

主論文

The Downregulation of the Expression of CD147 by Tumor Suppressor REIC/Dkk-3, and Its Implication in Human Prostate Cancer Cell Growth Inhibition

(腫瘍抑制因子 REIC/Dkk-3 による CD147 の発現低下とヒト前立腺癌細胞増殖抑制の関連性)

[緒言]

CD147 (EMMPRIN と呼ばれる) は、前立腺癌を含む多くの充実性腫瘍で、腫瘍形成や増大、浸潤・転移の促進において鍵となる役割をしていることが報告されている。CD147 は癌細胞の表面に高率に発現しており、マトリックスメタロプロテナーゼ分泌を誘導し、隣接した線維芽細胞や癌細胞を刺激することで癌細胞の浸潤を容易にし、また脈管形成や多種薬剤抵抗を引き起こす導管内皮成長因子やヒアルロنانの発現に関与し、浸潤・転移や癌進行に関与する。臨床研究及び基礎研究に基づく報告から、CD147 は癌を進行させ悪化させる重大な分子であり、制癌治療のための魅力的なターゲットといえる。

我々は腫瘍を抑制する REIC/Dkk-3 遺伝子をコードしたアデノウイルスベクター (Ad-REIC) を開発した。REIC/Dkk-3 は腫瘍抑制遺伝子であり、ヒト悪性腫瘍の遺伝子治療に有用であると考えられる。Ad-REIC は細胞内小胞体 (ER) stress signaling による c-Jun-NH2-kinase (JNK) の活性により前立腺癌の癌細胞特異的アポトーシスを誘導するとの報告がある。様々なタイプの癌細胞の増殖抑制や浸潤抑制の観点においても Ad-REIC の治療的な効果が認められているが、Ad-REIC の治療効果に関し、その根底にある作用機序については未だ明らかでない部分がある。Ad-REIC 剤を用いた遺伝子治療の分子機序を明らかにするために、我々は Ad-REIC 治療の CD147 の発現への効果及びその発現分子機序の動態について解析した。

[材料と方法]

細胞と細胞培養

ヒト前立腺癌細胞ライン (PC-3, LNCaP, Du145) と子宮頸癌細胞 (HeLa) は購入した。マウス前立腺癌細胞ライン (RM9) は MD アンダーソン癌センターから提供されたものを使用した。ヒト正常前立腺上皮細胞 (PrEC) は Lonza 社から購入した。

Ad-REIC の作製

Ad-REIC ベクターの作製では、pShuttle-SGE-REIC プラスミドを制限酵素 I-CeuI と PI-SceI によって消化し、Adeno-X Viral DNA に挿入した。LacZ 遺伝子をもつアデノウイルスベクター (Ad-LacZ) をコントロールとして使用した。アデノウイルスのベクターは、複製欠損アデノウイルス (5型) を使って作製した。

ウェスタンブロット法

細胞を平底の 6-well plate において 24 時間培養し、その後サンプルを抽出した。一次抗体の CD147 抗体 (EPR4052, abcam, Cambridge, UK)、REIC/Dkk-3 抗体 (我々のラボで作製、マウスモノクローナル抗体) と Cell Signaling Technology 社の抗体 (Phospho-p38 MAPK (cat. #4511)、Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (#4370)、Phospho-JNK (#9251)、Phospho-c-Jun (#2361)、c-Myc (#9402)、Phospho-GSK-3 β (#9323)、 β -Actin (#4967)) を使用した。

細胞増殖アッセイ

LNCaP細胞 (5.0×10^5 cells)を平底の6-well platesに播種し24時間培養した。細胞にAd-LacZまたはAd-REICを100 MOIで添加し0.5mlの完全培地で1時間培養し、その後1.5mlの培地を追加してさらに24時間培養した。培地交換により細胞死を起こして浮上した細胞を除去した後、生着細胞をトリプリンで剥がし、血球計で生存細胞数として測定した。

[結果]

正常前立腺上皮細胞と前立腺癌細胞における CD147 の発現

ヒト正常前立腺細胞 (PrEC)を含む前立腺由来の細胞についてCD147の発現について調べた。使用した抗CD147抗体が、ヒトとマウス双方のCD147蛋白質に反応することは以前の研究で確認済である。CD147蛋白質の3つのバンドは分子量40-60 kDaであった。これはCD147蛋白質の大きさが異なれば複数のバンドを示すという以前の報告と矛盾しない。LNCaP癌細胞において強いCD147発現がみられ、PC-3、Du145及びHeLa細胞では比較的弱い発現がみられた。PrECとマウス前立腺癌RM9細胞の発現レベルは最小であった。

Ad-REIC添加により前立腺癌LNCaP細胞でのCD147発現が抑制された

Ad-REIC投与後のLNCaP細胞におけるCD147の発現をみるため、ウェスタンブロット法を施行した。Ad-REICのtransfection効率がほぼ100%であることは以前の研究で確認済である。Ad-REIC処置後にREIC/Dkk-3蛋白質は強く発現し、そのバンドの分子量は60-70kDaであった。コントロールに比べAd-REIC添加後のLNCaP細胞におけるCD147の発現は、顕著に抑制された。

Ad-REICはLNCaP前立腺癌細胞の増殖を有意に阻害した

Ad-REICによる癌細胞増殖抑制効果を調べるため、培養したLNCaP細胞にAd-REICを添加した。投与後の細胞はコントロールに比べアポトーシスを起こす傾向を認めた。In vitroの細胞増殖アッセイにより、Ad-REIC添加後ではコントロールに比べ生存細胞数が有意に減少した結果となり、Ad-REICが前立腺癌細胞の増殖を抑制したことが示された。

MAPKシグナル経路やc-Mycとは別に、Ad-REICはCD147の発現を抑制した

CD147遺伝子の発現に関し、その転写調節のためのシグナル経路がいくつか報告されている。CD147の発現がp38-、Erk1/2-とJNK-によるMAPKシグナル経路とc-Myc蛋白質(転写調節因子)によりコントロールされていることから、Ad-REIC添加後のCD147の発現レベルとの相関をみるべく、リン酸化MAPKs及びc-Mycの発現動態をウェスタンブロット法により解析した。更に、JNK依存性のシグナル経路がAd-REICによる細胞増殖抑制効果において重要と考え、リン酸化JNKとその下流分子であるc-Junの発現レベルにも注目した。

LNCaP細胞にてAd-REIC添加後にREIC/Dkk-3蛋白質の発現を確認したが、CD147の発現低下とMAPKシグナル経路及びc-Mycの発現動態には予想された相関は見られなかった。また、c-Mycのシグナル経路で調節されるリン酸化GSK-3 β の発現レベルを調べたが、その発現動態とCD147の発現低下にも相関は見られなかった。MAPKシグナル経路のうちリン酸化p38に関してはAd-REIC投与後に上昇しており、Ad-REIC投与による細胞死誘導に対して内因性の当該経路が細胞生存に働くべく活性化されたものと考えられた。更に、リン酸化JNK及びc-Junの発現レベルはAd-REIC添加後にも関わらず上昇せず、JNKシグナル経路はLNCaP前立腺癌細胞ではAd-REICにより活性化されなかった。

[考察]

今回の研究で、ヒト前立腺癌細胞にAd-REICを添加すると細胞増殖が有意に抑制され、ウェスタンブロットでは癌進行・悪化因子CD147が発現低下することが明らかとなった。従来のヒト前立腺癌細胞PC-3を用いた研究では、Ad-REIC添加によりERストレスに基づくJNK活性化が認められることが報告されているが、本実験ではJNKの活性化が認められなかった。このことは、癌細胞の種類によってはAd-REICはJNKシグナル経路を活性化せずに、すなわちLNCaP細胞ではAd-REICにより、JNK活性化を示すPC-3細胞とは異なる機序で細胞死誘導及び細胞増殖抑制が誘導されることを示唆している。これらの結果を踏まえるとAd-REICを添加したLNCaP細胞においては、CD147蛋白質の

発現抑制が一つの機序となって、癌細胞増殖抑制が誘導された可能性も示唆された。

一方、本研究ではCD147の発現を制御する複数のシグナル経路の動態を解析したが、予想された関連性は認められず、その解明に結びつく所見は得られなかった。Ad-REICの添加及びREIC/Dkk-3蛋白質の強制発現によるCD147の発現抑制については、MAPKシグナル経路やc-Mycの抑制とは別の未知のシグナル経路が存在する可能性がある。諸家の報告では、NF- κ Bに関するシグナル経路がCD147の発現に関与したとの研究もあり、今後解析に値する。さらに、細胞外に分泌されたREIC/Dkk-3蛋白質がCD147の発現を抑制した可能性もあり、今後、解析を継続する予定である。

【結論】

本研究は、前立腺癌細胞においてAd-REICによるCD147の発現低下を示した初めての研究であり、Ad-REICの治療効果の一部が、癌進行・悪化因子CD147の発現低下に起因する可能性がある。