) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

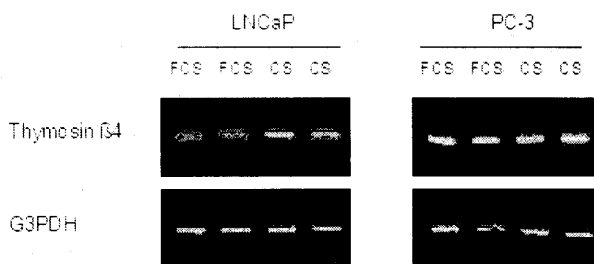
各種抗アンドロゲン療法剤を LNCaP および PC-3 細胞に処理した時の thymosin beta4 遺伝子の発現変化は RT-PCR 法により解析した<sup>9, 10)</sup>。各種薬剤処理した細胞の total RNA を回収後、SuperScript III により一本鎖 complementary DNA (cDNA) を合成し、RT-PCR のサンプルとした。PCR 産物は 0.5 μg/mL の ethidium bromide を含む 1.75% アガロースゲルにて電気泳動し、UV 照射により検出した。また、バンド強度は Scion Image にて定量し、thymosin beta4 遺伝子の発現量を glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) の発現量で補正して求めた。

#### 3) レポータージーンアッセイ

Thymosin beta4 遺伝子の 5'側上流配列-2650/+44 をレポータープラスミド (pGL3-Basic vector) に組み込んだ。遺伝子のトランスフェクションには FuGene6 を使い、添付のプロトコールに従って最適化した条件下にて行った。トランスフェクト効率の補正のため、pRL-TK Renilla ルシフェラーゼベクターをコトランスフェクションした。3日間培養した後、dual-luciferase reporter assay system を使い、添付のプロトコールに従いルシフェラーゼ活性を測定した。

### 3. 結果・考察

**Thymosin beta4 mRNA 発現に及ぼすステロイドホルモンの影響**：アンドロゲン受容体を有する LNCaP 細胞およびアンドロゲン受容体を有しない PC-3 細胞を、ステロイドホルモン除去条件下（CS-FCS 含有 RPMI-1640 培地）およびステロイドホルモン存在下（FCS 含有培地 RPMI-1640 培地）にて培養した。培養 1 日後、2 日後、3 日後の両細胞を回収し、thymosin beta4 mRNA の発現量を RT-PCR 法により測定した。その結果、LNCaP 細胞では、ステロイドホルモン除去条件下で培養した場合、ステロイドホルモン存在下に比べ thymosin beta4 遺伝子の発現亢進が観察された (Fig. 1)。一方、アンドロゲン受容体を有しない PC-3 細胞ではステロイドホルモン除去による thymosin beta4 遺伝子の発現変化は認められなかった (Fig. 1)。また、ステロイドホルモン存在下で培養した場合、PC-3 細胞では LNCaP 細胞に比べ、thymosin beta4 遺伝子の高い発現が認められた。さらに、LNCaP 細胞に合成アンドロゲン剤 R1881 を処理した場合、処理濃度依存的な thymosin beta4 mRNA の発現低下が観察された。これらの結果より、アンドロゲン受容体が thymosin beta4 の発現調節に関与することが示唆された。



**Fig. 1**  
Effect of steroid hormone on thymosin beta4 mRNA expression in prostatic cells.

**Thymosin beta4 mRNA 発現量に及ぼす各種抗アンドロゲン療法剤の影響**：LNCaP 細胞および PC-3 細胞を各種抗アンドロゲン療法剤にて 1 日処理した後の thymosin beta4 mRNA の発現変化を RT-PCR 法により解析した。その結果、合成エストロゲン剤である diethylstilbestrol は、LNCaP 細胞において thymosin beta4 mRNA 発現量の増加を引き起こした。一方で、LH-RH agonist の leuprorelin および抗アンドロゲン剤の flutamide は、LNCaP 細胞の thymosin beta4 の発現量に影響を与えなかった。また、PC-3 細胞は、diethylstilbestrol, leuprorelin, flutamide のいずれの薬剤を作用させた場合においても、thymosin beta4 mRNA 発現量に変化は認められなかった。

**Thymosin beta4 の転写活性に及ぼすステロイドホルモンの影響**：アンドロゲンによる thymosin beta4 遺伝子の発現抑制作用は、転写レベルでの調節で説明できるか否かについて検討するために、thymosin beta4 遺伝子の 5' 上流領域を含むレポーターベクターを LNCaP 細胞にトランスフェクトし、ステロイドホルモン除去条件下およびステロイドホルモン存在下でのルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、ステロイドホルモン除去条件下でのルシフェラーゼ活性は、ステロイドホルモン存在下に比べ、約 4 倍の上昇が観察された。この結果より、thymosin beta4 遺伝子の転写調節にステロイドホルモンが関与している可能性が示唆された。

### 4. まとめ

ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP 細胞をアンドロゲン枯渇環境で維持することにより、癌の悪性化因子の 1 つとされる thymosin beta4 が発現上昇することを見出した。また、この thymosin beta4 の発現亢進はステロイドホルモンによる転写レベルでの調節であることが示唆された。抗アンドロゲン療法後の再燃前立腺癌での thymosin beta4 の発現量に興味を持たれる。

### 5. 参考文献

- 1) Yamamoto T, Gotoh M, Kitajima M, Hirohashi S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 706, (1993).
- 2) Grant DS, Kinsella JL, Kibbey MC, LaFlamme S, Burbello PD, Goldstein AL, Kleinman HK. *J. Cell Sci.*, **108**, 3685, (1995).
- 3) Malinda KM, Goldstein AL, Kleinman HK. *FASEB J.* **11**, 474, (1997).
- 4) Kobayashi T, Okada F, Fujii N, Tomita N, Ito S, Tazawa H, Aoyama T, Choi SK, Shibata T, Fujita H, Hosokawa M. *Am. J. Pathol.*, **160**, 869, (2002).
- 5) Wang WS, Chen PM, Hsiao HL, Ju SY, Su Y. *Oncogene*, **22**, 3297, (2003).
- 6) Wang WS, Chen PM, Hsiao HL, Wang HS, Liang WY, Su Y. *Oncogene*, **23**, 6666, (2004).
- 7) Vigneswaran N, Wu J, Sacks P, Gilcrease M, Zacharias W. *J. Oral Pathol. Med.*, **34**, 77, (2005).
- 8) Goldstein AL. *J. Natl. Cancer Inst.*, **95**, 1646, (2003).
- 9) Iguchi K, Usami Y, Hirano K, Hamatake M, Shibata M, Ishida R. *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 1105, (1999).
- 10) Iguchi K, Otsuka T, Usui S, Ishii K, Onishi T, Sugimura Y, Hirano K. *J. Androl.*, **25**, 154, (2004).