

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 : 以流式細胞儀定量分析 Hedgehog 過度表現所誘發前列 *
* 名 稱 : 腺癌小鼠之 p63 癌幹細胞族群之動態變化 *
* ***** *

執行計畫學生： 林亞宣
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-034-B
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月
指導教授： 林培正

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學營養學系（所）

中華民國

99年03月26日

大專生專題研究計畫成果報告

以流式細胞儀定量分析Hedgehog過度表現所誘發前列腺癌小鼠之p63癌幹細胞族群的動態變化

計畫編號：98-2815-C-040-034-B

學生：Ya-Hsuan Lin (林亞宣)

計畫指導教授：David Pei-Cheng Lin (林培正) 副教授

執行期間：2009年7月1日至2010年2月28日

一、中文摘要：

前列腺癌在台灣男性常見癌症中發生率排名第四，嚴重影響中老年男性的健康。胚胎時期，前列腺幹細胞行自我更新及分化，使得前列腺腺體發展成熟，在成熟的腺體當中，唯一具有再生與分化功能的細胞為表現 p63 的基礎細胞，當前列腺受損時，會進行腺體的修補，因此許多學者推測前列腺幹細胞即存在於基礎細胞當中，於是，當基礎細胞不正常分化時，就可能促使其內幹細胞癌化成前列腺癌幹細胞。臨床上，荷爾蒙治療常用於前列腺癌病人，以藥物或手術合併或不合併抗男性荷爾蒙藥物降低男性荷爾蒙之濃度，達到抑制或控制攝護腺癌腫瘤細胞生長之目的。然而，絕大多數病患因為腫瘤細胞產生對荷爾蒙藥物的抗藥性而繼續分裂擴散並轉移到骨盆腔之淋巴結及骨骼，引起劇烈的疼痛及高死亡率。有研究指出此非依賴性荷爾蒙前列腺癌的發展，可能源自於不須經由荷爾蒙調控的前列腺癌幹細胞的不正常分化。我們實驗室先前建立的 Hedgehog 高度表現誘發小鼠前列腺癌中，發現 Hedgehog 訊息活化參與前列腺腫瘤形成，另外，Hedgehog 也可能誘發 p63+的基礎細胞不正常增生及前列腺癌幹細胞的活化。本計劃之目的是利用小鼠模式模擬臨床上荷爾蒙治療後的腫瘤細胞分化狀況。以 Hedgehog 誘發小鼠前列腺癌後，再以去勢手術進行睪丸及副睪的切除，利用細胞免疫染色法定性並以流式細胞儀定量，分析前列腺腺體細胞中 p63+腫瘤幹細胞的族群動態變化，再以細胞凋亡的觀點研究荷爾蒙治療後的癌細胞走向，對照腫瘤幹細胞的分化情形。本計畫以提供動物平台為切入點，嘗試發展臨床上對於非荷爾蒙依賴性的前列腺癌預防及治療，以及開發抑制 Hedgehog 訊號傳遞所活化的前列腺癌幹細胞，希望可以更加有效阻斷癌細胞的分化及轉移。相信藉由了解前列腺癌幹細胞的發展，將對於臨床上以荷爾蒙治療前列腺癌細胞的認識有很大的幫助。

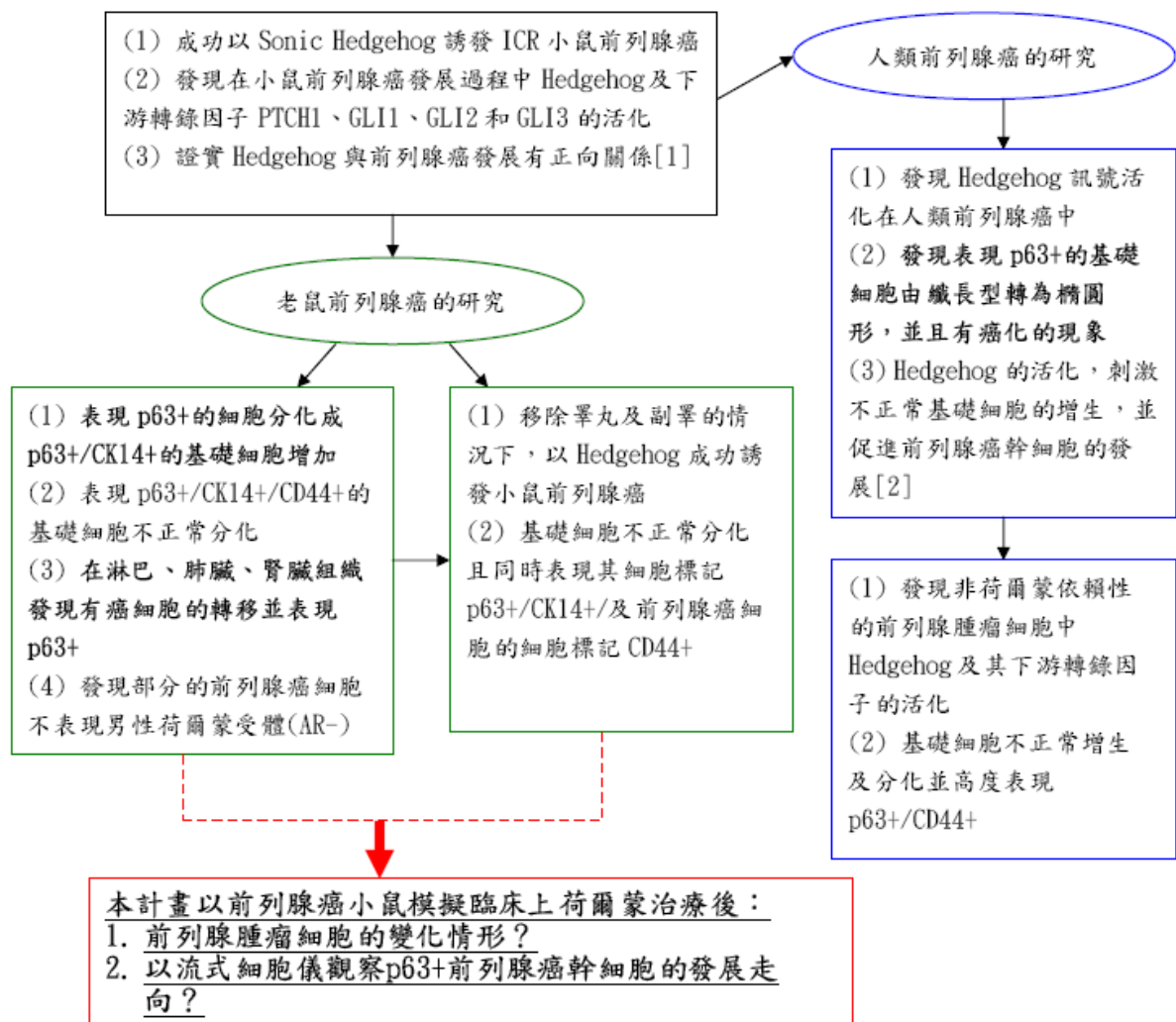
關鍵詞： prostate cancer stem cells, p63, Hedgehog, mouse model, androgen, androgen-deprivation therapy

二、計畫緣由與目的：

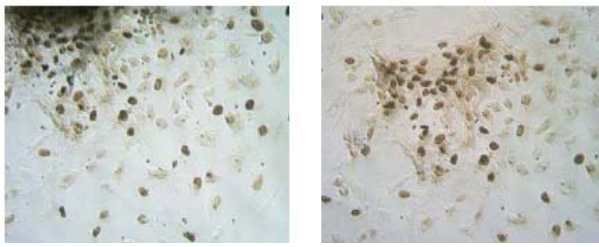
我們實驗室已經建立了利用Hedgehog誘導小鼠誘發前列腺癌的動物模式，藉以方便了解及研究人類前列腺癌的治療與預防方法，同時探討Hedgehog訊息蛋白的角色。我們實驗室先前的研究證實Hedgehog訊息傳遞路徑對於前列腺癌的發展及癌幹細胞(cancer stem cells)的活性具有正向的調控活性，但是對於Hedgehog訊號如何參與前列腺癌細胞的分化，仍需更進一步的研究分析。許多學者認為前列腺幹細胞存在於表現p63細胞標記的基礎細胞當中，因為基礎細胞是前列腺成熟的腺體當中，唯一具有更新功能的細胞，負責修復前列腺腺體的受損。當前列腺細胞癌化時，基礎細胞內的幹細胞可能癌化成前列腺癌幹細胞，進而使其他癌細胞發展。基於前面的研究發現，本計畫利用前面的實驗模式進一步的定量分析研究探討「Hedgehog訊息高度活化的狀態下，p63+前列腺癌幹細胞的族群動態分化狀態」，本計畫採取流式細胞儀方法分析表現p63+細胞標記的細胞族群動態變化及凋亡情形？來解釋前列腺癌幹細胞的發展。

三、研究方法：

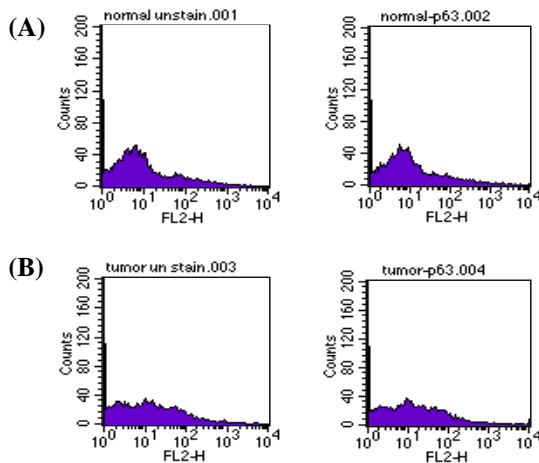
我們實驗室目前發展的研究工作流程示意圖如下：



四、計畫成果：



- 一、對照組(施打空載體)的老鼠前列腺組織經由初代培養後，以p63進行免疫細胞染色作定性分析結果如上圖；p63為basal cells的細胞標記，可以看出表現p63棕色的訊號位於細胞核。



- 二、(A)為 normal P63-staining 的圖。(B)為 tumor P63-staining 的圖。圖(A)與圖(B)並無呈現明顯的差異。

五、計畫成果自評：

本大專生計畫的研究成果豐碩，完全達成預定的目標。我們部分的作品已受邀展出於論文海報【下圖】。但在此研究過程中，仍有許多可加強之處：

- (1) 首先是關於如何使用 flow cytometry 的方法來分析 P63+細胞的表現？目前我們試了 5 種品牌的 P63 抗體，皆只能用於 IHC 染色分析，在 primary 的細胞可測得 P63+基礎細胞的表現。然而此抗體皆無法用於 flow cytometry 的分析方法。除了抗體本身功能的限制外，其可能的原因有 P63 為細胞核蛋白，不容易以 flow cytometry 的分析方法測得；或需要其他的篩選方法。
- (2) 在其他相關研究方面：我們實驗室成功地以高度 Hedgehog 誘導 ICR 小鼠前列腺癌，並發現表現 CK8 的分泌上皮細胞(luminal cells)和表現 p63 的基礎細胞(basal cells)有不正常增生及分化的現象，另外，表現 CD44 和 PSCA 的前列腺癌幹細胞(prostate cancer stem cells)也有大量的增生，在這些細胞上面都有 Hedgehog 及其下游轉錄因子 PTCH1、GLI1、GLI2 和 GLI3 的表現，顯示 Hedgehog 參與了前列腺腺體細胞癌化的過程，並且在淋巴、腎臟與肺臟組織發現有癌細胞的轉移(1~8)。

以下為我參與研討會的論文：

Hedgehog Activation Leads to Expansion of a Prostatic Stem/Progenitor Cell Subpopulation leading to Tumor initiation, Neoplasia and Metastasis.

陳伯易, 林培正, 楊涵茜, 林亞宣, 張涵馨

Bo-Yie Chen, David Pei-Cheng Lin, Han-Chien Yang, Ya-Hsuan Lin, Han-Hsin Chang

School of Optometry

School of Medical Laboratory and Biotechnology

School of Nutrition, Chung Shan Medical University, Taichung City, Taiwan

ABSTRACT:

Studies on prostate cancer (CaP) pathogenesis and development of new therapies have been hampered by a lack of appropriate mouse models. In human, the Hedgehog (Hh) family of intercellular signaling proteins was found highly expressed in advanced prostate cancers, and the Hh gene is thought to be reactivated during self-renewal and differentiation of adult stem cells, leading to tissue regeneration or cancer stem cells activation. Here we generated pCX-SHH-IG mice that over-expressed the SHH protein in adult prostatic epithelium, allowing us to further explore the cellular origin and molecular mechanisms underlying prostate cancer initiation and progression. We found that pCX-SHH-IG mice developed prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), intraductal CaP, invasion and metastasis within 3 months after Hedgehog over-expression, with pathologic phenotypes comparable to those of human cancer formation. Using defined cell lineage markers, we demonstrated that CaP is initiated through activation of basal/stem cells (P63+) along with simultaneous activation of Hedgehog pathway, and the activation eventually leads the basal/stem cells to progress toward heterogeneous cellular lineages. This observation provides strong evidence that basal/stem cell reactivation induced by Hh pathway can be an initiating event for pre-neoplasia lesions. As a result, P63+/Patch1+ and P63+/Smo+ cells may serve as cancer-initiating cells, concomitant with expansion of a stem/progenitor-like subpopulation as evidenced by the progressive increase of CK14+/P63+, CK14+/CD44+, CK14+/CK8+ and CK14+/Patch1+ cells in this model. Furthermore, we found that the metastatic loci within lymph node and kidney were infiltrated with P63+ cells in the pCX-SHH-IG mice, confirming their cancer cell peculiarity and cancer stem cell-like differentiation.

六、參考文獻：

- (1) 陳伯易. Hedgehog 基因在前列腺癌發生過程所扮演的角色之探討。中山醫學大學生化暨生物科技研究所 2007 博士論文。
- (2) 張鈺萱. 以小鼠模式探討男性荷爾蒙與 Hedgehog 蛋白在前列腺腫瘤幹細胞的生成效應。2007 年大專生計畫。
- (3) 丁肇彤. 以人類前列腺腫瘤組織探討男性荷爾蒙受體與 Hedgehog 訊息在前列腺腫瘤幹細胞 (prostate cancer stem cells) 的表現。2007 年大專生計畫。
- (4) Bo-Yie Chen, David Pei-Cheng Lin, Han-Chien Yang, Pei-Wen Chen, Hsiao-Ting Hung, Ya-Hsuan Lin (林亞宣), Han-Hsin Chang (2008) Hedgehog Activation Leads to Expansion of a Prostatic Stem/Progenitor Cell Subpopulation leading to Tumor Initiation, Neoplasia and Metastasis. (The 9th Development Biology Retreat IMB, September 5-6, 2008)
- (5) Chen BY, David PC Lin, Liu JY, Chang H, Huang BH, Chen YL & Chang HH (2006) A mouse prostate cancer model induced by Hedgehog overexpression. Journal of Biomedical Science. 13(3):373-84.
- (6) Bo-Yie Chan , Jer Yuh Liu , Han-Hsin Chang ,Chin-Poa Chang ,Wei-Yuh Lo ,Wu-Hsien Kuo , Chi-Rei Yang , David Pei-Cheng Lin. Hedgehog is involved in prostate basal cell hyperplasia formation and its progressing towards tumorigenesis. Biochemical and Biophysical Research Communications 357(2007)1084-1089
- (7) Bo-Yie Chen, Han-Hsin Chang, Yin-Tin Chen, David Pei-Cheng Lin (2009) Inhibitory Effect of Zerumbone on Prostate Cancer Metastasis in a Mouse Model. (Oral Presentation at International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods, November 1-4, San Francisco, USA)
- (8) Han-Hsin Chang , Bo-Yie Chen, Chia-Yung Wu, Zih-Jay Tsao, Shang-Min Yeh, Ying-Yu Chen, Chin-Pao Chang, and David Pei-Cheng Lin. Hedgehog activation leads to expansion of metastatic P63 positive cancer stem cells in mouse prostate. (2010) Cancer Research (Under Review)