

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390384

研究課題名(和文)アンドロゲン受容体新規転写共役抑制因子を介した精巣腫瘍発生の分子機構の解析

研究課題名(英文)Molecular and functional analysis of novel androgen receptor co-repressor in testicular cancer

研究代表者

三木 恒治(MIKI, TSUNEHARU)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10243239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：疫学で推測されている仮説「アンドロゲンレセプター(AR)を介したアンドロゲンの作用の低下が精巣腫瘍の発生、増悪に關与する」の真偽、分子メカニズムを解明する目的で精巣腫瘍細胞株におけるAR新規転写共役抑制因子ZNF288の機能解析を行った。その成果として(1)ZNF288は精巣腫瘍モデル細胞株においてHDAC2やDNMT3Bと複合体を形成しARの転写を抑制すること、(2)また精巣腫瘍モデルマウスにおいて ZNF288が精巣腫瘍の増悪に關与している事が判明した。また、(3)実際にセミノーマ細胞株においてアンドロゲンが増殖を制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To test the hypothesis that reduction in AR transcriptional activity is associated with progression of testicular cancer, we analyze the function of ZNF288, novel AR co-repressor in testicular cancer cells. The result demonstrated that ZNF288 was able to form a co-repressor complex with HDAC2 and DNMT3B, and co-represses AR in TGCT model cell lines. Moreover, ZNF288 was shown to be an accelerator in in vivo testicular tumorigenesis assays in mice. In TCam-2, seminoma model cell line, up-regulation of AR transcriptional activity repressed cell growth.

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：精巣腫瘍 ZNF288 セミノーマ DNMT3B HDAC2

1. 研究開始当初の背景

(1) 精巣腫瘍の発生メカニズムは不明な部分が多い。精巣腫瘍は組織学的所見からセミノーマとノンセミノーマに分類される。以下の理由から AR を介したアンドロゲン作用の低下が精巣腫瘍発生の原因の一つと考えられている。1、環境ホルモン(特に抗アンドロゲン剤)への胎児期の暴露が癌の発生頻度を高めることが知られている。2、アンドロゲン不応症候群(AIS)で精巣腫瘍の中でもセミノーマの発生率が高いことが知られている。しかし精巣腫瘍における AR の結合因子や標的遺伝子は知られておらず、詳細な分子機構は不明である。

(2) 研究開始当初は精巣腫瘍株としてノンセミノーマ NEC8 細胞株を用いていた。その理由としてセミノーマの細胞株として有用な細胞株が存在しなかったためである。しかし、研究期間中にセミノーマ細胞株 TCam-2 を入手できたため、大幅に方針を変更した。

(3) AIS モデルマウスにおいて精巣腫瘍が自然発生することが知られている。

2. 研究の目的

(1) 我々は NEC8 細胞株において機能未知因子 ZNF288 が AR と直接結合してその転写活性を抑制することを発見した。ZNF288 を介した AR の転写抑制機構を明確にし、精巣腫瘍発生の分子メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

(2) TCam-2 を取得できたことより本質的なセミノーマの原因解明を目的とした。すなわち TCam-2 皮下移植モデルマウスにおいてアンドロゲン除去による増殖、発癌への影響を観察することである。また TCam-2 において AR が機能しているか判断する目的でその発現を調べる事、AR の標的遺伝子の解析を

行う目的でマイクロアレイ解析を行う事を目的とした。

(3) AIS モデルマウスにおいて発生する精巣腫瘍の組織学的解析を行うこと、精巣より mRNA を抽出しマイクロアレイ解析を行うことでアンドロゲン下流シグナル低下による精巣腫瘍発生の分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ZNF288 による AR 転写抑制メカニズムを解明する目的で Flag 精製を行った。

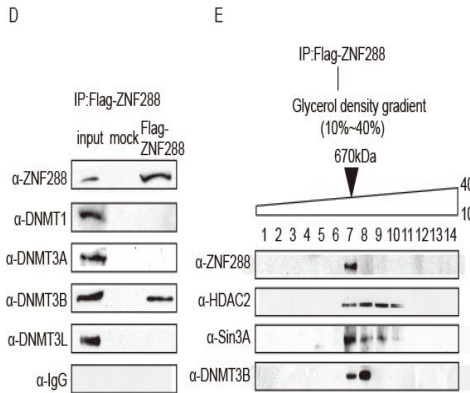
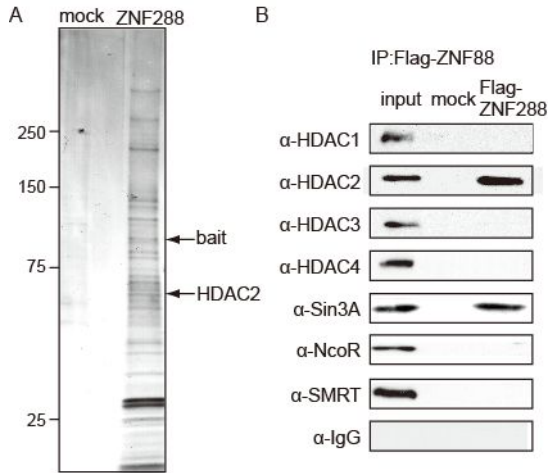
(2) ノードマウス精巣に NEC8 細胞移植後、コラーゲンマトリゲルを用いて ZNF288 をノックダウンし、増殖、転移への影響を観察した。

(3) TCam-2 細胞株においてアンドロゲン投与を行い、細胞増殖への影響を観察した。

(4) TCam-2 細胞皮下移植モデルマウスに対して除睾術を行いその増殖速度を観察した。

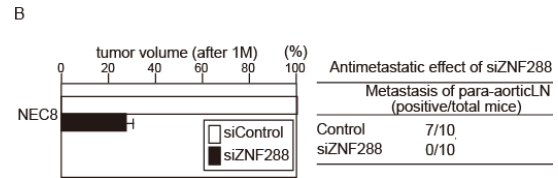
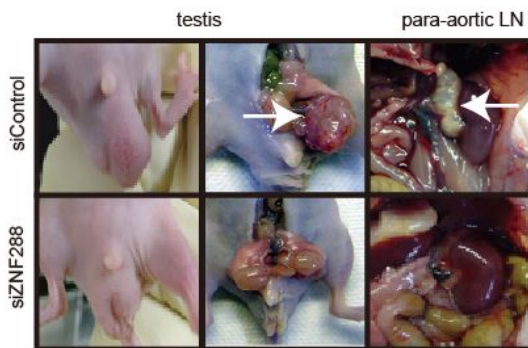
4. 研究成果

(1) ZNF288 結合因子として、N-CoR/SMRT コンプレックスの構成因子として知られる HDAC2 が同定された。さらにウェスタンブロットティングの結果 sin3A、DNMT3B と結合し、それらは複合体を形成していることが判明した。すなわち ZNF288 は HDAC2、sin3A、DNMT3B をリクルートし、ヒストンの脱アセチル化やメチル化を介して AR の転写活性を抑制することがわかった。

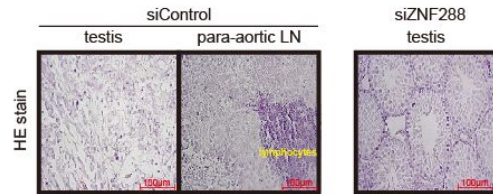


(2) マウス移植モデルを用いた実験により ZNF288 のノックダウンが精巣腫瘍の増殖、転移を抑制することが判明した。すなわち ZNF288 は精巣腫瘍細胞の増殖、転移を促進し、治療の標的となる可能性が示唆された。

A

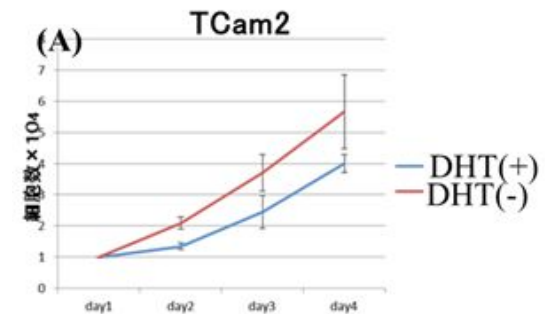


C

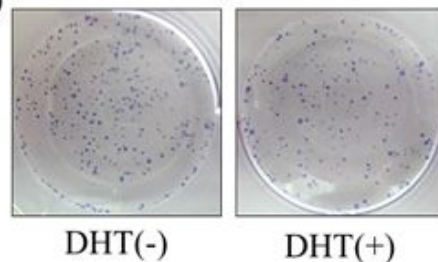


(3) セミノーマ細胞株 TCam-2 においてアンドロゲン投与を行い増殖速度を観察した (A,B)。

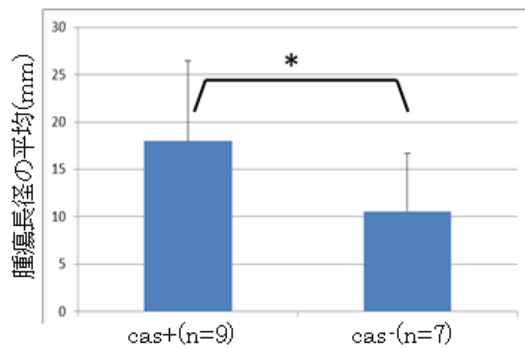
その結果アンドロゲン投与によってセミノーマ細胞の増殖が抑制されることが判明した。



(B)



(4) TCam-2 細胞のヌードマウスに皮下移植後に除睾術を行い、増殖速度を観察した。その結果、in vivo においてもアンドロゲンはセミノーマ細胞の増殖を抑制する事が判明した。



以上より疫学から推測される仮説である「アンドロゲン作用の低下は精巣腫瘍、セミノーマの増悪に寄与する」と一致する結果が観察された。

現在我々は上記モデルマウスより腫瘍を摘出し、mRNAを抽出しマイクロアレイ解析によりアンドロゲンによるセミノーマ増殖抑制のメカニズムの解明を試みている。

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 4 件)

1. Takahashi S, Watanabe T, Okada M, Inoue K, Ueda T, Takada I, Watabe T, Yamamoto Y, Fukuda T, Nakamura T, Akimoto C, Fujimura T, Hoshino M, Imai Y, Metzger D, Miyazono K, Minami Y, Chambon P, Kitamura T, Matsumoto T, Kato S., Noncanonical Wnt signaling mediates androgen-dependent tumor growth in a mouse model of prostate cancer., Proc Natl Acad Sci U S A., 108, 4938-43 (2011) 査読有

2. Ito S, Fujiyama-Nakamura S, Kimura S, Lim J, Kamoshida Y, Shiozaki-Sato Y, Sawatsubashi S, Suzuki E, Tanabe M, Ueda T, Murata T, Kato H, Ohtake F, Fujiki R, Miki T, Kouzmenko A, Takeyama K, Kato S., Epigenetic silencing of core histone genes by HERS in Drosophila., Mol Cell., 45, 494-504 (2012) 査読有
3. Ueda T, Ito S, Shiraishi T, Kulkarni P, Ueno A, Nakagawa H, Kimura Y, Hongo F, Kamoi K, Kawauchi A, Miki T., Hyper-expression of PAX2 in human metastatic prostate tumors and its role as a cancer promoter in an in vitro invasion model., Prostate, 73, 1403-1 (2013) 査読有
4. Miki T, Kamoi K, Fujimoto H, Kanayama HO, Ohyama C, Suzuki K, Nishiyama H, Eto M, Naito S, Fukumori T, Kubota Y, Takahashi S, Mikami K, Homma Y., Clinical characteristics and oncological outcomes of testicular cancer patients registered in 2005 and 2008: The first large-scale study from the Cancer Registration Committee of the Japanese Urological Association. Int J Urol. in press. 査読有

[学会発表](計 2 件)

中河秀生、上田崇、上田紗弥、大石正勝、中村晃和、納谷佳男、本郷文弥、河内明宏、三木恒治

アンドロゲン受容体転写抑制による精巣腫瘍発生分子機構の解析

第101回日本泌尿器科学会総会

2013/4/18、札幌

中河秀生、上田崇、上田紗弥、大石正勝、
中村晃和、納谷佳男、本郷文弥、三木恒治
セミナー発生におけるアンドロゲン作用
の分子機構の解析
第 102 回日本泌尿器科学会総会
2014/4/25、神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

三木 恒治 (MIKI Tsuneharu)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：10243239

(2)研究分担者

上田 崇 (UEDA Takashi)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：50601598

中村 晃和 (NAKAMURA Terukazu)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：10381964

本郷 文弥 (HONGO Fumiya)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：80291798

河内 明宏 (KAWAUCHI Akihiro)
滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：90240952

三神 一哉 (MIKAMI Kazuya)

京都府立医科大学医学研究科・講師

研究者番号：平成 24 年 4 月 異動により
資格喪失

(3)連携研究者

該当なし