

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790075

研究課題名（和文） 核内受容体のノンゲノミックファンクションを介した血管新生・腫瘍形成抑制機構の解析

研究課題名（英文） Study on the mechanism of anti-angiogenesis and tumorigenesis through genomic function of nuclear receptor

研究代表者

仲島 由佳（NAKAJIMA YUKA）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40399499

研究成果の概要（和文）：

ER リガンドが、全く新しい核内受容体の経路である ERβ の Non-genomic 経路を介してアンドロゲン不応性前立腺癌の腫瘍血管新生を強力に抑制することによって腫瘍形成を阻害することを明らかにした。さらに、NFκB が新たな ERβ の Non-genomic の標的転写因子であることを明らかにし、その活性を抑制させる化合物を同定した。これらの結果は、新たなアンドロゲン不応性前立腺癌の治療薬開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

I found that ER ligands suppress tumor angiogenesis of androgen independent prostate cancer through novel non-genomic pathway of ERβ, and thereby inhibit tumor growth. Moreover, I also found that NFκB is novel target gene of ERβ non-genomic pathway, and identified some inhibitory compounds of NFκB activity. These findings may provide a suitable target for androgen independent prostate cancer treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：血管新生、腫瘍形成、エストロゲン受容体

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は男性ホルモンであるアンドロゲン依存的に増殖を示す癌である。そのため、前立腺癌の治療には、通常アンドロゲン除去療法が行われる(Issac & Issac, *Nat. Med.*, 2004)。しかしながら、アンドロゲン除去療法は早期の前立腺癌には有効であるが、やがてアンドロゲン除去療法が効かなくなり予後不良となる(Schmit *et al.*, *Urology*, 2001)。現在、このようにアンドロゲン不応性となった前立腺癌に対する有効な治療法はほとんどない。

近年、アンドロゲン不応性前立腺癌治療のオプションの一つとして女性ホルモンであるエストロゲンの投与が行われている

(Hazstark *et al.*, *Expert. Opin. Pharmacother.*, 2010)。エストロゲンは、核内受容体に属するエストロゲンレセプター（Estrogen Receptor; ER）を介してその作用を発揮することが知られている。エストロゲンが結合した ER は DNA 上の特異的な配列を認識・結合し、標的遺伝子の転写を制御する（Genomic function）。また、エストロゲンは主作用だけではなく、心不全、血栓症、乳房腫脹、肝機能障害などの副作用を引き起こすこと報告されている。この副作用は、ER の Genomic function を介していると考えられている。

ER には ERα と ERβ の二つのサブタイプが存在し、前立腺上皮細胞には ERβ が主に発現

している。アンドロゲン不応性前立腺癌において、ERβはエストロゲンの働きに関与していることが報告されているが、その分子機構は明らかになっていない。

申請者らは、高濃度エストロゲン投与によるアンドロゲン不応性前立腺癌の腫瘍形成の抑制は、血管新生阻害を介していることを明らかにした。

さらに、このエストロゲンの効果は ERβのみならず、転写因子 KLF5 (Kruppel-like transcription factor) を介していることを見出した。

また、KLF5 の転写は ERβを介してエストロゲンにより抑制された。これらの結果から、エストロゲンは ERβの Non-genomic function を介してアンドロゲン不応性前立腺癌の腫瘍形成を抑制することが示唆された。

次に、化合物ライブラリーのスクリーニングを行った結果、新規化合物により ERβの Genomic function と Non-genomic function が個別に制御出来る可能性が示された。

2. 研究の目的

申請者らは、エストロゲンや新規化合物を含む ER リガンドのアンドロゲン不応性前立腺癌の腫瘍形成に対する抑制作用は、全く新しい ERβの機能を介した KLF5 の転写活性抑制に由来していることを明らかにした。しかしながら、その分子制御機構は未だ明らかになっていない。

そこで本研究では、ER リガンドによる ERβ/KLF5 を介したアンドロゲン不応性前立腺癌形成抑制の分子メカニズムを解明することを目指す。

さらに、ERβの Non-genomic function の標的因子を探索・同定し、その分子制御メカニズムを解明する。その分子機構を基にして Non-genomic function のみに作用する化合物をスクリーニングし、前立腺癌以外の癌治療や副作用の少ない医薬品開発への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 新規化合物による ERβ/KLF5 を介した血管新生・腫瘍形成抑制機構の解析

①免疫沈降法：ERβと KLF5 の結合を検討し、ER リガンドの ERβ と KLF5 の結合への影響を評価する。

②Gene Chip解析：ER リガンド添加と KLF5 ノックダウンによる遺伝子発現を比較することにより、血管新生・腫瘍形成に関与する ERβ/KLF5 の標的遺伝子を特定する。

③ルシフェラーゼアッセイ：GAL4に KLF5 の DNA 結合配列を除いた配列をつないだコンストラクトを用いたルシフェラーゼアッ

セイにより、KLF5 の転写活性化能における ER リガンドの影響を検討する。

④クロマチン免疫沈降法：ERβ、KLF5 や転写共役因子の標的遺伝子プロモーターへの結合における ER リガンドの影響を検討する。

(2) ERβ/KLF5 の標的遺伝子の *in vivo* 機能解析

① *in vivo* 血管新生試験：ERβ/KLF5 の標的遺伝子を過剰発現又はノックダウンさせた前立腺癌細胞と共にマトリゲルをマウス皮下に移植する。約 7 日後、マトリゲルを皮下から取り出し、赤血球数の測定により、血管新生に対する影響を評価する。

② *in vivo* 抗腫瘍試験：ERβ/KLF5 の標的遺伝子を過剰発現又はノックダウンさせた前立腺癌細胞とマトリゲルをマウス皮下に移植する。経時的に腫瘍の大きさを測定し、約 28 日後、腫瘍を取り出し、重さを測定することで腫瘍形成に対する影響を評価する。

(3) *in silico* による最適化化合物の設計とその評価

① *in silico* シミュレーション：AutoDock Vina プログラムを用いて ERβ の結晶構造に基づき ERβ と新規化合物の結合様式の予測を行う。

②ファーマコフォア解析：MOE (Molecular Operating Environment) システムを用いてルシフェラーゼアッセイの結果とその構造情報を基に、抑制活性に必要なドメインを計算・予測する。

(4) ERβ の Non-genomic function を介した NFκB による転写抑制化合物の探索

レポータープラスミドに NFκB の結合配列をつないだコンストラクトを用いたルシフェラーゼアッセイにより、NFκB の転写活性における候補化合物の影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 新規化合物による ERβ/KLF5 を介した血管新生・腫瘍形成抑制機構の解析

申請者は、新規化合物が ERβ/KLF5 を介した血管新生・腫瘍形成を抑制することを見出した。そこで、この詳しい分子機構を解析するために、以下の 3 項目について実験を進めた。①免疫沈降法により、新規化合物新規化合物の ERβ と KLF5 の結合への影響を評価した。その結果、ERβ と KLF5 タンパク質との結合には新規化合物は影響しないことが明らかになった。

②これまでに、新規化合物が ERβ 依存的に KLF5 の転写活性化能を抑制させることを明らかにしている。そこで、血管新生・腫瘍形

成に関与する ERβ/KLF5 の標的遺伝子の解析を Gene Chip を用いて行い、PDGFs を同定した。PDGFA と PDGFB の mRNA 量は新規化合物添加により ERβ 又は KLF5 依存的に減少することを Real time PCR 法により確認した。

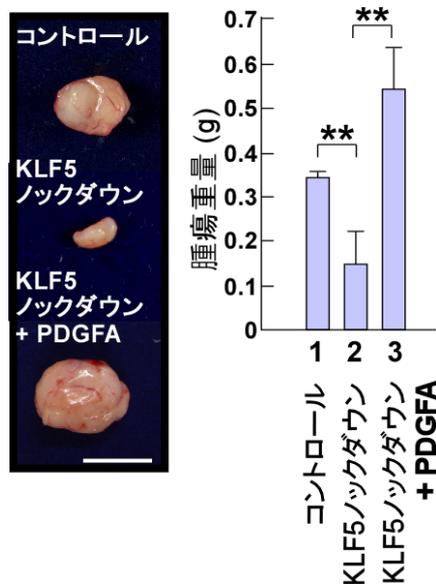
③ KLF5 の PDGFA プロモーターへの結合における新規化合物の影響をクロマチン免疫沈降法により検討した。その結果、KLF5 の PDGFA プロモーターへの結合は新規化合物の添加により阻害されることが明らかになった。

(2) ERβ/KLF5 の標的遺伝子である PDGFA の *in vivo* 機能解析

① *in vivo* 血管新生試験：KLF5 のノックダウンにより抑制された血管新生は PDGFA の添加により回復した。この結果から KLF5 の血管新生効果は PDGFA を介していることが明らかになった。さらに、新規化合物の投与により抑制された血管新生もまた PDGFA 添加により回復したことから、新規化合物の KLF5/ERβ を介した血管新生抑制効果は PDGFA によることが示された。

② *in vivo* 抗腫瘍試験：これまでに新規化合物の腫瘍形成抑制効果は ERβ 又は KLF5 のノックダウンにより消失することからこの新規化合物の効果は ERβ/KLF5 を介していることを明らかにしていた。そこで前立腺癌細胞を移植した担癌モデルマウスを用いた抗腫瘍試験を行い、KLF5 の腫瘍形成能が PDGFA を介しているかどうかの検討を行った。その結果、KLF5 のノックダウンにより抑制された腫瘍形成は PDGFA の過剰発現により回復したことから (図 1)、KLF5 の腫瘍形成促進効果は PDGFA を介していることが明らかになった。

(図 1)

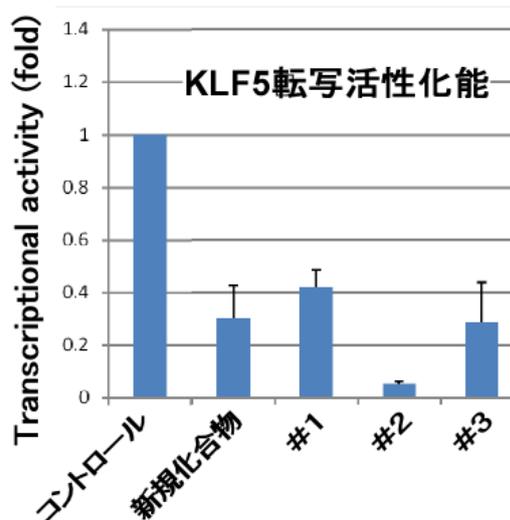


(3) ERβ と KLF5 を介して血管新生を抑制する最適化合物の設計と評価

① *in silico* による最適化合物の設計：これまでに ERβ の結晶構造に基づいた *in silico* シミュレーションによって ERβ と新規化合物の結合様式の予測を行った結果、新規化合物は ERβ の Glu 305 と Arg 346 と水素結合を形成していることが予測された。この結合が新規化合物の KLF5 活性抑制に関与しているのかどうかを確かめるために 305 番目のグルタミン酸をアラニンに置換した変異型 ERβ を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、新規化合物による ERβ 依存的な KLF5 の転写活性化能の抑制効果は変異体により軽減された。

② 最適化合物の評価：*in silico* 予測を含む最適化合物の KLF5 の転写活性化能に対する作用を検討した。その結果、いくつかの最適化合物は KLF5 の転写活性化能に対して強い抑制能を示すことが明らかになった。さらに、KLF5 の下流因子であり血管新生に関与する PDGFA の転写への影響を検討した結果、これらの化合物により、PDGFA の転写が抑制されることが明らかになった。

(図 2)



(4) ERβ の non-genomic function を抑制する化合物のスクリーニング

これまでの報告から、ERβ はその non-genomic function により、HIF-1α による VEGF の転写や、NFκB による IL-8 の転写を制御している可能性が考えられる。そこで、HIF-1α の転写に対する作用を測定するための HIF-1 の応答配列を挿入したレポータープラスミドを構築し、低酸素により誘導される HIF-1 を介した転写の活性化が検出できることを確認した。さらに、この系を用いたスクリーニングを行った結果、数種類の化合物を単離することが出来た。

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)

[学会発表] (計8件)

1) 仲島由佳

新規核内授与体制御機構に基づいた腎性骨症治療薬の開発

第5回慢性腎臓病病態研究会, 2012年7月28日, 東京

2) 仲島由佳、刑部朝実、石川寛子、赤荻健介、柳澤純

ERβのノンクラシカル経路の前立腺癌進行における役割

転写代謝システム・転写研究会共催「若手ワークショップ@湯河原」、2012年2月10日、湯河原

3) 仲島由佳

エストロゲン受容体の新規ノンクラシカル経路を介した前立腺癌治療の可能性

第14回 UTPシンポジウム, 2012年1月15日, 東京

4) Asami Osakabe, Yuka Nakajima, Hiroko Ishikawa, Junn Yanagisawa

KLF5-ERβ pathway is responsible for the contradictory effects of estrogen on prostate tumor formation

第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月14日, 横浜

5) Hiroko Ishikawa, Yuka Nakajima, Junn Yanagisawa

A novel ER antagonist suppresses prostate tumor growth by inhibiting ERβ-KLF5 pathway without estrogenic action

第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月14日, 横浜

6) Yuka Nakajima et al.

KLF5-ERβ pathway is responsible for the biphasic effects of estrogen on prostate tumor growth

70th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, 2011年10月4日, 名古屋

7) Yuka Nakajima et al.

Estrogen receptor ligands regulate prostate tumor formation through a nonclassical pathway that includes ERβ and KLF5

The EMBO meeting 2011, 2011年9月11日, オーストリア

8) Asami Osakabe, Yuka Nakajima et al.

KLF5-ERβ pathway is responsible for the contradictory effects of estrogen on prostate tumor growth.

The EMBO meeting 2011, 2011年9月11日, オーストリア

[図書] (計2件)

1) 仲島由佳、和久 剛、柳澤 純

(財)金原一郎記念医学医療振興財団/医学書院
がん基盤生物学—革新的シーズ育成に向けて—, 2013年, 8ページ

2) 仲島由佳、山口智絵、石川寛子、柳澤 純

(財)金原一郎記念医学医療振興財団/医学書院
細胞核—構造と機能—, 2011年, 2ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲島 由佳 (NAKAJIMA YUKA)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号: 40399499