

鹿子木 桂 論文内容の要旨

主 論 文

Androgen-independent proliferation of LNCaP prostate cancer cells infected
by xenotropic murine leukemia virus-related virus

(異種指向性マウス白血病ウイルス類似ウイルスに感染した前立腺癌細胞株
LNCaP はアンドロゲン非依存性増殖を示す)

鹿子木 桂、神山 陽香、泉田 真生、八島 由佳、林 日出喜、山本 直樹、
松山 俊文、井川 掌、酒井 英樹、久保 嘉直

Biochemical and Biophysical Research Communications 447(1): 216-222, 2014

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：酒井 英樹教授)

緒 言

異種指向性マウス白血病ウイルス類似ウイルス (xenotropic murine leukemia virus-related virus, XMRV) はヒトの前立腺癌から分離された新しいガンマレトロウイルスである。現在では、XMRV は前立腺癌の病因ではないと考えられているが、ヒト前立腺癌細胞株は XMRV にしばしば感染している。また、種々のヒト細胞株におけるマウス白血病ウイルス感染の研究によると、前立腺癌細胞株が選択的に XMRV に感染することが明らかとなり、XMRV 感染が前立腺癌細胞株の増殖に有利に働いている可能性が示唆された。この仮説を検証する為、XMRV に感染したアンドロゲン依存性の前立腺癌 LNCaP 細胞を用いて、細胞増殖の特性の変化を詳細に検討した。

対象と方法

細胞：ヒト前立腺癌細胞株 (PC-3 と LNCaP)、ラット F10、ヒト Hela、ヒト 293T を用いた。

レトロウイルス感染：XMRV プラスミド DNA をラット F10 細胞にトランスフェクションし、この細胞培養上清をポリブレン存在下で標的細胞に添加した。両種指向性マウス白血病ウイルス (amphotropic murine leukemia virus, MLV) を含む接種材料は、そのウイルスを恒常的に発現する細胞の上清より採取した。ウイルス感染による LNCaP 細胞のアンドロゲン応答性の変化を検討するために、ジヒドロテストステロン (DHT) およびアンドロゲン受容体 (AR) 拮抗薬ビカルタミドを培地へ添加した。

ウェスタンブロット解析：一次抗体としてマウス抗 β アクチン抗体、ヤギ抗ダイナミン抗体、ウサギ抗ヒトAR抗体、ヤギ抗MLV p30 gag抗体やヤギ抗MLV SU抗体を用いた。二次抗体あるいはprotein G結合ポリペプチドはECLウェスタンブロットティング検出試薬で検出した。

半定量RT-PCR：First-strand cDNAは500 ngのtotal RNAから逆転写酵素を用いて合成し、半定量PCRでXMRV env、ARおよびGAPDHの発現を測定した。

結 果

- 1) XMRV 非感染 LNCaP 細胞は DHT 非存在下では増殖しなかったが、XMRV に慢性的に感染した LNCaP 細胞は DHT 非存在下で増殖し、ビカルタミドでも増殖は抑制されなかった。また、amphotropic-MLV 慢性感染 LNCaP 細胞は DHT 存在下でも増殖せず、amphotropic-MLV 感染は LNCaP 細胞に対して細胞毒性がある事が示唆された。XMRV 感染後 1-2 カ月において LNCaP 細胞の DHT 依存性増殖が低下し、2-3 カ月では DHT 非存在下での LNCaP 細胞数は DHT 存在下と同等であった。このことから、LNCaP 細胞のアンドロゲン非依存性への転換には XMRV 感染後少なくとも 2 カ月を要することが示唆された。一方、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 PC3 の増殖は XMRV 感染の影響を受けなかった。
- 2) ウェスタンブロット解析の結果、XMRV 感染 LNCaP 細胞における AR 蛋白の発現は時間とともに低下し、感染後 3 か月以上になると発現が消失した。つまり、AR 発現の低下はアンドロゲン非依存性増殖と一致していた。また RT-PCR では、LNCaP 細胞への XMRV の感染が 3 カ月を越えると AR の mRNA 発現が消失していた。
- 3) 感染 LNCaP 細胞における XMRV の Gag と Env 蛋白の発現を検討した。XMRV Gag 蛋白は感染後徐々に発現が減少し、LNCaP 細胞のアンドロゲン非依存性増殖への転換と経時的に関連していた。同様に、XMRV Env 蛋白も感染後 3 カ月を越えるとその発現が消失した。慢性感染 LNCaP 細胞のゲノムに組み込まれた XMRV 配列の総量は感染後 1 か月以内の LNCaP 細胞と同等であり、XMRV 感染細胞は継代中も維持されていた。ただし、XMRV 感染が 3 カ月を越えた LNCaP 細胞での XMRV RNA レベルは感染 1 か月以内と比較して低かった。

考 察

これまでに、XMRV が LNCaP 細胞の増殖および浸潤能を亢進させるとの報告があるものの、同細胞のアンドロゲン依存性については検討されていなかった。しかし、今回の研究から、XMRV 感染によって LNCaP 細胞がアンドロゲン依存性から非依存性へ形質転換するとともに AR の発現が減少することが明らかとなった。つまり、XMRV 感染が AR を介さない LNCaP 細胞増殖を誘導することが示唆された。また、このような現象は amphotropic-MLV 感染ではみられず、XMRV に特異的であると考えられた。

これまでに多数のヒト癌細胞株がヌードマウスに移植されてきたが、前立腺癌細胞では選択的にマウス白血病ウイルスに感染していることが知られている。この前立腺癌細胞でみられる XMRV 感染の傾向は、今回我々が明らかにした XMRV を介する前立腺癌細胞のアンドロゲン非依存性増殖によって説明できるかもしれない。さらに、臨床的大きな課題である去勢抵抗性前立腺癌の生物学的特性を理解する上で、その機序の解明が重要である。