

機関番号：32665

研究種目：基礎研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591869

研究課題名 (和文) 前立腺細胞増殖に関与する内分泌関連タンパクの解析

研究課題名 (英文) Analysis of endocrine-related protein involved in prostate cell growth

研究代表者

高橋 悟 (TAKAHASHI SATORU)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：50197141

研究成果の概要 (和文)：

成果(1) エストロゲン受容体関連タンパクが前立腺癌進行に与える影響を解析し、その他の臓器癌に応用した。(2)アンドロゲンの前立腺組織内代謝と前立腺癌進行、予後リスクとの関連を解析した。(3)アンドロゲン受容体の応答機構について網羅的に検討を行った。その中で新規アンドロゲン応答遺伝子である Amyloid Precursor Protein と ARFGAP3 がそれぞれ前立腺癌の増殖を促進していることが示された。(4)核内受容体協調因子である Oct-1 がアンドロゲン受容体の転写活性化に重要であることを示し、前立腺癌の悪性度に影響を与えていることが示された。

研究成果の概要 (英文)：

(1) We demonstrated the differential expression of estrogen receptor-related protein in prostate cancer. (2) We evaluated CYP3A4 expression in human prostate cancer tissues. (3) We identified amyloid precursor protein and ARFGAP3 as a primary androgen target genes that are directly regulated by AR in LNCaP cells, by combining chromatin immunoprecipitation (ChIP) with tiling micro-arrays (ChIP-chip). (4) We identified Oct1 correlates with the poorer survival prognosis of the prostate cancer patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	700,000	0	700,000
2010年度	700,000	0	700,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	630,000	4,130,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：1. 腫瘍学, 2. ゲノム, 3. 前立腺癌, 4. Androgen, 5. Oct1, 6. ACSL3, 7. ARFGAP3

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌はアンドロゲン受容体 (AR) によりその機能・増殖がコントロールされている。AR はリガンド依存性の核内受容体の一種である。AR はリガンドと結合した後、核内に移

行し、アンドロゲン応答配列 (ARE) に結合し、標的遺伝子の転写をコントロールする。結果として、発癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子の活性の変化を生じる。前立腺癌の治療の一つにホルモン療法があり、AR の機能を低下させ

ることにより前立腺癌の進行を抑制させる、効果の高い治療法である。しかし、長期間のホルモン療法の中なかで、癌細胞の形質が変化し、ホルモン療法抵抗性となることが臨床で大いなる問題である。そのためアンドロゲン応答遺伝子の前立腺におけるアンドロゲン応答遺伝子（タンパク）の発現調節・細胞増殖機構の詳細を明らかにすることはホルモン療法抵抗性のメカニズムの解明につながるものと考えられる。一方、これまでに我々はアンドロゲンに加え、エストロゲンが前立腺癌の進行増殖に重要な役割を果たすことが示唆されてきた (Fujimura T et al. BBRC 289: 692-699, 2001)。

2. 研究の目的

(1) エストロゲンレセプター関連タンパクが前立腺癌、膀胱癌、および精巣腫瘍の進行に与える影響を検討した。

(2) アンドロゲンの前立腺組織内代謝が前立腺癌に与える影響性について検討を行った。

(3) 我々は ChIP-chip 解析により、新規アンドロゲン応答遺伝子を見だし、その中で前立腺癌の増殖に影響を与えていると思われる遺伝子の機能解析を行った。

(4) アンドロゲン受容体の転写活性化に関与する転写協調因子が前立腺癌の進行に与える影響について解析した。

3. 研究の方法

(1) 臨床前立腺癌検体を用いて、ERR ベータ、ガンマと、癌特異的生存率との関係を検討した。ヒト膀胱癌細胞 EJ を用い、EBAG9 安定発現細胞株を作成、MTS assay により増殖能の評価を行った。また、siRNA を用いて、EBAG9 の発現をノックダウンし、細胞増殖に与える影響を検討した。

EBAG9 の発現と、膀胱癌および精巣腫瘍の予後との関連について解析した。

(2) 臨床前立腺癌検体を用いて、CYP4503A4 の発現と、癌特異的生存率との関係を検討した。

(3) AR を発現している前立腺癌細胞 LNCaP を

用い、ホルモンフリー液体培地で合成アンドロゲン製剤にて刺激し、その後 6, 12, 24, 48 時間後に RNA ならびにタンパク回収し RT-PCR、ウエスタンブロットを行った。次に、FLAG タグ付き APP を LNCaP cell に transfection させ、APP 安定発現細胞株を作成、コントロールとして、FLAG ベクターを transfection させた。MTS assay により増殖能の評価を行った。また、siRNA を用いて、APP の発現をノックダウンし、細胞増殖に与える影響を検討した。臨床前立腺癌検体を用いて、APP の発現と、癌特異的生存率との関係を検討した。

ホルモンフリー液体培地で LNCaP を合成アンドロゲン製剤にて刺激し、その後 6, 12, 24, 48 時間後に RNA ならびにタンパク回収し RT-PCR、ウエスタンブロットを行った。次に、FLAG タグ付き ARFGAP3 を LNCaP cell に transfection させ、ARFGAP3 安定発現細胞株を作成、コントロールとして、FLAG ベクターを transfection させた。MTS assay により増殖能の評価を行った。また、FACS 解析を行い、各細胞株の細胞周期を検討した。さらに ARFGAP3 特異的に作用する siRNA を用いて同様に検討した。また浸潤能の評価として、Cell migration assay および Colony formation assay を行った。

4. 研究成果

(1) : ERR ベータおよびガンマは有意に前立腺癌組織で発現が低下しており、さらに ERR アルファと組み合わせた解析により、ERR アルファ高発現および ERR ガンマ低発現症例は有意に予後不良であることが明らかになった。前立腺癌におけるホルモン受容体発現パターンに基づいた新しい内分泌療法選択の確立に向けた重要なデータを得た。

ヒト膀胱癌細胞株 EJ cell を使用した in vitro 実験では EBAG9 は膀胱癌細胞の増殖を促進し、siRNA にてその作用は消失した。

臨床検体を使用した免疫組織学的検討では EBAG9 を発現する膀胱癌および精巣腫瘍症例は有意に予後不良であることが示された。

(2) : CYP3A の発現が低下した前立腺癌症例は有意に予後が不良であった。

(3) : APP は functional androgen receptor binding site を有し、androgen によりその発現が調節されていることを明らかにした。LNCaP を使用した in vitro 実験では APP は前

立腺癌細胞の増殖を促進し、臨床検体を使用した免疫組織学的検討では APP を発現する症例は有意に予後が不良であった。

アンドロゲン刺激により RNA 並びにタンパクレベルで有意に ARFGAP3 の発現が促進されることを認めた。MTS assay において、対照群に比べ ARFGAP3 安定発現細胞株は有意に増殖が促進されていた。細胞周期の解析では ARFGAP3 安定発現細胞株はコントロール群と比べ、有意に G0 / 1 期の減少、S 期の増加を認めた。一方 ARFGAP3 に特異的に反応する siRNA を用いた群と、ネガティブコントロール siRNA を用いた群で増殖能を検討したところ、ARFGAP3-siRNA 群で有意に増殖が抑制された。Cell migration assay および Colony formation assay を用いて、遊走能、足場非依存性増殖能を検討した結果、ARFGAP3 安定発現細胞株はコントロール細胞に比べ有意に高いことが認められた。

(4) Oct1 に特異的に作用する siRNA を LNCaP に用いると、有意に細胞増殖能が抑制された。前立腺癌臨床検体 102 例を用いて AR および Oct1 の免疫組織染色を施行したところ、前立腺癌の悪性を示すグリソンスコアと、AR, Oct1 の発現が正比例をし、かつ Oct1 の強発現は前立腺癌の予後不良因子となることが示唆された (図 1, 2)

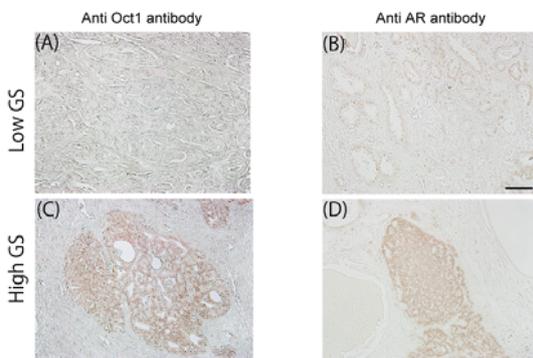


図 1. 前立腺癌における AR と Oct1 の発現
GS; Gleason score

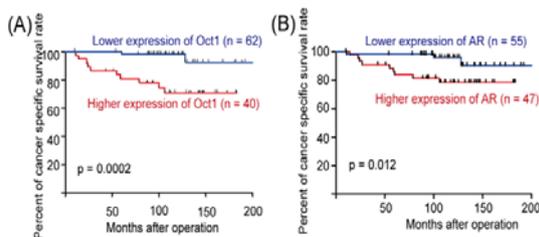


図 2. 前立腺癌術後生存曲線

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Obinata D, Takayama KI, Urano T, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Homma Y, Ouchi Y, Takahashi S, Inoue S. "Oct1 regulates cell growth of LNCaP cells and is a prognostic factor for prostate cancer." *International Journal of Cancer* (in press). 2011
- ② Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ijichi N, Ikeda K, Kumagai J, Murata T, Takayama K, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Muramatsu M, Homma Y, Inoue S. Differential expression of estrogen-related receptors beta and gamma (ERR beta and ERR gamma) and their clinical significance in human prostate cancer. *Cancer Science* 101. 646-651 (2010)
- ③ Takayama K, Tsutsumi S, Suzuki T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Kaneshiro K, Fujimura T, Kumagai J, Urano T, Sakaki Y, Shirahige K, Sasano H, Takahashi S, Kitamura T, Ouchi Y, Aburatani H, Inoue S. "Amyloid precursor protein is a primary androgen target gene that promotes prostate cancer growth." *Cancer Research* 69. 137-142 (2009)
- ④ Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Kumagai J, Murata T, Takayama K, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Homma Y, Inoue S. Expression of cytochrome P450 3A4 and its clinical significance in human prostate cancer. *Urology* 74. 391-397 (2009).
- ⑤ Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Xiaoqiang L, Ogushi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Kitamura T, Homma Y, Inoue S. Estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9 expression and its clinical significance in human testicular cancer. *Int J Urol* 16. 329-332 (2009)
- ⑥ Kumagai J, Urano T, Ogushi T, Takahashi S, Horie-Inoue K, Fujimura T, Azuma K, Muramatsu M, Ouchi Y, Kitamura T, Inoue S. "EBAG9 is a tumor-promoting and prognostic factor for bladder cancer." *International Journal of Cancer* 123. 799-805 (2009)

〔学会発表〕(計3件)

- ① 大日方 大亮 前立腺癌において ETS Family と癒合する遺伝子 ACSL3 のアンドロゲン応答に Oct-1 が重要である 第17回日本ステロイドホルモン学会学術集会 福岡, 2010年11月14日
- ② Obinata. D. ARFGAP3, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. The 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 大阪, 2010年9月24日
- ③ 大日方 大亮 ARFGAP3 is an androgen-responsive gene that positively promotes proliferation in prostate cancer cell line. 第32回日本分子生物学会 横浜, 2009年12月10日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 悟 (TAKAHASHI SATORU)
日本大学・医学部・教授
研究者番号 : 50197141

(2) 研究分担者

井上 聡 (INOUE SATOSHI)
東京大学・医学部附属病院・特任教授
研究者番号 : 40251251

浦野 友彦 (URANO TOMOHIKO)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号 : 20334386

平野 大作 (HIRANO DAISAKU)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号 : 40228804

(3) 連携研究者

なし