

前立腺癌細胞株におけるステロイドホルモン代謝とグルクロン酸抱合活性につ

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9476

前立腺癌細胞株におけるステロイドホルモン代謝と グルクロン酸抱合活性について

金沢大学医学部医学科泌尿器科学講座 (主任: 並木幹夫教授)

金 谷 二 郎

副腎性ステロイドは前立腺あるいは末梢アンドロゲン標的細胞内におけるアンドロゲンの供給源と考えられている。ヒト前立腺癌細胞株を用いて副腎性ステロイド [アンドロステンジオン (androstenedione, Δ^4 -dione) およびデヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHEA)] の代謝活性について検討した。前立腺癌細胞株はアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 PC-3, DU145 とアンドロゲン依存性株 LNCaP を用いた。さらに、グルクロン酸抱合活性および硫酸抱合活性についても検討した。副腎性ステロイド代謝については、PC-3, DU145 ではより安定した DHEA プールに移行する傾向が強く、LNCaP では DHEA プールから動員され、 Δ^4 -dione \rightarrow テストステロン \rightarrow ジヒドロテストステロン (dihydrotestosterone, DHT) 経路へ優位に変移していた。さらに LNCaP はアンドロゲンをグルクロン酸抱合物に変換するが、PC-3, DU145 にはその活性を認めなかった。硫酸抱合に関しては今回使用したすべての細胞株にその活性を認めなかった。またグルクロン酸転移酵素 (uridine diphospho-glucuronosyltransferase, UGT) のアイソザイム UGT2B 特異的な逆転写-PCR においても、LNCaP のみに発現していた。さらに、その酵素活性を酵素反応速度論的に検討したところ、DHT はテストステロンと比較して、より親和性が高いことが示された。以上より、LNCaP において副腎性アンドロゲン前駆体の代謝はアンドロゲンを生成する方向に変移していることが判明した。アンドロゲン除去条件下において、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞はグルクロン酸抱合活性を上昇させることにより、DHEA プールから DHT を生成し、生存、増殖に必要な細胞内アンドロゲンレベルを維持していることが推測された。これらの成績より、LNCaP における UGT は細胞内活性アンドロゲン濃度を調節している可能性が示唆された。

Key words prostatic cancer, LNCaP, adrenal steroids, glucuronidation, intracrine

正常前立腺、前立腺肥大症、初期の前立腺癌はアンドロゲン依存性に増殖する^{1)~3)}。したがって前立腺癌患者の初期ホルモン療法として抗アンドロゲン療法が選択されている。おもなアンドロゲンであるテストステロンは95%以上が精巣で生成され⁴⁾、これを除去するために去勢術が一般に施行されている。またネガティブフィードバックによる下垂体前葉ホルモンの分泌抑制を目的とした、女性ホルモン剤の投与⁵⁾、ステロイドホルモン標的細胞内におけるアンドロゲン受容体 (androgen receptor, AR) 結合を阻止するため、その拮抗薬の投与⁶⁾、下垂体前葉ホルモンの枯渇を目的とした、黄体化ホルモン放出ホルモンアゴニストの投与などが行われている⁷⁾。ヒトは副腎からアンドロゲン前駆体であるデヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHEA) を多量に分泌し、循環血液中にはその硫酸抱合物が高濃度に存在する。したがって、アンドロゲン除去において副腎性アンドロゲンの存在も無視できないとして、今日ほとんどの前立腺癌患者に全アンドロゲン遮断 (total androgen blockade, TAB) 療法が施行されている。Labrie

ら^{8)~11)}は標的細胞内においてステロイドホルモンを活性化する代謝系を指摘し、その機構をイントラクリン (intracrine) と名づけた。主に副腎より分泌される DHEA, アンドロステンジオン (androstenedione, Δ^4 -dione), また精巣に由来するテストステロンが前立腺に至り、前立腺の細胞内において最もアンドロゲン活性の高いジヒドロテストステロン (dihydrotestosterone, DHT) に変換される^{12)~17)}。この活性アンドロゲンは細胞内で AR に作用して効果を発現する。TAB 療法は前立腺癌患者の約 80% に奏効するが、12~18ヶ月後にはホルモン療法抵抗性に変化してゆく⁸⁾。その原因として以下の4つの機序が推測されている。すなわち1として前立腺癌は多様な程度のアンドロゲン依存性を持つ細胞集団であり、抗アンドロゲン療法によってアンドロゲン濃度の低い条件下でも増殖可能な細胞群が残存すること⁸⁾、2として AR が変異すること^{18)~20)}、3として細胞内ステロイドホルモン代謝経路が変化すること²¹⁾、4として成長因子の新たな経路が発現すること^{22)~24)}である。

本研究の目的はアンドロゲン感受性の異なる前立腺癌細胞株

平成12年1月27日受付, 平成12年3月24日受理

Abbreviations: AR, androgen receptor; DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEA-S, DHEA sulfate; DHT, dihydrotestosterone; FBS, fetal bovine serum; RT, reverse transcription; TAB, total androgen blockade; TLC, thin layer chromatography; UGT, uridine diphospho-glucuronosyltransferase; Δ^4 -dione, androstenedione

における副腎性アンドロゲン代謝の差異を明らかにすることである。さらにアンドロゲンを不活性化、水溶化するグルクロン酸抱合²⁵⁾²⁶⁾、硫酸抱合活性²⁷⁾の測定を行い、培養条件の違いによるグルクロン酸抱合活性の変化について検討した。

材料および方法

I. 培養細胞株

本研究に用いた前立腺癌細胞株は、ヒト前立腺癌骨転移由来のPC-3、ヒト前立腺癌脳転移由来のDU145、ヒト前立腺癌リンパ節転移由来のLNCaPであり、すべて大日本製薬(大阪)から購入した。PC-3、DU145、LNCaPは最終濃度が10%ウシ胎児血清(fetal bovine serum, FBS)(Sigma, St Louis, USA)、2 mM グルタミン酸(日本製薬、東京)となるようにRPMI-1640培地(Sigma)を調製し、湿潤37°C、5% CO₂条件下で培養した。

II. ステロイドホルモン代謝

35 mm プラスチック培養プレート(岩城硝子、船橋)に前立腺癌細胞株を2 mlのRPMI-1640培地に1×10⁶個播種し、湿潤37°C、5% CO₂条件下において約48時間培養した。90%コンフルエントに達した段階で、最終濃度100 nMの¹⁴C-Δ⁴-dione (2.0 GBq/mmol, DuPont, Wilmington, USA)、又は¹⁴C-DHEA (2.0 GBq/mmol, DuPont)を含む新鮮培地に交換し、湿潤37°C、5% CO₂条件下に4時間静置した。その後培養液を全量採取し、以下の分析を行うまでの間、-20°Cで凍結保存した。

III. 薄層クロマトグラフィーによる分析

1. 疎水性ステロイドホルモンの分析

採取した培地に2倍量の酢酸エチル(ナカライテスク、京都)を加え振盪混和し、有機相と水相に分離した。有機相には培地中の疎水性ステロイドホルモンが移行する。有機相を留去後、残渣をメタノール(ナカライテスク)に溶解、薄層クロマトグラフィー(thin layer chromatography, TLC)(J.T. Baker, Phillipsburg, USA)プレート上で展開した。展開液は酢酸エチル:クロロホルム(ナカライテスク)=1:3を用いた。TLCプレートを十分乾燥させた後、バイオイメージングアナライザーBAS-2000(富士フィルム、東京)を用いて放射能を解析し、X線フィルム(Eastman Kodak, Rochester, USA)への露光も行った。

2. アンドロゲン代謝産物の同定

放射性標準物質としてΔ⁴-dione, DHEA, テストステロン, アンドロステジオール, DHT, アンドロスタンジオン, アンドロステロンをDupont社より購入した。1.と同様の条件で展開、解析を行い、R_f値を決定した。各物質の値は以下のとおりである。Δ⁴-dione (R_f=0.83), DHEA (R_f=0.69), テストステロン (R_f=0.60), アンドロステジオール (R_f=0.51), DHT (R_f=0.74), アンドロスタンジオン (R_f=0.92), アンドロステロン (R_f=0.34)。各バンドは独立しており、前記物質は同定可能であった。

3. グルクロン酸抱合されたステロイドホルモンの分析

¹⁴C-テストステロンまたは¹⁴C-DHTを基質にし、水相に移行した基質を真空乾燥機(久保田製作所、東京)によって乾燥させ、1 mlのリン酸カリウム緩衝液(Sigma), 200単位のβ-グルクロニダーゼ(Sigma)を加えて37°C、24時間振盪し、グルクロン酸抱合体を分解した。その後酢酸エチルを加え、振盪混和した後10分間静置して、有機相と水相に分離した。有機相を留去し、残渣をメタノールで溶解後、再度TLCを用いて展開し

た。BAS-2000を用いて放射能を測定し、X線フィルムへの露光も行った。回収率は85%~95%であった。

4. 基質反応時間の決定

LNCaPに基質として100 nMの¹⁴C-テストステロンを2, 4, 6, 8時間作用させ、生成する¹⁴C-テストステロングルクロン酸抱合物を3.と同様の方法を用いて測定した。グルクロン酸抱合物の生成が直線的に増加する時間を求め、以下の実験の基質作用時間とした。

IV. UGT活性の酵素反応速度論的検討

酵素反応速度を決定するために35 mm プラスチック培養プレートにLNCaPを1×10⁶個播種し、湿潤37°C、5% CO₂条件下にて約48時間培養した。90%コンフルエントに達した段階で10 nMの¹⁴C-テストステロン、¹⁴C-DHTと10, 20, 65, 90, 230, 490 nMの非放射性テストステロン(Sigma), DHT(Sigma)を加え競合させ、4時間静置し、培養液を全量採取した。2倍量の酢酸エチルを加えて有機相と水相に分離し、水相を分取した。水相を真空乾燥機によって乾燥させ、1 mlのリン酸カリウム緩衝液、200単位のβ-グルクロニダーゼを加えて37°C、24時間振盪し、グルクロン酸抱合体を分解した。有機相を留去後、残渣をメタノールで溶解、TLCで分離し、BAS-2000を用いて放射能を測定した。測定結果をコンピュータ(Dell, Round rock, USA)に入力し、ソフトウェアEnzfitter(Biosoft, Cambridge, UK)を用いてミカエリス定数K_m、触媒定数k_{cat}を計算した。このソフトウェアはミカエリス-メンテンの式に基づいている。

V. 硫酸抱合されたステロイドホルモンの分析

水相を真空乾燥機によって乾燥させ、1 mlのリン酸カリウム緩衝液、2単位のサルファターゼ(Sigma)を加えて37°C、24時間振盪し、硫酸抱合体を分解した。その後酢酸エチルを加え振盪混和し、有機相と水相に分離した。有機相を留去後、残渣をメタノールで溶解、TLCで分離し、BAS-2000を用いて放射能を測定した。X線フィルムへの露光も行った。

VI. RNA抽出と逆転写(reverse transcription, RT)-PCR

1. 全RNA抽出

培養細胞株からISOGEN(ニッポンジーン、富山)を用いて全RNAを抽出した。35 mm プラスチック培養プレートに前立腺癌細胞株を1×10⁶個播種し、湿潤37°C、5% CO₂条件下で約48時間培養した。90%コンフルエントに達した段階で培養液を除去し、PBS(Sigma)で洗浄した後、4°C、1 mlのISOGENを加えて5分間静置して細胞を溶解した。4°C、12,000回転/分で15分間遠心し、上清を採取、0.5 mlのイソプロピルアルコール(ナカライテスク)を加えた。室温で10分間静置後、4°C、12,000回転/分で10分間遠心した。上清を除去した後、1 mlの75%エタノールを加え攪拌後、4°C、7,500回転/分で5分間遠心し、再び上清を除去し10分間減圧乾燥した。超純水生成装置Milli-Q gradient A10(Millipore, Bedford, USA)より得られた超純水をジエチルピロカーボネート(Sigma)処理し、前述の操作により得られたRNAを25 μlの超純水に溶解した。RNA溶解液の260 nmにおける吸光度を測定し、1 ODを40 μg/mlとしてRNA濃度を計算した。

2. プライマーの作製

グルクロン酸転移酵素(uridine diphosphoglucuronosyltransferase, UGT)のアイソザイムUGT2B、β-アクトニンに対するmRNA検出用プライマーとして以下のオリゴ

DNAを合成した(北海道システムサイエンス, 札幌). 535 bpのUGT2B遺伝子を特異的に増幅するPCRプライマーとしてセンスプライマー5'-CCTTGCCAGATCCCACAAA-3'とアンチセンスプライマー5'-TATCACAGTTGCCACGCAGG-3'をヒトUGT2B遺伝子cDNAの塩基配列より選択した. 592 bpの β -アクトニン遺伝子を特異的に増幅するPCRプライマーとしてセンスプライマー5'-GAAAATCTGGCACCACACCTT-3'とアンチセンスプライマー5'-GTTGAAGGTAGTTTCGTGGAT-3'をヒト β -アクトニン遺伝子cDNAの塩基配列より選択した.

3. RT-PCRによるUGT2B mRNA発現の定量

UGT2B mRNA発現の定量のため, RT-PCRを用いた. RT反応は, Promega社 (Madison, USA) のcDNA合成キットを用いて行った. すなわち1 μ gの全RNAからオリゴd (T)₃₀をプライマーとして逆転写酵素にてcDNAを合成した. 次にUGT2Bに対するプライマー対を用いて, Taqポリメラーゼ (宝酒造, 京都) にて特異的cDNAの増幅を行った. PCR反応はPerkin-Elmer/Cetus社 (Norwalk, USA) DNA thermal cyclerを使用した. 至適アニーリング温度を決定した後に, 94°Cで3分間熱変性後, 94°C 45秒, 57°C 45秒, 72°C 1分30秒の3ステップを30サイクル行い, 最後に72°C 10分を追加した. 増幅後のPCR産物はエチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲルで電気泳動し, 紫外線照射装置を用いて検出した. 内部対照として β -アクトニンのPCRを行った. RT-PCRで検出されたバンドが特異的であることを確認するために, PCR産物の一部を適当な制限酵素で切断してエチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲルで電気泳動し, 予想される分解産物が検出されることを確認した.

4. 半定量的RT-PCR

前立腺癌細胞株から抽出した全RNA 1 μ gより合成したcDNAに対して, UGT2B特異的プライマーと β -アクトニン特異的プライマーを用いて半定量的PCRを行った. すなわち94°Cで3分間熱変性後, 94°C 45秒, 57°C 45秒, 72°C 1分30秒の3ステップを15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36サイクル行い, 最後に72°C 10分を追加した. 増幅されたPCR産物を, エチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲルにて電気泳動し, 紫外線照射装置を用いて検出した. 画像解析装置バイオプロフィール

(Vilber Lourmat, Paris, France) にてバンドの蛍光強度を測定し, UGT2Bの強度と内部対照 β -アクトニンの強度の比を求めた.

Ⅶ. ステロイド除去FBS添加RPMI-1640培地の調製

1. デキストラン被覆活性炭懸濁液の調製

超純水50 mlに活性炭(和光純薬, 大阪) 0.5 gを加えよく混和し活性炭懸濁液を作った. また同様に超純水50 mlにデキストラン (Dextran T70, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 0.05 gを加えよく混和しデキストラン懸濁液を作った. 両者を混和し, 4°C 24時間静置してデキストラン被覆活性炭懸濁液とした.

2. ステロイド除去FBS, ステロイド除去培地の調製

デキストラン被覆活性炭懸濁液を3,000回転/分, 10分間遠心分離して上清を除去した後, FBSを加えて振盪混和し, 4°C, 20分間静置した. 0.22 μ m フィルター (Millipore) を用いて濾過し, ステロイド除去FBSとした. 最終濃度が10%ステロイド除去FBS, 2 mMグルタミン酸となるよう調製し, ステロイド除去RPMI-1640培地とした.

3. ステロイド除去条件下でのLNCaPの培養

アンドロゲン依存性のLNCaPについてはステロイド除去RPMI-1640培地にて湿潤37°C, 5% CO₂条件下で培養しているものも用意し, 酵素反応速度論的検討, RT-PCRによるmRNA発現の検討に使用した.

Ⅷ. 統計処理

すべての実験は5回施行し, 測定値を平均値±標準誤差で示した.

成 績

I. ヒト前立腺癌細胞株における副腎性ステロイドホルモン代謝

1. ヒト前立腺癌細胞株における¹⁴C- Δ^4 -dioneを基質とした代謝

各々の前立腺癌細胞株において100 nMの¹⁴C- Δ^4 -dioneを基質とした場合の代謝産物のクロマトグラムを図1に示し, 定量結果を表1に示す. アンドロゲン非依存性であるPC-3, DU145は主にDHEA, DHT, アンドロスタンジオンを生成した. PC-3の有機相に含まれる代謝産物の全代謝産物に占める割合はそれぞれ21.46±0.33%, 26.78±0.31%, 22.97±0.48%であった.

Table 1. Metabolism of ¹⁴C-androstenedione formed by prostatic cancer cell lines

Substrate and metabolites	PC-3 (%)	DU145 (%)	LNCaP (%)
¹⁴ C-Androstenedione*	5.24±0.10	3.81±0.04	24.58±0.62
Metabolites			
DHEA	21.46±0.33	16.10±0.21	12.40±0.21
Androstenediol	2.23±0.03	4.81±0.12	ND
Testosterone	4.24±0.07	4.97±0.08	6.46±0.07
DHT	26.78±0.31	17.87±0.09	9.74±0.13
Androstenedione	22.97±0.48	19.11±0.15	18.32±0.29
Androsterone	ND	ND	ND
Total radioactivity	6584±99†	6703±76†	3027±42†

DHEA, dehydroepiandrosterone; DHT, dihydrotestosterone; ND, not detected.

* Substrate; † Total arbitrary value of radioactive intensity.

Values present \bar{x} ±SEM (n=5).

DU145においてはそれぞれ $16.10 \pm 0.21\%$, $17.87 \pm 0.09\%$, $19.11 \pm 0.15\%$ であった。アンドロゲン依存性であるLNCaPはテストステロン ($6.46 \pm 0.07\%$), DHEA ($12.40 \pm 0.21\%$), DHT ($9.74 \pm 0.13\%$) を生成するが有機層全体の放射能が低下しており, PC-3, DU145の有機相全体の放射能と比較すると約半量であった。LNCaPの ^{14}C - Δ^4 -dione代謝産物は水相に移行していることが予想された。

2. ヒト前立腺癌細胞株における ^{14}C -DHEAを基質とした代謝

各々の前立腺癌細胞株において100 nMの ^{14}C -DHEAを基質とした場合の代謝産物のクロマトグラムを図2に示し, 定量結果

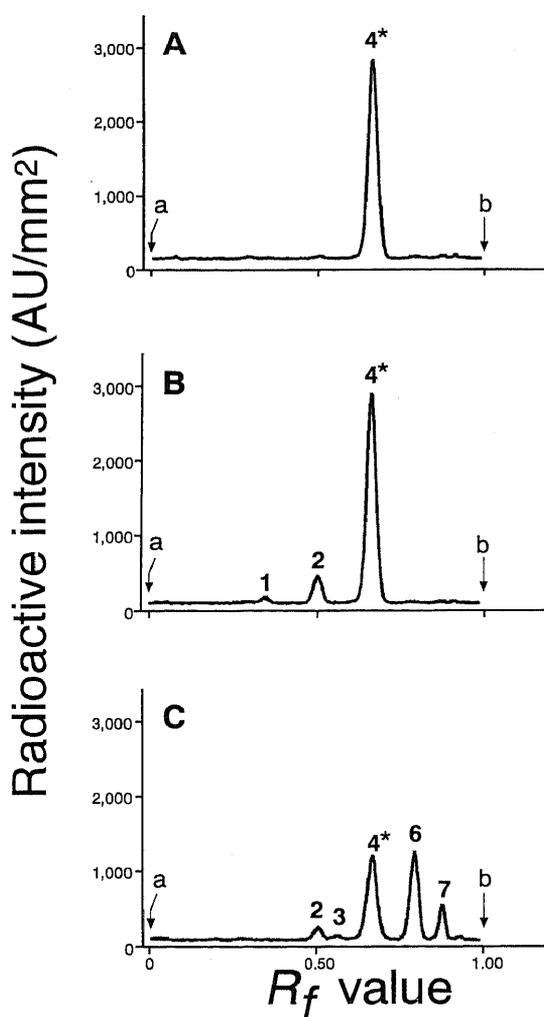


Fig. 1. ^{14}C -androstenedione metabolic profile shown in thin layer chromatography (TLC) and radioactivity detection. PC-3, DU145, LNCaP were incubated with ^{14}C -androstenedione (100 nM) as substrate for 4 hr. Metabolites were extracted with ethylacetate and separated by TLC using solvent system of chloroform:ethylacetate (3:1). (A) PC-3. (B) DU145. (C) LNCaP. (a), Origin; (b), Solvent front; *, substrate. Metabolite (R_f value): 1, androsterone ($R_f=0.34$); 2, androstenediol ($R_f=0.51$); 3, testosterone ($R_f=0.60$); 4, dehydroepiandrosterone ($R_f=0.69$); 5, dihydrotestosterone ($R_f=0.74$); 6, androstenedione ($R_f=0.83$); 7, androstenedione ($R_f=0.92$).

を表2に示す。3細胞株全てにおいて未代謝物が多く検出された。PC-3ではほぼ未代謝物のみが検出され, DU145においても代謝活性が低く, アンドロステジオール ($14.56 \pm 0.26\%$) が一部検出された。一方LNCaPにおいては Δ^4 -dione ($32.01 \pm 0.25\%$), アンドロステジオール ($8.75 \pm 0.16\%$), テストステロン ($5.40 \pm 0.12\%$), アンドロステジオン ($33.74 \pm 0.09\%$) が検出された。有機層全体の放射能の減少については Δ^4 -dioneを基質にした場合に比べ, わずかであった。

以上 ^{14}C - Δ^4 -dione, ^{14}C -DHEAを基質にした場合のPC-3, DU145, LNCaPの副腎性ステロイド代謝について図3に図式化した。

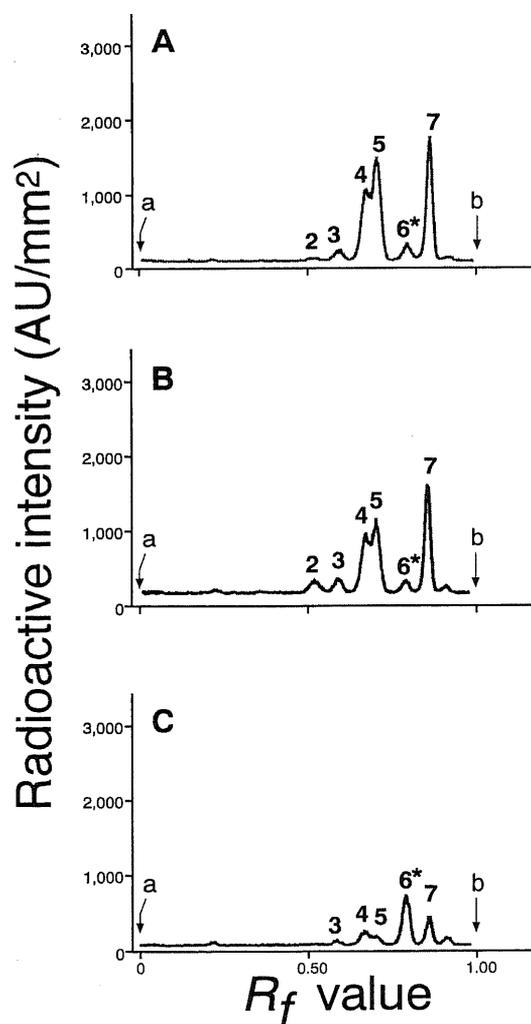


Fig. 2. ^{14}C -dehydroepiandrosterone metabolic profile shown in thin layer chromatography (TLC) and radioactivity detection. PC-3, DU145, LNCaP were incubated with ^{14}C -dehydroepiandrosterone (100 nM) as substrate for 4 hr. Metabolites were extracted with ethylacetate and separated by TLC using solvent system of chloroform:ethylacetate (3:1). (A) Metabolic profile of PC-3. (B) DU145. (C) LNCaP. (a), Origin; (b), Solvent front; *, substrate. Metabolite (R_f value): 1, androsterone ($R_f=0.34$); 2, androstenediol ($R_f=0.51$); 3, testosterone ($R_f=0.60$); 4, dehydroepiandrosterone ($R_f=0.69$); 5, dihydrotestosterone ($R_f=0.74$); 6, androstenedione ($R_f=0.83$); 7, androstenedione ($R_f=0.92$).

II. グルクロン酸抱合活性, 硫酸抱合活性の検討

1. LNCaPのグルクロン酸抱合活性の経時的検討

LNCaPに基質として¹⁴C-テストステロンを作用させ、生成される¹⁴C-テストステロングルクロン酸抱合物の全放射能に占める割合を経時的に測定した結果を図4に示す。グルクロン酸抱合物の生成が直線的に増加するのは4時間以前であり、以下の実験の基質作用時間を4時間とした。

2. ヒト前立腺癌細胞株におけるアンドロゲンのグルクロン酸抱合活性の検討

各々の前立腺癌細胞株における100 nMの¹⁴C-テストステロンを基質とした場合の代謝産物の分析結果を図5に示す。LNCaPにおける有機相全体の放射能の減少は著明であり大部分は水相に移行していると示唆された(図5A)。この水相をβ-グルクロニダーゼ処理し、グルクロン酸抱合体を加水分解して酢酸エチ

ルにて再抽出を行ったところ、LNCaPの水相よりテストステロン、DHTが検出された(図5B)。一方PC-3、DU145の水相に同様の処理を行ったが明らかな放射能は検出されなかった(図5B)。LNCaPにおいて明らかなグルクロン酸抱合活性を認め、PC-3、DU145においてはほとんど認めなかった。

3. ヒト前立腺癌細胞株におけるアンドロゲンの硫酸抱合活性の検討

グルクロン酸抱合活性の検討と同様の操作にて得られた水相に、サルファターゼを作用させた後、酢酸エチルで再抽出を行ったが、いずれの細胞株においても放射能は検出されなかった。今回使用した前立腺癌細胞株には硫酸抱合活性が存在しないことが示された。

4. LNCaPにおけるUGT活性の酵素反応速度論的検討

LNCaPにおいてテストステロン、DHTを基質にした場合の

Table 2. Metabolism of ¹⁴C-DHEA formed by prostatic cancer cell lines

Substrate and metabolites	PC-3 (%)	DU145 (%)	LNCaP (%)
¹⁴ C-DHEA*	99.99±0.01	79.93±0.39	26.41±0.25
Metabolites			
Androstenedione	ND	ND	32.01±0.25
Androstenediol	ND	14.56±0.26	8.75±0.16
Testosterone	ND	ND	5.40±0.12
DHT	ND	ND	ND
Androstanedione	ND	ND	33.74±0.09
Androsterone	ND	5.51±0.14	ND
Total radioactivity	5846±62†	6060±92†	5370±114†

DHEA, dehydroepiandrosterone; DHT, dihydrotestosterone; ND, not detected.

* Substrate; † Total arbitrary value of radioactive intensity.

Values present $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n=5).

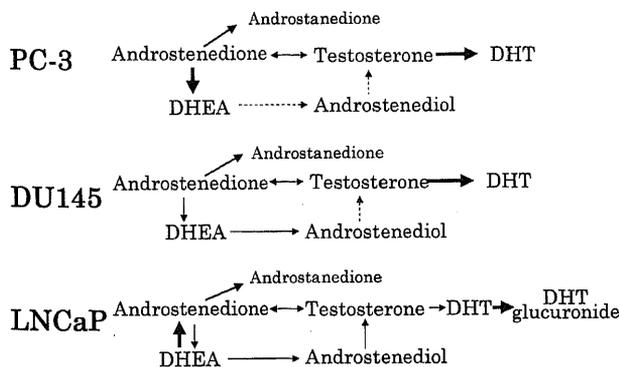


Fig. 3. Suggested schema of the metabolism of adrenal androgens in prostatic cancer cell lines. Arrow width indicates the relative activity, and the dotted arrow indicates a relatively low activity. DHEA, dehydroepiandrosterone; DHT, dihydrotestosterone.

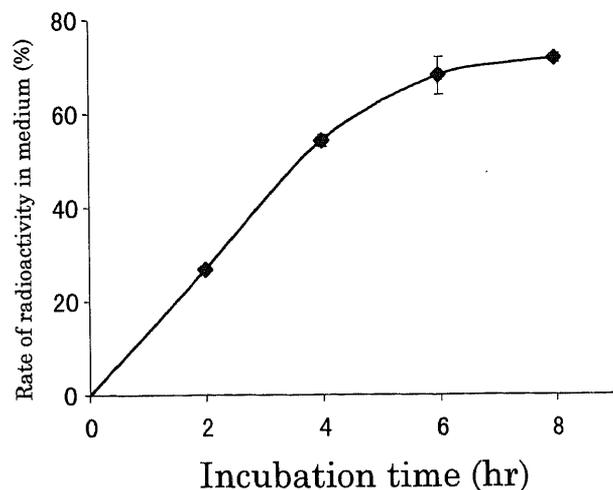


Fig. 4. Time course of uridine diphosphoglucuronosyltransferase activity. Enzyme activities were monitored after the addition of 100 nM ¹⁴C-testosterone as a substrate. The metabolism was linear from 2 to 4 hr. Four-hour incubation was used for the kinetic assay. Dots represent $\bar{x} \pm \text{SEM}$ for five experiments with the LNCaP cell line.

UGT活性を酵素反応速度論的に検討した。基質濃度を横軸に、グルクロン酸抱合率を縦軸にプロットした結果を図6A, 二重逆数プロット (Lineweaver-Burk plot) を図6Bに示す。二重逆数プロットから計算された K_m , k_{cat} を表3に示す。DHTの K_m はテストステロンに比較して約3倍高かった。なお、 K_m および k_{cat} の比である特異定数 (K_m/k_{cat}) はテストステロンを基質にした場合1.0であり, DHTを基質にした場合1.7であった。したがってDHTがより親和性の高い基質であることが示された。

5. 前立腺癌細胞株におけるUGT2B mRNA発現の検討

UGTは多くのアイソザイムの存在が報告されている。また内因性, 外因性ステロイドのグルクロン酸抱合にはUGT2Bが関与していることが知られている。我々はUGT2B特異的なプライマーを選択し, RT-PCRを行った。LNCaPのみにUGT2B mRNA発現が認められ, PC-3, DU145においては発現が認められなかった (図7)。

6. ステロイド除去条件下のLNCaPにおけるUGT活性の酵素反応速度論的検討

ステロイド除去条件下で培養しているLNCaPについても同

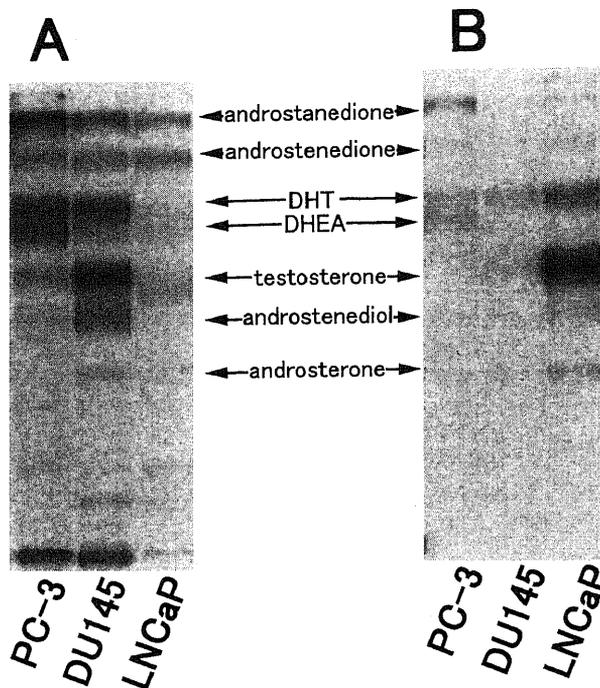


Fig. 5. Separation and identification of androgen metabolites and glucuronides from prostatic cancer cell lines. ^{14}C -testosterone was used as the substrate at concentration of 100 nM. (A) Organic phase, (B) Aqueous phase. DHT, dihydrotestosterone; DHEA, dehydroepiandrosterone.

Table 3. Kinetic properties of UGT activity in LNCaP

Substrates	K_m (μM)	k_{cat} ($\mu\text{mol}/1 \times 10^6 \text{cell/hr}$)
T	0.52 ± 0.06	0.53 ± 0.08
DHT	1.40 ± 0.28	2.32 ± 0.30

DHT, dihydrotestosterone; T, testosterone; UGT, uridine diphospho-glucuronosyltransferase.
Values present $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n=5).

Table 4. Kinetic properties of UGT activity in LNCaP in steroid depleted condition

Substrates	K_m (μM)	k_{cat} ($\mu\text{mol}/1 \times 10^6 \text{cell/hr}$)
T	1.27 ± 0.33	4.28 ± 0.14
DHT	1.50 ± 0.14	5.45 ± 0.48

DHT, dihydrotestosterone; T, testosterone; UGT, uridine diphospho-glucuronosyltransferase.
Values present $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n=5).

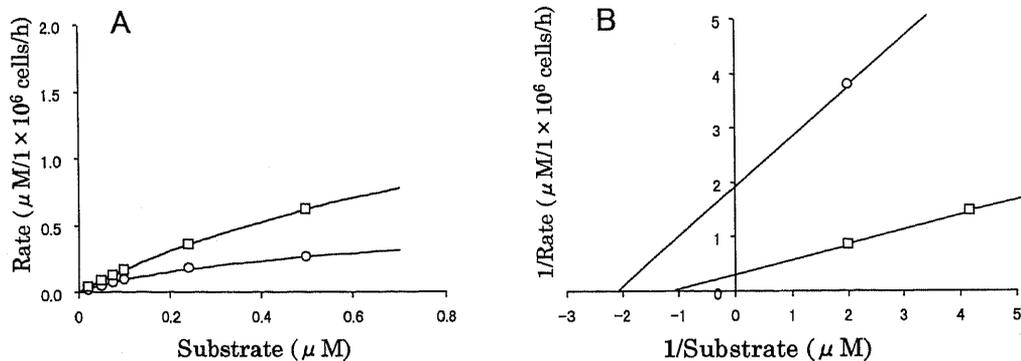


Fig. 6. Kinetic analysis of uridine diphospho-glucuronosyltransferase using testosterone (circles) and dihydrotestosterone (squares). (A) [S]-rate plot, (B) Lineweaver-Burk plot.

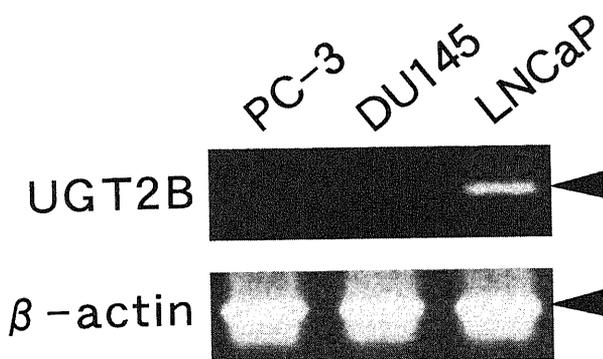


Fig. 7. PCR products of uridine diphospho-glucuronosyl-transferase (UGT) 2B and β -actin. PCR products were subjected to electrophoresis on agarose gel. Arrows indicate UGT2B gene and β -actin transcripts.

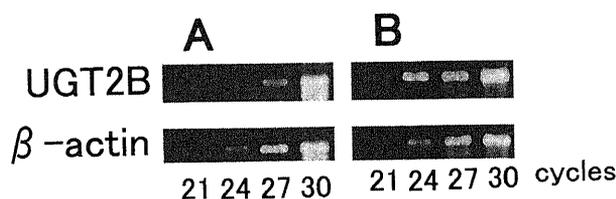


Fig. 8. Semi-quantification of UGT2B mRNA expression in LNCaP. (A) LNCaP in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, (B) LNCaP with steroids depleted.

様にテストステロン, DHTを基質にした場合のUGTの酵素反応速度を検討し, K_m , k_{cat} を表4に示す. ステロイド除去条件下において, テストステロン, DHTどちらの基質においてもUGT酵素活性が上昇していることが示された. 特異定数 (K_m/k_{cat}) はテストステロンを基質にした場合3.4であり, DHTを基質にした場合3.6であった.

7. LNCaPにおけるUGT2B mRNA発現の半定量的検討

LNCaPについては通常の条件で培養しているものと, ステロイド除去条件下で培養しているものについてRT-PCRを用いてUGT2B mRNA発現の半定量を行った. PCR産物が飽和する以前の24サイクル, 27サイクルと比較すると, ステロイド除去条件下のLNCaPにおいてUGT2B mRNAがより強く発現していることが示された (図8).

考 察

前立腺癌はアンドロゲン除去治療によく反応するが, 多くの症例において再燃というアンドロゲン抵抗性に変化することが知られている¹⁰⁾. 当初, このアンドロゲン抵抗性への変化がARの点突然変異で説明できると考えられてきたが²⁰⁾, この点突然変異やその転写活性の変化のみでは説明不可能な臨床症例の存在が明らかになってきている. このアンドロゲン抵抗性への進行において, 様々な成長因子の活性経路の変化^{21)~23)}などが推測されてきたが, そのほとんどすべてに前立腺癌細胞内にお

けるステロイド代謝の変化が, 関与している可能性が近年示唆されてきた¹⁰⁾. 特に非精巢性アンドロゲンに対する過反応性の獲得や, 副腎性ホルモンのアンドロゲンへの生合成の増加などが考えられているが, その詳細は依然として不明である. また, 再燃に至った症例に対し, 抗アンドロゲン剤の投与を中止すると, 逆に症状の改善を認める抗アンドロゲン剤除去症候群の存在も近年明らかになり²⁴⁾, 前立腺癌組織内部におけるステロイド代謝は益々注目されている.

DHTは前立腺における中心代謝物でありテストステロンに比べ5倍以上のアンドロゲン活性をもち, その大部分は精巣由来であると考えられてきた. しかし, 外科的あるいは内科的除精術を行った患者の前立腺癌組織内DHTは除精術を行わない正常男性に比べ, 40%程度しか減少せず⁹⁾, しかも血漿DHEA, Δ^4 -dione濃度は正常者と同じレベルに保たれている. したがって, 除精術後におけるアンドロゲン依存性前立腺癌の増殖は, 副腎性のDHEAに依存していると考えられている. Labrieら^{9)~11)}はアンドロゲン前駆体から, 末梢ステロイド標的細胞内における活性アンドロゲンの生成を示し, イントラクリン (intracrine) と称した. ヒト前立腺細胞内におけるイントラクリン作用は, 精巢性テストステロンのみならず, 副腎性アンドロゲンであるDHEA, Δ^4 -dioneからも由来しており, その細胞内においてDHTが生合成されることを報告している⁹⁾. したがって, TAB療法の目的は精巢性アンドロゲンの除去のみならず, 副腎性アンドロゲンの生成抑制とアンドロゲン標的細胞におけるアンドロゲン作用の遮断である. 副腎性ステロイドである遊離DHEAはヒト副腎において多量に分泌されており, アンドロゲン活性はきわめて低い. その硫酸抱合体である硫酸DHEA (DHEA sulfate, DHEA-S) は血漿中に高濃度に存在している. 成人男子におけるDHEA-Sの血漿濃度は1,000~5,000 ng/mlであり, 末梢血中で比較的少量に存在するとされるコルチゾールと比較しても10~50倍であり, 遊離型DHEAの割合は1%未満である. DHEA, DHEA-Sはヒトアンドロゲン代謝の一種の貯蔵庫としてプールされている. また, 末梢組織におけるアンドロゲン形成は Δ^4 -dioneを経由すると報告されており²⁰⁾, DHEA, DHEA-S, Δ^4 -dioneの三者が末梢組織におけるアンドロゲンの供給源になると考えられている.

本研究において, 前立腺癌細胞株を用いたアンドロゲン依存性と非依存性細胞間の副腎性ステロイド代謝を比較したところ, 明らかに異なる代謝活性を認めた. アンドロゲン非依存性細胞株PC-3, DU145は Δ^4 -dione \rightarrow DHEAの変換が優位に行われており, 一方アンドロゲン依存性細胞株LNCaPにおいては逆のDHEA \rightarrow Δ^4 -dioneへ優位に変移していた. さらに, これら3細胞株ともアンドロスタンジオンへの移行も認め, 図3にこれら3細胞株の代謝系をまとめた. 以上の結果より, PC-3, DU145はより安定したDHEAプールに移行する傾向が強く, LNCaPはDHEAプールから動員され Δ^4 -dione \rightarrow テストステロン \rightarrow DHT経路へ優位に変移していると考えられた. この両者の代謝経路の相違についてグルクロン酸および硫酸抱合活性を検討したところ, LNCaPにのみグルクロン酸抱合活性を認め, DHTへの代謝亢進に関与していることが判明した.

近年, 肝以外の末梢組織においてグルクロン酸抱合活性の存在が示唆され, ヒトにおいて前立腺, 精巣, 皮膚, 乳腺, 腎, 脳, 卵巣等に証明されている²⁵⁾. これらの組織にはUGTが存在し, ステロイド代謝の調節を行っていると考えられている. 本研究

において、LNCaPにのみグルクロン酸抱合活性を認め、PC-3、DU145においてはその活性を認めなかった。さらにLNCaPにおけるUGT活性を検討するために、酵素反応速度論(ミカエリス-メンテンの方法)を用いて分析した結果、DHTはテストステロンに比べ約3倍の K_m 値を認めたことより、UGTは主にDHTの代謝に作用していると考えられた。またUGTにはアイソザイムが存在し、それぞれ組織特異的に発現している。内因性ステロイドの代謝に関与するUGT2Bに対して特異的なプライマーを用いたRT-PCRを行い、その発現について検討したところLNCaPにおいて発現を認めたが、PC-3およびDU145においては発現を認めなかった。以上より、LNCaPにおいてはDHTがグルクロン酸抱合により消費される結果、DHTの生合成が亢進する可能性が示唆された。しかも、アンドロゲン除去条件下において、グルクロン酸抱合活性の相対的上昇を示した。実際、除精術を行った患者、すなわちアンドロゲン全体の約95%を占める精巢性アンドロゲンを除去したにもかかわらず、アンドロゲン最終代謝産物やそのグルクロン酸抱合物の変化が50%~70%である¹⁰⁾³²⁾³³⁾という臨床結果が報告されており、本研究の結果とよく一致していた。一方、アンドロゲン依存性前立腺癌は前立腺組織内DHTとARが結合することによって、その細胞増殖が刺激される。本研究においてLNCaPをアンドロゲン除去状態へと暴露させることによってUGT酵素活性が上昇し、アンドロゲン除去に対して、さらにアンドロゲンを低下させる方向に作用している。一見矛盾した現象であるが、前述したようにLNCaPは比較的容易にアンドロゲンを副腎性ステロイドプールから動員することができる。しかも、ARを介してグルクロン酸抱合に対して何らかの調節を行っていると報告されている³⁰⁾。したがって、グルクロン酸抱合が進行しDHTが消費される一方、その産生も増加し、前立腺組織内濃度を維持しようとする自己防御機構が働いている可能性が考えられる。以上より、副腎性ステロイドプールが前立腺癌における潜在的な増殖活性に大きく寄与しており、アンドロゲン依存性癌においては、このプールからDHTへの代謝の亢進を認め、この機構にグルクロン酸抱合が関与していることが示唆された。また、これらの機構はアンドロゲン除去などの何らかの誘因が必要であると考えられる。一般に、多くの前立腺癌患者のグルクロン酸抱合産物は、正常者と変わらないが³⁰⁾³⁰⁾、除精術やホルモン療法を誘因として異常値を示す場合が多く、これらの誘因について今後検討が必要である。

結 論

前立腺癌細胞株PC-3、DU145、LNCaPの副腎性アンドロゲン代謝について検討し、以下の結論を得た。

1. アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株LNCaPは、DHEA→ Δ^4 -dione方向に代謝し、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株PC-3、DU145はDHEAを蓄積する方向に変移を認めた。
2. 前立腺癌細胞株PC-3、DU145、LNCaPに硫酸抱合活性は認められなかった。
3. PC-3、DU145にグルクロン酸抱合活性は無く、LNCaPには高活性を認めた。
4. LNCaPのUGT活性はテストステロンと比較してDHTに親和性が高いことが証明された。
5. ステロイド除去条件下のLNCaPにグルクロン酸抱合活性の上昇を認めた。

以上より、副腎性ステロイドが前立腺癌の増殖に寄与することが示唆された。さらに、アンドロゲン依存性癌において、副腎性ステロイドプールからDHTへの代謝亢進を認め、この機構にグルクロン酸抱合が関与する可能性が示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師金沢大学医学部泌尿器科学講座並木幹夫教授に深甚の謝意を捧げます。また、本研究の遂行に際し、終始直接御指導、御鞭撻を賜りました同講座の高柴哲助手に感謝いたします。さらに、御助言と御協力を頂きました金沢大学医学部泌尿器科学講座の皆様にも感謝いたします。

本研究の要旨の一部は第58回日本癌学会総会(1999、広島)において発表した。

文 献

- 1) Hodges CV. Hormone therapy of prostatic cancer. *In* Rose DP (ed), *Endocrinology of cancer*, vol. II, p57-67, C.R.C. Press, Boca Raton, 1979
- 2) Gittes RF. Carcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 324: 236-45, 1991
- 3) Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* 8: 338-62, 1987
- 4) Galbraith SM, Duchesne GM. Androgens and prostate cancer: biology, pathology and hormonal therapy. *Eur J Cancer* 33: 545-54, 1997
- 5) Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA Cancer J Clin* 22: 232-40, 1972
- 6) Byar DP, Corle DK. Hormone therapy for prostatic cancer: results of the VACURG studies. *In* Wittes RE (ed) *Consensus development conference on the management of clinically localized prostate cancer*. NCI Monograph No. 7, Washington, D. C., Government Printing Office, 165-170, 1988
- 7) Sogani PC, Vagaiwala MR, Whitmore WF Jr. Experience with flutamide in patients with advanced prostatic cancer without prior endocrine therapy. *Cancer* 54: 744-50, 1984
- 8) Labrie F, Dupont A, Belanger A, Giguere M, Lacoursiere Y, Emond J, Monfette G, Bergeron V. Combination therapy with flutamide and castration (LHRH agonist or orchiectomy) in advanced prostate cancer: a marked improvement in response and survival. *J Steroid Biochem* 23: 833-41, 1985
- 9) Labrie F. Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* 78: C113-8, 1991
- 10) Labrie F, Dupont A, Simard J, Luu-The V, Belanger A. Intracrinology: the basis for the rational design of endocrine therapy at all stages of prostate cancer. *Eur Urol*: 24 Suppl 2: 94-105, 1993
- 11) Labrie F, Belanger A, Van LT, Labrie C, Simard J, Cusan L, Gomez JL, Candau B. DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: its role during aging. *Steroids* 63: 322-8, 1998
- 12) Morfin RF, Leav I, Charles JF, Cavazos LF, Ofler P, Floch HH. Correlative study of the morphology and C19-steroid

metabolism of benign and cancerous human prostatic tissue. *Cancer* 39: 1517-34, 1977

13) Smith CB, Masters JR, Metcalfe SA, Ghanadian R. Androgen metabolism by human prostatic tumours in organ culture. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19: 929-34, 1983

14) Bartsch W, Klein H, Schiemann U, Bauer HW, Voigt KD. Enzymes of androgen formation and degradation in the human prostate. *Ann N Y Acad Sci* 595: 53-66, 1990

15) El-Alfy M, Luu-The V, Haung XF, Berger L, Labrie F, Pelletier G. Localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Endocrinology* 140: 1481-91, 1999

16) Smith CM, Ballard SA, Wyllie MG, Masters JR. Comparison of testosterone metabolism in benign prostatic hyperplasia and human prostate cancer cell lines in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 50: 151-9, 1994

17) Castagnetta L, Granata OM, Polito L, Blasi L, Cannella S, Carruba G. Different conversion metabolic rates of testosterone associated to hormone-sensitive status and -response of human prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 49:351-7, 1994

18) Wilbert DM, Griffin JE, Wilson JD. Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 56: 113-20, 1983

19) Klocker H, Culig Z, Hobisch A, Cato AC, Bartsch G. Androgen receptor alterations in prostatic carcinoma. *Prostate* 25: 266-73, 1994

20) Wallen MJ, Linja M, Kaartinen K, Schleutker J, Visakorpi T. Androgen receptor gene mutations in hormone-refractory prostate cancer. *J Pathol* 189: 559-63, 1999

21) Ghanadian R, Masters JR, Smith CB. Altered androgen metabolism in carcinoma of the prostate. *Eur Urol* 7: 169-70, 1981

22) Sibley PE, Harper ME, Peeling WB, Griffiths K. Growth hormone and prostatic tumours: localization using a monoclonal human growth hormone antibody. *J Endocrinol* 103: 311-5, 1984

23) Maddy SQ, Chisholm GD, Busuttill A, Habib FK. Epidermal growth factor receptors in human prostate cancer: correlation with histological differentiation of the tumour. *Br J Cancer* 60: 41-4, 1989

24) Maddy SQ, Chisholm GD, Hawkins RA, Habib FK. Localization of epidermal growth factor receptors in the human prostate by biochemical and immunocytochemical methods. *J Endocrinol* 113: 147-53, 1987

25) Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T,

Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7: 255-69, 1997

26) Hum DW, Belanger A, Levesque E, Barbier O, Beaulieu M, Albert C, Vallee M, Guillemette C, Tchernof A, Turgeon D, Dubois S. Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69: 413-23, 1999

27) Falany CN, Comer KA, Dooley TP, Glatt H. Human dehydroepiandrosterone sulfotransferase. Purification, molecular cloning, and characterization. *Ann N Y Acad Sci* 774: 59-72, 1995

28) Culig Z, Stober J, Gast A, Peterziel H, Hobisch A, Radmayr C, Hittmair A, Bartsch G, Cato AC, Klocker H. Activation of two mutant androgen receptors from human prostatic carcinoma by adrenal androgens and metabolic derivatives of testosterone. *Cancer Detect Prev* 20: 68-75, 1996

29) Small EJ, Srinivas S. The antiandrogen withdrawal syndrome. Experience in a large cohort of unselected patients with advanced prostate cancer. *Cancer* 76: 1428-34, 1995

30) Adams JB. Control of secretion and the function of C19-delta 5-steroids of the human adrenal gland. *Mol Cell Endocrinol* 41: 1-17, 1985

31) Lobo RA, Goebelsmann U, Horton R. Evidence for the importance of peripheral tissue events in the development of hirsutism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1983 Aug; 57(2): 393-7

32) Belanger A, Brochu M, Cliche J. Levels of plasma steroid glucuronides in intact and castrated men with prostatic cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 62: 812-5, 1986

33) Moghissi E, Ablan F, Horton R. Origin of plasma androstanediol glucuronide in men. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 417-21, 1984

34) Guillemette C, Levesque E, Beaulieu M, Turgeon D, Hum DW, Belanger A. Differential regulation of two uridine diphospho- glucuronosyltransferases, UGT2B15 and UGT2B17, in human prostate LNCaP cells. *Endocrinology* 138: 2998-3005, 1997

35) Eaton NE, Reeves GK, Appleby PN, Key TJ. Endogenous sex hormones and prostate cancer: a quantitative review of prospective studies. *Br J Cancer* 80: 930-4, 1999

36) Gann PH, Hennekens CH, Ma J, Longcope C, Stampfer MJ. Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 88: 1118-26, 1996

Steroid Hormone Metabolism and Glucuronidation Activity in Prostatic Cancer Cell Lines Jiro Kanaya, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **109**, 155 – 164 (2000)

Key words prostatic cancer, LNCaP, adrenal steroids, glucuronidation, intracrine

Abstract

Adrenal androgens function as an androgen source within prostate and androgen target tissue. In this study, we compared the ability of three human prostatic cancer cell lines to metabolize the adrenal androgens dehydroepiandrosterone and androstenedione. Androgen-independent cell lines PC-3 and DU145, and androgen-dependent cell line LNCaP were investigated. The effect of glucuronide and sulfate conjugates was also investigated. There is a strong tendency in the androgen-insensitive cell lines to convert androstenedione to a DHEA or DHEA-S reservoir. Meanwhile, the steroid-sensitive cell line is capable of converting DHEA into androstenedione and subsequently into dihydrotestosterone (DHT). Moreover, androgens were converted into a glucuronide conjugate in LNCaP, but not in PC-3 or DU145. No sulfate conjugation was observed in any of these cell lines. As a result, the metabolism of the adrenal precursor shifted to androgen formation in LNCaP. This could be confirmed by means of reverse transcription-PCR of uridine diphospho-glucuronosyltransferase (UGT) 2B. Kinetic properties of UGT activity in LNCaP revealed DHT to be a better substrate than testosterone for prostatic UGTs. When steroids were depleted, the expression of UGT2B in LNCaP was significantly increased. In the case of reduced DHT levels in tissue, the UGT activity increased to contribute to the elimination of DHT. It is thought possible that the inactivation by glucuronidation of DHT in androgen-dependent prostate cancer cells is activated in the presence of low DHT levels to help maintain the physiological level of DHT required to stimulate growth. In conclusion, our findings show that the adrenal precursor pool has the potential to contribute to the regulation of prostatic cancer cells. Moreover, the presence of UGT activities in LNCaP may have a regulatory effect on the active androgen level in the intracellular environment.