

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462391

研究課題名(和文) ダイオキシン受容体リガンド依存性のアンドロゲン受容体分解を介した前立腺癌制御

研究課題名(英文) Inhibition of prostatic cancer through degradation of androgen receptor by effects of dioxin receptor ligand

研究代表者

丸山 覚 (Maruyama, Satoru)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：80507591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：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(レポーターベクター)を発現させ、Indirubinや3MCを負荷してアッセイをおこなった。各条件の細胞株のARおよびAhRの発現量(mRNA、タンパク)をそれぞれ確認し、AR発現量の減少を確認した。マウスに経口投与観察を施行中であり、耐用量が判明しつつある。今後、ホルモン療法抵抗性前立腺癌への治療効果が期待できる。

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 indirubin or 3-Methylcholanthrene (3MC) 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. Nude mice had been administrated these dioxin ligands through peritoneal injection. So, tolerated dose has been becoming clear. 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

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

1. 研究開始当初の背景

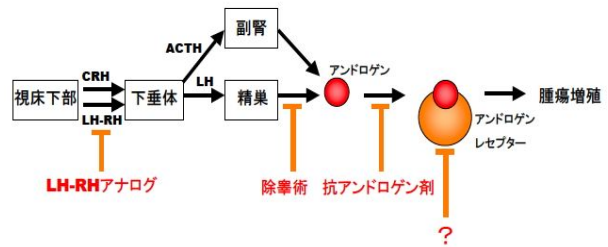
性ホルモンは生理学的な働き以外に、内分泌関連組織由来の癌の増殖に関与する。具体的にはアンドロゲン依存性を示す前立腺癌やエストロゲン依存性を示す乳癌や卵巣癌などのホルモン依存性癌の増殖作用である。前立腺癌では、たとえ遠隔転移を有する進行癌であっても、除勢術、LH-RH アナログ投与などで血中アンドロゲンを低下させること、またはアンドロゲンとその受容体との結合を遮断することにより、癌細胞の成長抑止、アポトーシスを促すホルモン療法が奏功する。しかし、その奏功期間は限られており半数は5年以内にホルモン非依存性となり制御不能となる。

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(2013年日本泌尿器科学会発表)。本研究はその延長として、co-factorの修飾ではなく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効果につなげること、また創薬に通ずる具体的な投与薬剤選別および至適投与量検討を目的とするものである。

前立腺癌の増殖と内分泌治療



3. 研究の方法

(1) 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)をはじめ、ICZ、FICZ、DIMなどのインドール化合物を考えている。それぞれ毒性や体内の代謝動態が異なることが予想される。

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に、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。

(2) ダイオキシン受容体発現前立腺癌株の増殖能

ARおよびAhRを発現している前立腺癌株の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。

3) 前立腺癌におけるダイオキシン受容体の発現

前立腺手術組織検体におけるARおよびAhRのmRNAおよびタンパク質レベルでの発現量を計測し、双方の関係や前立腺癌の臨床的パラメーターとの相関の有無を確認する。

#### 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おこなった。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。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。

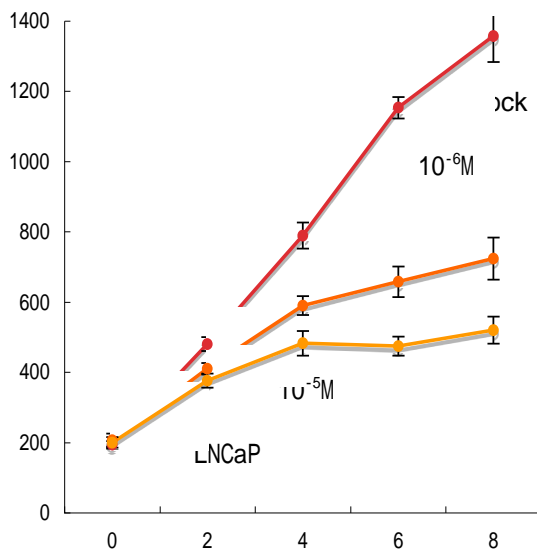


図) AhR リガンドと前立腺癌細胞株増殖

(3) 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みる準備をしている。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。

#### 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 11 件)

1. Abe T, Ishizaki J, Kikuchi H, Minami K, Matsumoto R, Harabayashi T, Sazawa A, Mochizuki T, Chiba S, Akino T, Murakumo M, Miyajima N, Tsuchiya K, Maruyama S, Murai S, Shinohara N. Outcome of metastatic urothelial carcinoma treated by systemic chemotherapy: Prognostic factors based on real-world clinical practice in Japan. *Urol Oncol*. 2016 Sep 29. pii: S1078-1439(16)30253-8. doi: 10.1016/j.urolonc.2016.08.016.

2. Harada T, Abe T, Kato F, Matsumoto R, Fujita H, Murai S, Miyajima N, Tsuchiya K, Maruyama S, Kudo K et al: Five-point Likert scaling on MRI predicts clinically significant prostate carcinoma. *BMC urology* 15, 91, 2015

3. Murahashi N, Abe T, Shinohara N, Murai S, Harabayashi T, Sazawa A, Maruyama S, Tsuchiya K, Miyajima N, Hatanaka K et al: Diagnostic outcome of ureteroscopy in urothelial carcinoma of the upper urinary tract: Incidence of later cancer detection and its risk factors after the first examination. *BMC urology* 15, 92, 2015

4. Kitamura S, Hata H, Inamura Y, Imafuku K, Yanagi T, Oishi Y, Maruyama S, Shimizu H: Chronic papillomatous dermatitis around an ileostoma. *The Journal of dermatology* 2015. Oct 28. doi: 10.1111/1346-8138.

5. Matsumoto R, Takada N, Abe T, Minami K, Harabayashi T, Nagamori S, Hatanaka KC, Miyajima N, Tsuchiya K, Maruyama S, Murai S, Shinohara N: Prospective mapping of lymph node metastasis in Japanese patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer: characteristics of micrometastasis. *Jpn J Clin Oncol* 45, 874-80, 2015

6. Sugimoto M, Hiramata H, Yamaguchi A, Koga H, Hashine K, Ninomiya I, Shinohara N, Maruyama S, Egawa S, Sasaki H et al: Should inclusion criteria for active surveillance for low-risk prostate cancer be more stringent? From an interim analysis of PRIAS-JAPAN. *World J Urol* 33, 981-7, 2015

7. Abe T, Takada N, Matsumoto R, Osawa T,

Sazawa A, Maruyama S, Tsuchiya K, Harabayashi T, Minami K, Nagamori S et al: Outcome of Regional Lymphadenectomy in Accordance With Primary Tumor Location on Laparoscopic Nephroureterectomy for Urothelial Carcinoma of the Upper Urinary Tract: A Prospective Study. J Endourol 29, 304-9, 2015

8. Shimizu S, Nishioka K, Suzuki R, Shinohara N, Maruyama S, Abe T, Kinoshita R, Katoh N, Onimaru R, Shirato H: Early results of urethral dose reduction and small safety margin in intensity-modulated radiation therapy (IMRT) for localized prostate cancer using a real-time tumor-tracking radiotherapy (RTRT) system. Radiat Oncol 9, 118, 2014

9. Nishioka K, Shimizu S, Shinohara N, Ito YM, Abe T, Maruyama S, Kinoshita R, Harada K, Nishikawa N, Miyamoto N et al: Prospective phase II study of image-guided local boost using a real-time tumor-tracking radiotherapy (RTRT) system for locally advanced bladder cancer. Jpn J Clin Oncol 44, 28-35, 2014

10. Matsumoto R, Abe T, Shinohara N, Murai S, Maruyama S, Tsuchiya K, Nonomura K: RENAL nephrometry score is a predictive factor for the annual growth rate of renal mass. Int J Urol 21, 549-552, 2014

11. Abe T, Takada N, Shinohara N, Matsumoto R, Murai S, Sazawa A, Maruyama S, Tsuchiya K, Kanzaki S, Nonomura K: Comparison of 90-day complications between ileal conduit and neobladder reconstruction after radical cystectomy: A retrospective multi-institutional study in Japan. Int J Urol 21, 554-559, 2014

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丸山 覚 (SATORU MARUYAMA)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：80507591

### (2) 研究分担者

篠原 信雄 (NOBUO SHINOHARA)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90250422

### (3) 連携研究者：なし

### (4) 研究協力者：なし