

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592321

研究課題名(和文)ダイオキシン類介在性アンドロゲン受容体分解による治療抵抗性前立腺癌の治療法開発

研究課題名(英文)Development of novel therapy for refractory prostatic cancer through degradation of androgen receptor by effects of dioxins

研究代表者

丸山 覚 (Maruyama, Satoru)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：80507591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト前立腺癌細胞株におけるダイオキシン受容体の発現状態を確認した。各種ダイオキシン類を選定し、これらリガンドの増殖能、転写能を確認した。いくつかのリガンドでLNCaPの増殖は抑制され、アンドロゲンレセプター(AR)発現は減少しており、濃度依存性が認められた。それに対し、ARの転写能は逆に上昇していた。この現象はアンドロゲン存在下/非存在下いずれでもみられ、ユビキチン-プロテアソーム系の関与が考えられた。しかし他のリガンド(Xとする)では増殖能、転写能ともに抑制された。以上よりホルモン不応性前立腺癌に対する治療効果が期待されると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The expression status of the dioxin receptor (AhR) in the cell line including the human prostate cancer was confirmed by Western blot analysis. LNCaP, which is known as prostate cancer cell line, proliferation is controlled for 3-Methylcholanthrene (3MC) and others as a typical AhR ligand, and the proliferation potency and the transcriptional ability of these ligands were confirmed, and androgen receptor (AR) appearance has decreased. The concentration dependency was admitted. On the other hand, the transcriptional ability of AR rose oppositely. This phenomenon was seen also in the presence or absence of androgen, and was concerned to ubiquitin-proteasome system. However, it was confirmed to control both proliferation potencies and the transcriptional abilities in other ligands (ligand X). As a result, it was thought that the therapeutic gain to the hormone refractory prostate cancer was expected.

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：腫瘍学 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

1. 研究開始当初の背景

性ホルモンは生理学的な働き以外に、内分泌関連組織由来の癌の増殖に関与する。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や卵巣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、除睾術、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、癌細胞の成長抑制、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わかってきた。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。

2. 研究の目的

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 が存在するがぎり癌を完全に制御することは困難と考えられた。AR は MDM2 や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。本研究はその延長として、AR を直接分解することによりホルモン依存性、非依存性を問わず前立腺癌の増殖抑制をもたらす治療的效果につなげること、また投与薬剤の選別および至適投与量の予測を目的とするものである。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌細胞株におけるダイオキシン受容体 (AhR) の発現

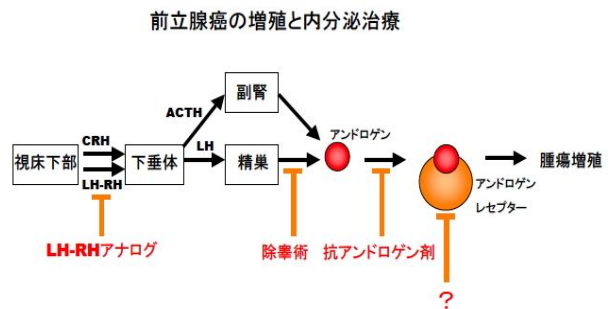
前立腺癌細胞株における AhR の mRNA およびタンパク質レベルでの発現量を計測する。

(2) ダイオキシン受容体発現前立腺癌株の AR 転写活性および増殖能

AhR の発現の変化を確認した場合、その細胞株の in vitro での転写活性や増殖能を検討する。増殖能は MTS アッセイ法により、0, 2, 4, 6, 8 日目に測定した。転写能はルシフェラーゼアッセイにて測定した。またそれぞれの実験系において DHT および AhR リガンドの有無での比較を行った。AhR の siRNA による発現抑制株も同時に検討する。

(3) ダイオキシン受容体リガンド暴露による前立腺癌細胞株における AR 発現量

前立腺癌細胞株の in vitro での各種 AhR リガンドに暴露された状態における AR の発現量を確認する。それぞれの実験系において DHT および 3MC の有無での比較を行う。AhR の siRNA による発現抑制株も検討する



4. 研究成果

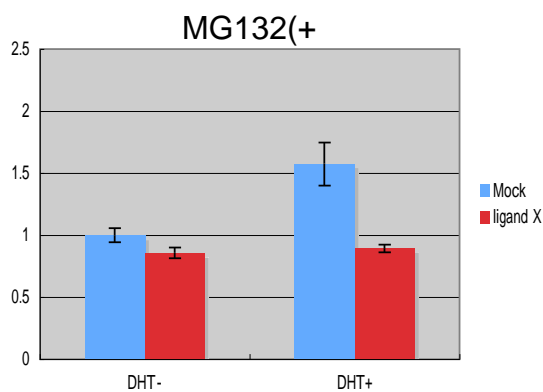
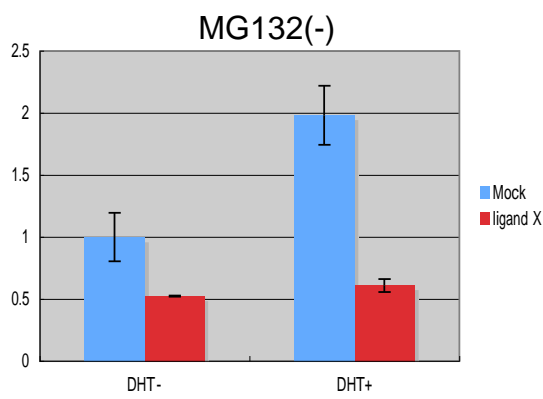
(1) アンドロゲン受容体の転写活性: アンドロゲン受容体(AR)およびダイオキシン受容体(AhR)を発現している前立腺癌細胞株(LNCaP)に MMTV-Luc (AR 結合配列を含むプロモーター領域をもつレポーターベクター)を発現させ、ルシフェラーゼアッセイを行った。各条件の細胞株の AR および AhR の発現量(mRNA、タンパク)をそれぞれ定量的 Real-time PCR 法およびウエスタンブロット法で確認した。以上を、同様にアンドロゲンおよび各種ダイオキシン類(Indirubin, 3MC)の有無、また添加量を変えて検討を行った。結果としてダイオキシン類を投与した場合、用量依存的にアンドロゲン受容体の転写活性が低下することを確認した。これはプロテアソーム阻害剤により抑制されたことよりダイオキシン類のアンドロゲン受容体分解が関与していることが示唆された。(図1)現在は LNCaP 以外の前立腺癌細胞株(PC-3, DU-145, 22RV1)でも同様の試験を行っている。

(2) 前立腺癌細胞株増殖: AR および AhR 発現している前立腺癌細胞株(LNCaP)を培養し、細胞数計測と MTT アッセイをおこなった。結果としてアンドロゲンの有無にかかわらず、ダイオキシン類添加により、用量依存的にホルモン依存性前立腺癌細胞の増殖が抑制された。現在は LNCaP 以外の前立腺癌細胞株でも同様の試験を行っている。(図2)

(3)ダイオキシン類の Maus への投与(毒性の確認、致死量の推定): 上記ダイオキシン類をいくつかの投与量にふって Maus に経口および経腹膜投与をおこない連日観察を施行中である。

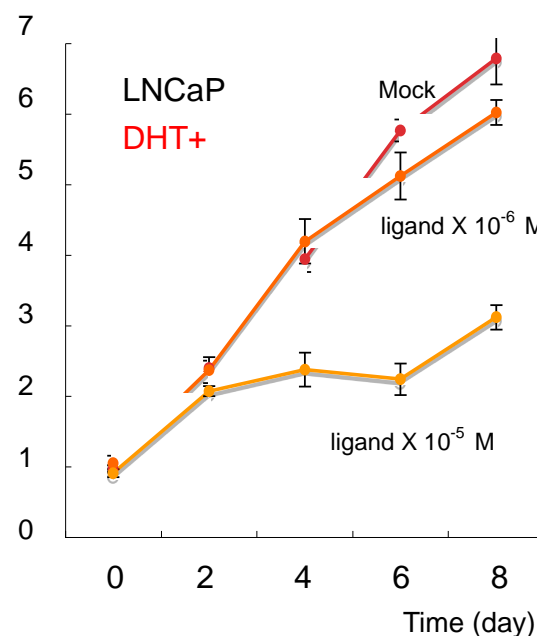
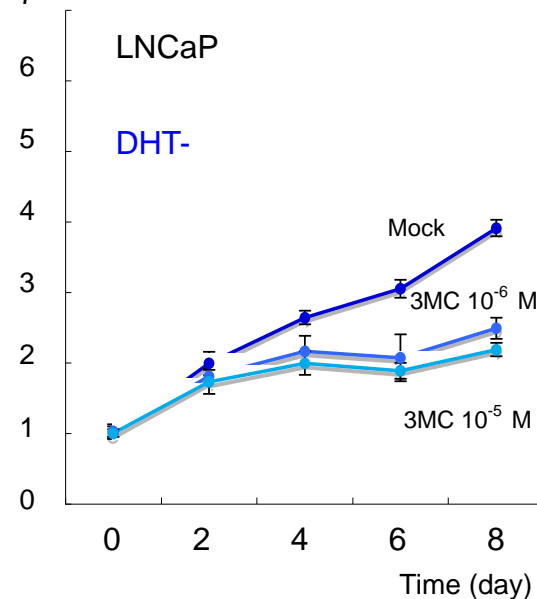
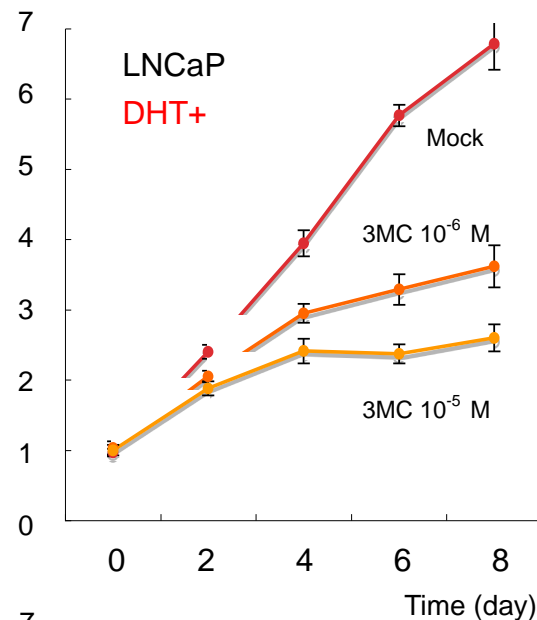
(4)前立腺癌におけるダイオキシン受容体の発現: パラフィン固定した前立腺手術組織検体で AhR 抗体を用いて免疫組織染色を行いタンパク質レベルでの発現量を見る準備をしている。今後、前立腺癌の異型度や予後などの臨床的パラメーター(臨床病期、PSA 値、組織分化度(グリーソンスコア)、予後(PSA 再発))との相関の有無を検討中である。

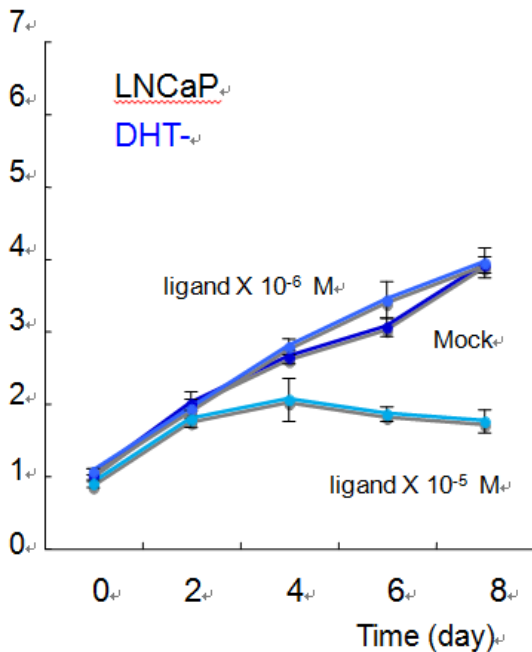
図1 AhR リガンドと AR 転写能



MG132: プロテアソーム阻害剤

図2 AhR リガンドと前立腺癌細胞株増殖





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 5 件)

1. Longitudinal comparison of quality of life after real-time tumor-tracking intensity-modulated radiation therapy and radical prostatectomy in patients with localized prostate cancer.
Shinohara N, Maruyama S, Shimizu S, Nishioka K, Abe T, C-Hatanaka K, Oba K, Nonomura K, Shirato H.
J Radiat Res. 2013 May 9. :54(6):1095-101. 査読有
2. Renal Hypothermia With Ice Slush in Laparoscopic Partial Nephrectomy: The Outcome of Renal Function.
Abe T, Sazawa A, Harabayashi T, Shinohara N, Maruyama S, Morita K, Matsumoto R, Aoyagi T, Nonomura K.
J Endourol. 2012 Sep 17. :26(11):1483-8, 査読有
3. A new prognostic classification for overall survival in Asian patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma.
Shinohara N, Nonomura K, Abe T, Maruyama S, Kamai T, Takahashi M, Tatsugami K, Yokoi S, Deguchi T, Kanayama H, Oba K, Naito S.
Cancer Sci. 2012 May 30. :103(9):1695-1700. 査読有
4. Interferon- γ -based immunotherapy in

metastatic renal cell carcinoma patients with the primary tumor in situ.
Shinohara N, Abe T, Sazawa A, Maruyama S, Shindo J, Sato S, Suzuki S, Nonomura K.

Jpn J Clin Oncol. 2012 Feb;42(2):113-9. Epub 2011 Nov 29. 査読有

5. Influence of baseline renal function and dose reduction of nephrotoxic chemotherapeutic agents on the outcome of metastatic urothelial carcinoma: a retrospective study.

Maru S, Abe T, Shinohara N, Sazawa A, Maruyama S, Harabayashi T, Suzuki S, Nonomura K.

Int J Urol. 2012 Feb;19(2):110-6. Epub 2011 Nov 29. 査読有

[学会発表](計 2 件)

1. 第101回日本泌尿器科学会総会 2013年4月25日(木)~28日(日) さっぽろ芸術文化の館、ロイトン札幌、札幌市教育文化会館、札幌プリンスホテル 国際館パミール(札幌市)
(一般発表)
ダイオキシン受容体内因性リガンドによる前立腺癌細胞におけるアンドロゲンレセプター発現低下と増殖抑制
丸山 覚、築山忠維、河津隆文、佐藤 折矢、千葉博基、安部崇重、佐澤 陽、篠原 信雄、畠山鎮次、野々村克也
2. 第21回泌尿器科分子・細胞研究会 2012年2月10日(金) 11日(土) 北海道大学(札幌市)
ダイオキシン受容体内因性リガンドによる前立腺癌細胞におけるアンドロゲンレセプター発現低下と増殖抑制
丸山 覚、築山忠維、河津隆文、佐藤 折矢、千葉博基、安部崇重、佐澤 陽、篠原 信雄、畠山鎮次、野々村克也

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸山 覚 (MARUYAMA SATORU)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：80507591

(2)研究分担者

篠原 信雄 (SHINOHARA NOBUO)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90250422

(3)連携研究者

なし