

令和元年5月16日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20163

研究課題名(和文)ARを介したビタミンD3の前立腺癌抑制作用の分子機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the suppressive action of vitamin D3 on prostate cancer via AR signaling.

研究代表者

諏佐 崇生 (SUSA, TAKAO)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：20445852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：LNCaP細胞におけるDHTとビタミンD3のクロストークの実態の解明を試みた。解析の結果、Metallothionein (MT)遺伝子群とHOXC遺伝子群をDHTとD3の共通の標的遺伝子として同定した。MT遺伝子群はDHTとD3に共通して抑制的に制御されていたが、D3はARをも介した転写抑制機序であることが示された。HOXC遺伝子群はDHTに抑制、D3に促進的と拮抗的に制御されており、HOXCはARシグナリングを抑制的に修飾する可能性が示された。さらに、これらのDHTによる転写抑制はDNAのメチル化を介していると考えられ、D3-ARのクロストークにもこのDNAのメチル化の関与が予想される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌は男性で発症頻度の高い癌であり、更なる治療方針やその予防策の開発が望まれている。本研究では、以前よりその分子機序は未明であったが癌の予防効果があると考えられたビタミンD3が前立腺癌に示す抗増殖作用の分子機序の一端を明らかにした。metallothioneinやHOXCと言う標的遺伝子の存在を明らかにし、これらが細胞増殖やアンドロゲンシグナリングに与える影響を明らかにしつつある。今後、前立腺癌の新たな分子標的ともなりうる。またその転写制御にはDNAのメチル化を介した転写制御が想定され、学術的にも社会的にも本研究成果の意義を主張したい。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to reveal the molecular mechanism of the crosstalk between DHT and vitaminD3 (D3) signaling in LNCaP cells. As the result, we identified Metallothionein genes and HOXC genes as a common target of DHT and D3. Metallothionein genes were repressive target genes both of DHT and D3, interestingly, its D3 dependent regulation was mediated by not only VDR but also AR. On the other hands, DHT and D3 showed a opposite regulation of HOXC genes. DHT repressed HOXC genes expression while D3 stimulated them. Interestingly, we found that HOXC might inhibit AR function as preliminary results. In addition, these DHT dependent gene repressions were involving the DNA methylation of their regulatory regions. We speculate that the DNA methylation by DHT might be a cause of the crosstalk between D3 and AR in Metallothionein gene regulation observed in this study, and revealing these will be a novel finding.

研究分野：生化学

キーワード：前立腺癌 ビタミンD3 AR VDR

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

## 1. 研究開始当初の背景

男性特異的な癌である前立腺癌には以下の3つの特徴があげられる。

アンドロゲン依存性にアンドロゲン受容体(AR)を介した転写調節により増殖する。厚生労働省発表の人口動態統計 2013 の「主な部位別がん死亡数」では、前立腺癌は第5位であり、その発癌機構の解明や治療法の確立が強く求められている。治療方針の柱として、種々のホルモンアンタゴニストを用いたARの不活化が選択されている。しかし、しばしばその長期使用が癌をホルモン抵抗性へと推移させることが治療の妨げとなっている(Attard et al. *Cancer Cell*. 2009)。

そんな中、近年、他種の核内受容体によるAR制御機構へのクロストークを介した癌抑制作用に着目が集まっている。元来、緩和医療効果が期待されるグルココルチコイドはその受容体のGRを介して生理作用を発揮するが、近年、ゲノム上のAR結合領域と重複する領域にGRが結合して前立腺癌の抑制作用を示すことが報告された。(Jacob et al., *Science Translational Medicine*. 2015)。そんな核内受容体間でのクロストークが注目される中、申請者は1,25 ビタミン D3(D3)の前立腺癌の癌抑制作用に着目した。

血中での高濃度のD3は、前立腺癌に増殖抑制作用を示す(Schwartz et al., *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007)。

前立腺癌へのD3の作用はアンドロゲン依存性(Beer et al., *Anticancer Res*. 2006)である。

これらの知見は、D3がアンドロゲン-ARシグナル経路にクロストークすることで前立腺癌の増殖抑制作用を発揮していることを想起させるが、未だその分子機序は未解明なままである。

## 2. 研究の目的

申請者は先行研究から、『D3がARを介して転写制御を引き起こす』という、新規クロストーク経路の存在を示唆する未発表結果を得ている。本研究により、ビタミンD3のARへのクロストークに着目した「遺伝子発現制御系の全容解明」と、「D3による前立腺癌の癌抑制作用の分子機序」に迫りたい。

## 3. 研究の方法

D3-AR経路とその制御遺伝子群の同定を行う。具体的には、核内受容体であるARとVDRをそれぞれ特異的にノックダウンするsiRNAを導入したLNCaP細胞をDHTまたはD3で刺激し、それぞれの発現変動遺伝子をマイクロアレイで網羅的に解析する。この際、ホルモン刺激で発現が変動し、核内受容体のノックダウンではその変動が消失する遺伝子を選別する。この手法でどの遺伝子がどのホルモン-核内受容体経路で制御されるのかを系統的に分類することができる。本計画ではこの手順により、LNCaP細胞でのD3による制御経路の系統的な理解を、DHTとD3の制御遺伝子群の差異を比較することによって明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) D3刺激でのLNCaP細胞のARの細胞内局在解析

細胞分画タンパク質を用いたウェスタンブロッティングと免疫組織化学解析からDHTとD3投与時のARとVDRの細胞内挙動を解析した(図1)。D3刺激時にVDRだけでなくARも核内移行することがあきらかとなった。

### (2) DHTとD3の標的遺伝子の網羅的解析

マイクロアレイにより、LNCaP細胞におけるDHTとD3の標的遺伝子を網羅的に解析した。その結果、DHTとD3の標的遺伝子は大きく異なることが明らかとなった。しかしその中で23遺伝子が共通に制御される遺伝子として明らかになった(図2)。その中にはDHTとD3とともに抑制される遺伝子としてMetallothionein(MT)遺伝子群が多く存在し、またDHTで抑制D3で促進と拮抗的な制御を受ける遺伝子としてHOXC9を同定した。

### (3) Metallothionein 遺伝子群の制御解析

MT遺伝子群は16番染色体q13にクラスターを形成して局在する。これらの遺伝子発現を全て解析したところ、これらのほとんどの遺伝子がDHTとD3により発現が抑制されることが明らかとなった(図3)。さらにsiRNAによる各核内受容体をノックダウンしたところ、DHT依存的な抑制だけでなくD3依存的な抑制もsiARで解除される傾向がみられた(図3)。さらにChIPアッセイの結果、MT2AとMT1X

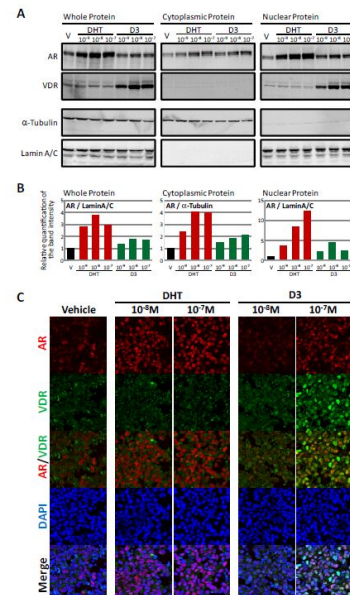


図1 LNCaP細胞におけるD3依存性ARの核内移行

の上流領域において AR と VDR の結同領域を同定し、ここに D3 依存的に AR がリクルートされることが明らかとなった(図 3)。さらに詳細は省略するが DHT 依存的な転写抑制は DNA のメチル化を介した転写抑制であることが明らかになりつつある。以上の結果から、DHT と D3 シグナリングが一部クロストークすることで MT 遺伝子群を転写抑制することが明らかとなった(図 4)。MT 遺伝子は細胞増殖に関与することが報告されていることから、今後その分子機序の詳細を解析する予定である。

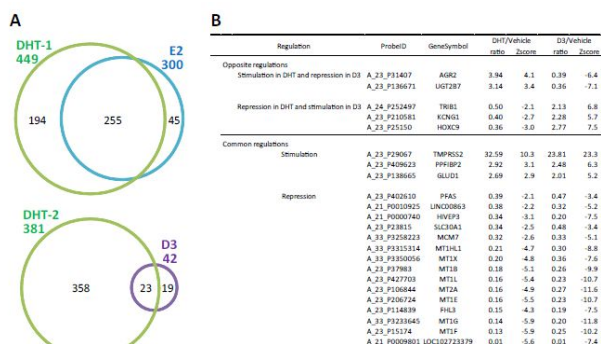


図2 LNCaP細胞におけるDHTとD3の網羅的標的遺伝子の同定

(4) HOXC 遺伝子群の制御解析

HOXC 遺伝子群の DHT と D3 による発現制御を解析した。HOXC 遺伝子群はヒトでは全部で 8 つの遺伝子が存在するが、HOXC9 と同様に DHT で抑制、D3 で誘導される遺伝子は HOXC9, HOXC12, HOXC13 の 3 遺伝子であった(図 5)。また発現量を鑑みると主に制御される遺伝子は HOXC9 であることが明らかとなった。さらに、この DHT 依存的な転写抑制は DNA のメチル化を介した転写抑制であることが示された(図 6)。現在、DHT や D3 がこれら遺伝子を制御する意義を検討中であるが、HOXC9 は AR シグナリングを妨害する可能性が示されている。つまり、前立腺癌において DHT は HOXC9 を転写抑制することで前立腺癌の増殖に適した細胞内環境を維持していることが予想され、一方 D3 は HOXC9 の発現を誘導することで AR の不活化を引き起こすことができるのかもしれない。今後、その分子機序に関して詳細を解析する予定である。

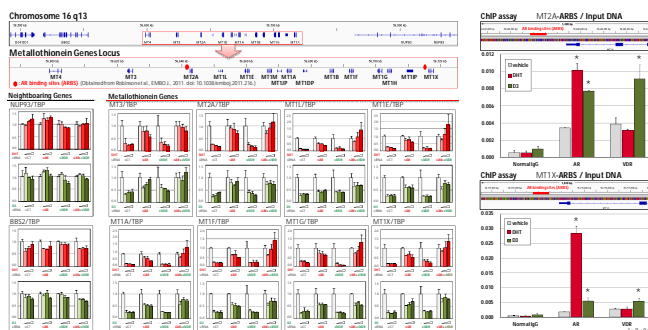


図3 ARを介したDHTとD3依存的なMetallothionein遺伝子群の転写抑制

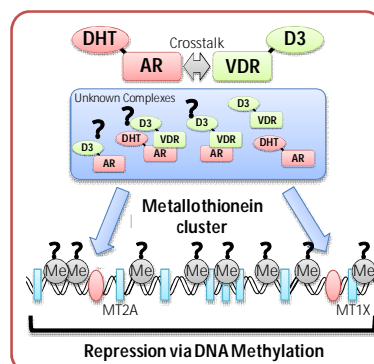


図4 Metallothionein遺伝子群のDNAのメチル化を介した転写抑制

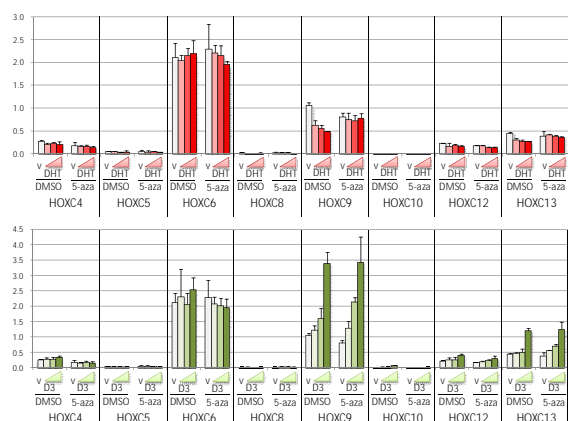


図5 HOXC遺伝子群のDHTとD3による拮抗的な発現制御

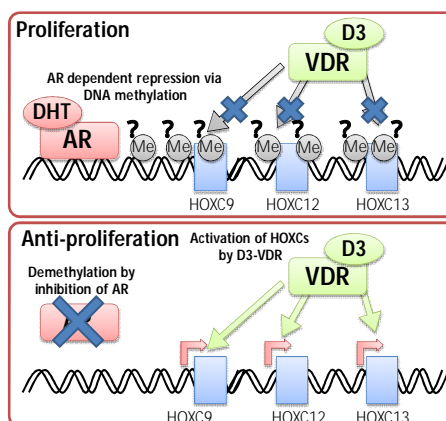


図6 HOXC遺伝子群のDNAのメチル化を介した転写抑制機序

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1: Tamamori-Adachi M, Koga A, Susa T, Fujii H, Tsuchiya M, Okinaga H, Hisaki H, Iizuka M, Kitajima S, Okazaki T. DNA damage response induced by Etoposide promotes steroidogenesis via GADD45A in cultured adrenal cells. Sci Rep. 2018 Jun 25;8(1):9636. doi: 10.1038/s41598-018-27938-5.

2: Susa T, Iizuka M, Okinaga H, Tamamori-Adachi M, Okazaki T. Without 1 $\alpha$ -hydroxylation, the gene

expression profile of 25(OH)D(3) treatment overlaps deeply with that of 1,25(OH)(2)D(3) in prostate cancer cells. Sci Rep. 2018 Jun 13;8(1):9024. doi: 10.1038/s41598-018-27441-x.

3: Uchida K, Tanaka Y, Ichikawa H, Watanabe M, Mitani S, Morita K, Fujii H, Ishikawa M, Yoshino G, Okinaga H, Nagae G, Aburatani H, Ikeda Y, Susa T, Tamamori-Adachi M, Fukusato T, Uozaki H, Okazaki T, Iizuka M. An Excess of CYP24A1, Lack of CaSR, and a Novel lncRNA Near the PTH Gene Characterize an Ectopic PTH-Producing Tumor. J Endocr Soc. 2017 May 3;1(6):691-711. doi: 10.1210/js.2017-00063.

4: Iizuka M, Susa T, Tamamori-Adachi M, Okinaga H, Okazaki T. Intrinsic ubiquitin E3 ligase activity of histone acetyltransferase Hbo1 for estrogen receptor  $\alpha$ . Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2017;93(7):498-510. doi: 10.2183/pjab.93.030.

5: Nakakura T, Suzuki T, Torii S, Asano-Hoshino A, Nekooki-Machida Y, Tanaka H, Arisawa K, Nishijima Y, Susa T, Okazaki T, Kiuchi Y, Hagiwara H. ATAT1 is essential for regulation of homeostasis-retaining cellular responses in corticotrophs along hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Cell Tissue Res. 2017 Oct;370(1):169-178. doi: 10.1007/s00441-017-2654-4.

〔学会発表〕(計 5件)

1. 菊山崇浩、諏佐崇生、安達(玉盛)三美、秋元美穂、飯塚真由、内田俊也、柴田茂、岡崎具樹、腎臓遠位尿細管細胞 mpkDCT 細胞を用いた *Cyp27b1* ノックアウト細胞の樹立と 25(OH)D<sub>3</sub> の生理活性の評価。第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 パシフィコ横浜
2. 諏佐崇生 飯塚真由 安達三美 岡崎具樹。ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞における 25(OH)D<sub>3</sub> のビタミン D<sub>3</sub> 活性の評価。第 91 回日本内分泌学会学術総会 2018 年 4 月 宮崎市フェニックスシーガイア
3. 諏佐崇生、飯塚真由、安達(玉盛)三美、岡崎具樹。ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞において 25(OH)D<sub>3</sub> は 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の標的遺伝子と類似した遺伝子群を制御する。2017 年度生命科学系学会合同年次大会(Conbio2017) 2017 年 12 月 兵庫県神戸市
4. 諏佐崇生、飯塚真由、安達(玉盛)三美、岡崎具樹。Transcriptional Repression of the Metallothionein Gene Family by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Is Mediated by Androgen Receptor in Prostate Cancer LNCaP Cells. ENDO2017, The Endocrine Society's 99th Annual Meeting & Expo 2017. 2017 年 4 月 Orlando, USA
5. 諏佐崇生、飯塚真由、安達(玉盛)三美、岡崎具樹。ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞における DHT-AR へのクロストークを介したビタミン D<sub>3</sub> による Metallothionein 遺伝子群の転写抑制機構の解析。第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/tsusatsusa/>

<https://www.e-campus.gr.jp/staffinfo/public/staff/detail/2109/93>

#### 6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。