

令和元年6月18日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11011

研究課題名(和文) 前立腺癌ARスプライシングバリエントで活性化する新規アンドロゲン応答遺伝子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel androgen response gene activated by AR splicing variant of prostate cancer

研究代表者

志田 洋平 (SHIDA, Yohei)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：40641337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：いくつかの新規アンドロゲン応答遺伝子のplasmid DNAからクロマチンテンプレートを作成し、完全長ARとAR-V7で転写活性に違いがあるか、独自に作製したin vitro転写システムで確認したが、違いは認められなかった。そこで、新たにアデノウイルスE4プロモーターの上流にPSAのアンドロゲン応答配列を5つ連結させたplasmid AREを作製し、このplasmidを用いてクロマチンテンプレートを作製してin vitro転写実験を行ったところ、既知のリガンド結合領域を欠くにもかかわらずAR-V7による転写も完全長ARと同様にDHTによって強く活性化された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

完全長AR、AR-V7による遺伝子転写を再現するin vitro転写システムを独自に作製して実験を行った結果、既知のリガンド結合領域を欠くにもかかわらず、AR-V7による転写も完全長AR同様にDHTによって強く活性化されることを見出した。今回の結果は、これまで諸家から報告されている臨床研究結果や細胞を用いた実験結果とは異なっていた。今後さらに解析を進めることで、AR-V7によるアンドロゲン応答性遺伝子転写の未知のメカニズムの解明や、前立腺癌の薬剤耐性メカニズムの解析に寄与できるのではないかと考える。

研究成果の概要(英文)：We prepared plasmid DNA of several novel androgen responsive genes for chromatin templates and determined the difference in transcriptional activation between full-length AR and AR-V7 using an original in vitro transcriptional system. However, there were no difference. Next, we prepared a plasmid construct with five copies of the positive androgen-response element upstream of the adenovirus E4 core promoter (pARE) for a chromatin template. With this system, we observed transcriptional activation, both by purified full-length AR and by AR-V7. As expected, dihydrotestosterone (DHT) significantly enhanced full-length AR transcription. Although AR-V7 lacks the previously identified hormone-binding domain, it also stimulated transcription following the addition of DHT.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：AR-V7 Full-length AR in vitro 転写 DHT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外科的去勢や薬物による去勢状態で、血清テストステロン値が 50ng/dl 未満にあるにもかかわらず、病態の増悪、血清 PSA 値の上昇をみた場合、抗アンドロゲン剤投与の有無にかかわらず去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) と定義される。CRPC となってもアンドロゲン受容体 (AR) が持つ意義は重要であり、そのスプライシングバリエーションの存在は治療上問題となる可能性が指摘されていた。事実、近年、これらのバリエーションのうち、リガンド結合領域 (LBD) が欠損し恒常的に活性化している AR splice variant 7 (AR-V7) を示す CRPC 患者では、新規抗アンドロゲン剤の奏効率が 0% であった。

このように、CRPC へと進行してもなお AR は治療の有効な標的であるが、CRPC における AR-V7 の詳細な転写調節メカニズムはいまだ不明な点が多い。AR-V7 では、通常の完全長 AR と標的遺伝子の転写メカニズムが異なっている可能性が指摘されており、そのことが治療抵抗性の一因ではないかと示唆されている。ヒトゲノムでは、転写開始点の上流にアンドロゲン受容体結合領域を有する新規 AR 標的遺伝子群が報告されているが、CRPC において AR-V7 がこれら遺伝子の転写活性に与える影響については依然不明である。

我々は、これまで PSA の *in vitro* 転写システムを独自に構築し、その技術を用いることで、転写開始点の上流にアンドロゲン受容体結合領域を持つ遺伝子の 1 つである G3BP2 が、PSA と同様に完全長 AR とジヒドロテストステロン (DHT) の存在下に転写活性化することを確認してきた。そこで、この *in vitro* 転写システムを用いて AR-V7 にのみ強く応答する遺伝子が特定できないかに着目した。

2. 研究の目的

AR 結合領域を転写開始点上流に有する遺伝子群のうち、CRPC で高発現する AR-V7 に強く応答する遺伝子を特定し、さらにその病理学的役割や治療標的としての有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) いくつかの新規アンドロゲン応答遺伝子の plasmid DNA を用いてクロマチンテンプレートを作成し、完全長 AR と AR-V7 で転写活性に違いがあるかどうかを、独自に作製した *in vitro* 転写システムを用いて解析する。

(2) (1) とは別に、adenovirus E4 (AdE4) プロモーターの上流に PSA の androgen responsive element (ARE) を 5 つ連結させた plasmid ARE を作製し、この plasmid を用いてクロマチンテンプレートを作製し、完全長 AR、AR-V7 による遺伝子転写を再現する *in vitro* 転写実験系を作製し、完全長 AR、AR-V7 の転写活性に違いがあるか検討する。

4. 研究成果

(1) いくつかの新規アンドロゲン応答遺伝子で、完全長 AR と AR-V7 で転写活性に違いがあるか検討を行ったが、違いは認められなかった。

(2) ARE を 5 つ連結させた plasmid ARE を用いて行った実験では、既知の LBD を欠くにもかかわらず、AR-V7 による転写も完全長 AR 同様 DHT によって強く活性化された。これらの活性化はともに DHT 濃度依存性であった。

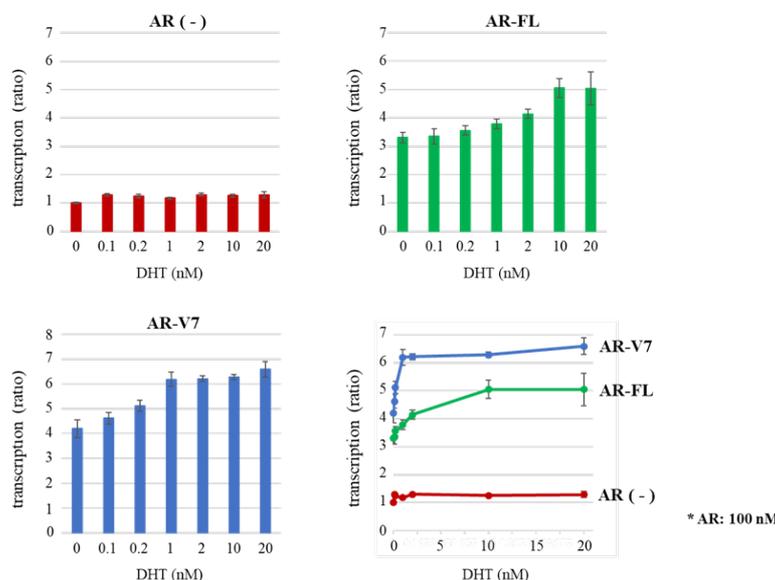


図 1 完全長 AR、AR-V7 の *in vitro* での転写活性

また、抗アンドロゲン剤を用いた実験では、新規抗アンドロゲン剤エンザルタミドは AR-V7 による転写活性を強く抑制したが、完全長 AR による転写活性を抑制する効果は弱かった。そのメカニズムを調べるため、AR negative な前立腺癌細胞株である PC-3 に完全長 AR、AR-V7 を発現させて実験を行ったが、メカニズムの特定には至らなかった。

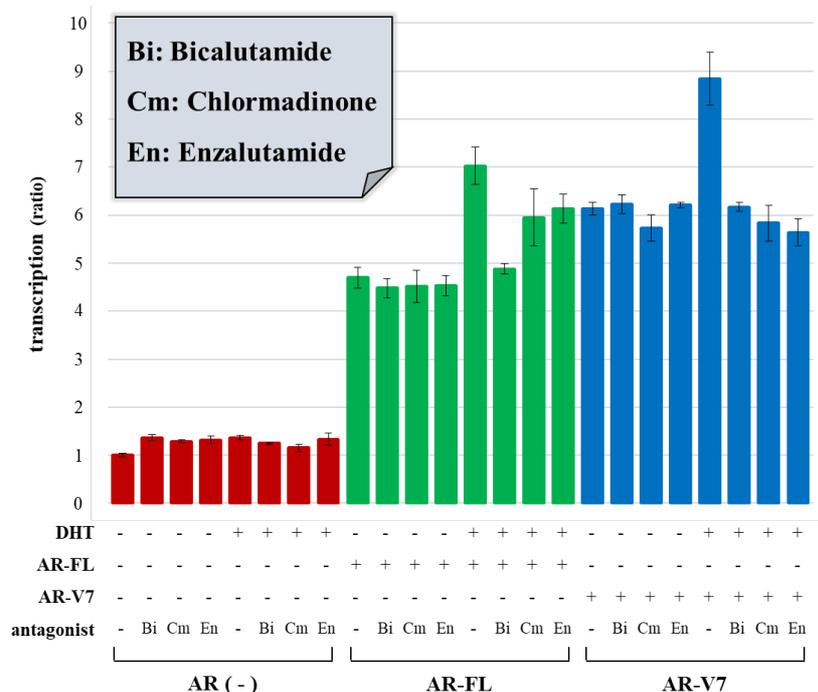


図 2 抗アンドロゲン剤の完全長 AR、AR-V7 による転写活性への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

第 106 回 日本泌尿器科学会総会 (2018 年)

発表標題: Full-length androgen receptor (AR)、AR スプライシングバリエントによるアンドロゲン応答性遺伝子転写を再現する in vitro 転写システムの作製

発表者名: 志田 洋平、中川 武弥、今村 優子、計屋 知彰、宮田 康好、酒井 英樹、伊藤 敬

第 34 回 前立腺シンポジウム (2018 年)

発表標題: Full-length androgen receptor (AR)、AR-V7 はホルモン依存性にクロマチン転写を活性化する ~ in vitro 転写システムを用いた解析 ~

発表者名: 志田 洋平、中川 武弥、米田 光宏、東 美樹、今村 優子、池田 和博、井上 聡、計屋 知彰、宮田 康好、酒井 英樹、伊藤 敬

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：計屋 知彰

ローマ字氏名：HAKARIYA, Tomoaki

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（医学系）

職名：助教

研究者番号（8桁）：00716574

研究分担者氏名：宮田 康好

ローマ字氏名：MIYATA, Yasuyoshi

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（医学系）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60380888

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中川 武弥

ローマ字氏名：NAKAGAWA, Takeya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。