

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11117

研究課題名(和文) ダイオキシン類介在性のアンドロゲン受容体変異体分解による去勢抵抗性前立腺癌の制御

研究課題名(英文) The control of castration resistant prostate cancer (CRPC) through degradation of androgen receptor splice variant by dioxins

研究代表者

丸山 覚 (Maruyama, Satoru)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：80507591

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)：1. アンドロゲン受容体の転写活性をみるため、AhRを発現している前立腺癌株へARスプライシングバリエント(AR-V7)を発現させ、in vitroでの転写活性や増殖能を様々な条件で検討することを目的に発現細胞を作成した。しかしながら発現の程度は微弱であり、実験には不相当であると考えられた。ゆえにin vivoでの検討として、免疫不全マウスへの移植(xenograft)も施行不可の状態である。

2. 内因性ダイオキシン類のマウスへの投与(毒性の確認、致死量の推定)としてダイオキシン類を投与量ごとに経口および経腹膜投与をおこない連日観察をおこなう予定とした。しかし時間と場所の問題で未施行となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの前立腺癌に対する内分泌治療のホルモン分泌・増殖経路における作用部位はアンドロゲン受容体(AR)より上流でのシグナルを抑制するものであったが、より下流であるARを分解することは、いかに上流からのシグナル変化があろうと治療効果を持続また増強する可能性を秘めている。近年、本邦でも増加している前立腺ホルモン非依存性癌(去勢抵抗性前立腺癌)における新たな治療法に結びつく礎となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：1. We produced AR splicing variant (AR-V7) to the prostate cancer strain which developed AhR to see the transcription activity of the androgen receptor and made expression cells for the purpose of examining in vitro transcription activity and proliferation potency on various conditions. However, there is a problem of vector, and the degree of the expression is feeble and is the situation that is thought to be unsuitable for an experiment, and makes trial and error. Thus, as in vivo examination, transplant (xenograft) to an immunodeficiency mouse is the state that is impossible of enforcement, too.

2. We did the endogenous dioxin mentioned above every dose as administration (toxic confirmation, estimate of the fatal dose) to a mouse of endogenous dioxin with the oral and transperitoneal plan that we gave it and observed day after day. However, it became non-enforcement by a problem of the when and where.

研究分野：泌尿器悪性腫瘍

キーワード：前立腺癌 ダイオキシン受容体 芳香族炭化水素受容体 アンドロゲン受容体 Indirubin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

性ホルモンは生理学的な作用以外に、内分泌関連組織由来の癌の増殖に関する。具体的にはアンドロゲン依存性を示す前立腺癌やエストロゲン依存性を示す乳癌などのホルモン依存性癌の増殖作用である。前立腺癌では、たとえ遠隔転移を有する進行癌であっても、除勢術、LH-RHアナログ投与などで血中アンドロゲンを低下させること、またはアンドロゲンとその受容体との結合を遮断することにより、癌細胞の成長抑止、アポトーシスを促すホルモン療法が奏功する。しかし、その奏功期間は限られており半数は5年以内にホルモン非依存性となり制御不能となる。

近年、このホルモン非依存性癌(去勢抵抗性前立腺癌)においてもホルモン依存性癌と同様に、その増殖にアンドロゲン刺激伝達系が関与していることが分かってきた。その機序として、1) アンドロゲン受容体(AR)発現の量的異常、2) AR および co-factor の質的異常、3) アンドロゲン以外のシグナルによる受容体活性化などが挙げられる。すなわち、前立腺癌はホルモン非依存性となっても AR を介した増殖の制御を受けており、この機構の解明によりさらなる癌の制御の可能性があると考えられる。

さらに、上記 AR の質的異常の代表例として AR 変異体、とくに AR のリガンド結合領域を欠いた変異体である AR スプライシングバリエーション (AR-V7 etc.) が新規ホルモン治療剤に対する抵抗性を獲得する機序に重要であることが近年示されつつある。

ホルモン受容体を含む転写因子の多くは、ユビキチン-プロテアソーム系によって分解制御されている。ユビキチン化により転写因子や細胞シグナル伝達や癌遺伝子産物や癌抑制遺伝子産物は、自分自身のタンパク質としての発現量(分解量)を調節している。我々は前立腺癌細胞の性質または制御について性ホルモン受容体 co-factor のユビキチン-プロテアソーム系による分解の研究でその一部を明らかにしてきた。しかしながら前述の機序のごとく、AR が存在するかぎり癌を完全に制御することは困難と考えられた。AR はダイオキシン受容体(AhR)によるユビキチン化により分解されることが報告されている。また、我々は AR および AhR を発現する前立腺癌細胞株を用いてダイオキシン投与によるリガンド依存性の細胞株増殖制御につき研究を進めてきている。

2. 研究の目的

前立腺癌はアンドロゲン除去治療(ホルモン療法)中にホルモン非依存性(去勢抵抗性前立腺癌)となってもアンドロゲン受容体(AR)を介した増殖制御を受けているため、内因性のダイオキシン受容体リガンドを用いて去勢前立腺癌細胞内の AR および AR スプライシングバリエーション (AR のリガンド結合領域を欠いた変異体)を分解し、それらの発現を低下させることにより去勢抵抗性前立腺癌の増殖抑制をもたらす治療的効果につなげることを目的とするものである。

3. 研究の方法

各種のダイオキシンおよびその添加量を変えた AR スプライシングバリエーションを発現させた前立腺癌細胞株を用いて、in vitro での転写活性や増殖能を各実験系で検討する。また in vivo での検討として、その前立腺癌細胞株の免疫抑制マウスへの移植(xenograft)をおこない、各種ダイオキシン類の投与量ごとの増殖・浸潤の程度、また転移を抑制するかどうか、そしてダイオキシン類の毒性(致死量)についての検討をおこなう。

・各種内因性ダイオキシン類の毒性(致死量)

使用するダイオキシン類は既研究で使用した外因性の 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)、3-methylcholanthrene (3MC)、benzo[a]pyrene (BaP)、Benzo[k]fluoranthene (BkF)、pyrene、Anthracene などは生体に対する毒性が強いことが予想されるため除外する。本研究においては内因性のリガンドとしてインディルビン (indirubin)というインドール化合物を使用する。

上記ダイオキシン類をいくつかの投与量でマウスに投与し致死量を確認する。確認法としては半数致死量を求めず、多くの毒性試験ガイドラインでとられている、ある用量より上か下かだけを見る方法(固定用量法)からとする。可能であればその他の変化についても観察し、副作用の推定をする。

・ダイオキシン受容体発現前立腺癌株の転写活性、増殖能の測定

AhR を発現している前立腺癌株へ AR スプライシングバリエーション (AR-V7) を発現させ、in vitro での転写活性や増殖能を様々な条件で検討する。また in vivo での検討として、免疫不全マウスへの移植(xenograft)をおこない、その増殖・浸潤の程度、また可能であれば転移を抑制するかどうかの検討をおこなう。

それぞれの実験系において Dihydrotestosterone (DHT) の有無(in vivo の場合は除勢術による去勢状態とする)、AhR アゴニストである各種内因性ダイオキシン類の有無(投与量を変化させた実験系)での比較を行う。AhR の siRNA による発現抑制株も同時に検討する。最終的に毒性や投与量および増殖抑制効果を考慮して最適リガンド(ダイオキシン類)を推定する。

- (1) 内因性ダイオキシン類のマウスへの投与(毒性の確認、致死量の推定)
上記内因性ダイオキシン類をいくつかの投与量にふってマウスに経口および経腹膜投与をおこない連日観察をおこなう。各群 n=5 程度とする。これは新規大学院生とともにを行う予定である。
- (2) アンドロゲン受容体の転写活性
AhR を発現している前立腺癌細胞株 (LNCaP, 22RV1) に AR スプライシングバリエーション (AR-V7) を強制発現させ、さらに MMTV-Luc (AR 結合配列を含むプロモーター領域をもつレポーターベクター) を発現させ、ルシフェラーゼアッセイをおこなう。同時に siRNA で AhR を knock down した細胞株も比較する。各条件の細胞株の AR-V7 および AhR の発現量 (mRNA、タンパク) をそれぞれ定量的 Real-time PCR 法およびウエスタンブロット法で確認しておく。以上を、同様に DHT および各種内因性ダイオキシン類の有無、また添加量を変えて検討を行う。
- (3) 細胞周期および細胞周期関連タンパク発現の検討
上記各種内因性ダイオキシン類を投与した前立腺癌細胞株の細胞周期の変化をフローサイトメトリーにて解析する。またウエスタンブロット法にて RB protein, cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 などの発現の変化を検討し、細胞周期に変化をきたすか検討する。
- (4) 前立腺癌細胞増殖、コロニー形成能、アポトーシス誘導能
上記 AhR 発現を増加もしくは低下させた AR-V7 発現前立腺癌細胞株をマルチウエルプレートにて培養し、細胞数の計測(細胞増殖曲線の作成)と MTS アッセイ(2日ごとに OD490 をルミノメーターにて測定)をおこなう。また、60mm 培養皿上で 0.4%アガロース軟寒天培地にて3週間培養し、直径 0.1mm 以上の形成コロニーを測定する。細胞死を定量的に解析するために TUNEL 染色を行い、陽性細胞数を測定する。アポトーシス経路を特定するために、Caspase の活性測定、同時に Bcl-2, Caspase, (p-)I κ B, (p-)Akt, MAPK, STAT3 といったアポトーシスおよび AR シグナルに関連する key molecule の発現をウエスタンブロット法でチェックする。以上を、DHT および各種内因性ダイオキシン類の有無、また添加量を変えて検討を行う。
- (5) 免疫不全マウス造腫瘍性
上記 AhR 発現を増加もしくは低下させた AR-V7 発現前立腺癌細胞株を SCID マウス(雄)の皮下に移植(xenograft)し、その腫瘍径を経時的に測定する。10週後に犠牲死させ、転移の有無、あればその状態を確認する。除瘤術による去勢状態としたマウスでの比較検討も同時に行う。各群 n=5-10 程度とする。同様に DHT および各種内因性ダイオキシン類の有無、また投与量を変えた検討を行う。

4. 研究成果

(1) アンドロゲン受容体の転写活性

AhR を発現している前立腺癌株へ AR スプライシングバリエーション (AR-V7) を発現させ、in vitro での転写活性や増殖能を様々な条件で検討することを目的に発現細胞を作成した。しかしながら vector の問題があり発現の程度は微弱であり、実験には不相当であると考えられ試行錯誤している状況である。ゆえに in vivo での検討として、免疫不全マウスへの移植 (xenograft) も施行不可の状態である。今後は発現させる方法を変更して継続する予定である。

(2) 内因性ダイオキシン類のマウスへの投与(毒性の確認、致死量の推定)

上記内因性ダイオキシン類を投与量ごとにマウスに経口および経腹膜投与をおこない連日観察をおこなう予定であるが、時間と場所の問題で未施行となった。今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 丸山 寛、宮田 遙、松本 隆児、大澤 崇宏、安部 崇重、篠原 信雄	4. 巻 31
2. 論文標題 転移巣に対する手術療法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 泌尿器外科	6. 最初と最後の頁 694 -695
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 日下部,直久, 大澤,崇宏, 宮田,遙, 菊地,央, 松本,隆児, 丸山 寛, 安部崇重, 篠原信雄	4. 巻 64
2. 論文標題 当院における転移性腎細胞癌に対するアキシチニブの治療成績	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 泌尿器科紀要	6. 最初と最後の頁 353 - 358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14989/ActaUrolJap_64_9_353	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takizawa A, Kawai K, Kawahara T, Kojima T, Maruyama S, Shinohara N, Akamatsu S, Kamba T, Nakamura T, Ukimura O, Jikuya R, Kishida T, Kakimoto K, Nishimura K, Harabayashi T, Nagamori S, Yamashita S, Arai Y, Sawada Y, Sekido N, Kinoshita H, Matsuda T, Nakagawa T, Homma Y, Nishiyama H.	4. 巻 144
2. 論文標題 The usefulness of testosterone administration in identifying false-positive elevation of serum human chorionic gonadotropin in patients with germ cell tumor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cancer Res Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 109-115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00432-017-2520-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto R, Abe T, Ishizaki J, Kikuchi H, Harabayashi T, Minami K, Sazawa A, Mochizuki T, Akino T, Murakumo M, Osawa T, Maruyama S, Murai S, Shinohara N.	4. 巻 48
2. 論文標題 Outcome and prognostic factors in metastatic urothelial carcinoma patients receiving second-line chemotherapy: an analysis of real-world clinical practice data in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 771-776
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyy094	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Abe T, Kondo T, Harabayashi T, Takada N, Matsumoto R, Osawa T, Minami K, Nagamori S, Maruyama S, Murai S, Tanabe K, Shinohara N.	4. 巻 48
2. 論文標題 Comparative study of lymph node dissection, and oncological outcomes of laparoscopic and open radical nephroureterectomy for patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract undergoing regional lymph node dissection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1001-1011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyy128	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi H, Abe T, Matsumoto R, Osawa T, Maruyama S, Murai S, Shinohara N.	4. 巻 37
2. 論文標題 Nephrometry score correlated with tumor proliferative activity inT1 clear cell renal cell carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Urol Oncol	6. 最初と最後の頁 e19-301.e25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.urolonc.2019.02.005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishioka Kentaro, Shimizu Shinichi, Shinohara Nobuo, Ito Yoichi M., Abe Takashige, Maruyama Satoru, Katoh Norio, Kinoshita Rumiko, Hashimoto Takayuki, Miyamoto Naoki, Onimaru Rikiya, Shirato Hiroki	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis of inter- and intra fractional partial bladder wall movement using implanted fiducial markers	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Radiation oncology	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13014-017-0778-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abe Takashige, Takada Norikata, Kikuchi Hiroshi, Matsumoto Ryuji, Osawa Takahiro, Murai Sachiyo, Miyajima Naoto, Maruyama Satoru, Shinohara Nobuo	4. 巻 47
2. 論文標題 Perioperative morbidity and mortality of octogenarians treated by radical cystectomy? a multi-institutional retrospective study in Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese journal of clinical oncology	6. 最初と最後の頁 755 ~ 761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyx062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takizawa Akitoshi, Kawai Koji, Kawahara Takashi, Kojima Takahiro, Maruyama Satoru, Shinohara Nobuo, Akamatsu Shusuke, Kamba Tomomi, Nakamura Terukazu, Ukimura Osamu, Jikuya Ryosuke, Kishida Takeshi, Kakimoto Kenichi, Nishimura Kazuo, Harabayashi Toru et al.	4. 巻 144
2. 論文標題 The usefulness of testosterone administration in identifying false-positive elevation of serum human chorionic gonadotropin in patients with germ cell tumor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of cancer research and clinical oncology	6. 最初と最後の頁 109 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-017-2520-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	篠原 信雄 (Shinohara Nobuo) (90250422)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	