

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 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：26462392

研究課題名(和文) ユビキチン化酵素を標的とした去勢抵抗性前立腺癌の治療法開発

研究課題名(英文) Development of "Ubiquitin" -targeted Prostate cancer treatment

研究代表者

宮島 直人 (Miyajima, Naoto)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：40581111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：TRIM68がユビキチン化・分解標的とする蛋白質(基質蛋白質)の検索を行った。候補となり得る約30種類のAR転写抑制因子の特異抗体とTRIM68特異抗体を使用し、免疫沈降法にてTRIM68と結合する転写抑制因子の同定を試みた結果、いくつかのTRIM68結合蛋白質は同定されたが、その後のユビキチン化アッセイにおいてTRIM68はその蛋白質をユビキチン化・分解しなかった(基質蛋白質は同定できず)。

研究成果の概要(英文)：We previously found that the putative E3 ubiquitin ligase TRIM68, which is preferentially expressed in prostate cancer cells, interacts with the AR (androgen receptor) and enhances transcriptional activity of the AR in the presence of androgen. We also found that TRIM68 functionally interacts with TIP60 and p300, which act as coactivators of the AR, and synergizes in transactivation of the AR. To reveal how the ubiquitination contribute to the AR function, we used molecular biology approaches such as immunoprecipitation assay, western blotting and Ubiquitination assay. Using several AR co-repressors and TRIM68 specific antibody, we performed immunoprecipitation and ubiquitination assay to identify the substrate of TRIM68 ubiquitin ligase. Unfortunately, we could not identify it, but these results indicate that TRIM68 functions as a cofactor for AR-mediated transcription and is likely to be a novel diagnostic tool and a potentially therapeutic target for prostate cancer.

研究分野：泌尿器科癌

キーワード：ユビキチン 前立腺癌

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は米国男性において最も多い癌であり、2番目に多い癌死の原因となっており、近年日本においても急増している癌の一つである。前立腺癌はホルモン依存性癌であり、アンドロゲン受容体(AR)は初期前立腺癌のみならず、ホルモン不応性前立腺癌における増殖や進展にも大きく関与している。ARの転写活性は、転写共役因子(活性化因子・抑制因子)により正負の制御がされていることが知られている。転写共役因子の研究は、ホルモン不応性前立腺癌の発生メカニズムや新たな治療法開発を考える上で非常に重要である。ARや転写共役因子の多くはリン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化などの翻訳後修飾によって、核内・外への移行、複合体の形成・安定化・分解など種々な機構により活性調節されていると考えられているが、その詳細はいまだ明らかではない。

ユビキチン・プロテアソーム系タンパク質分解システムは、タンパク質の翻訳後修飾機構の一つである。この系は3つの酵素、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)によって構成され、ATP依存性に遂行される。基質特異性をもつユビキチンリガーゼがE1やE2と共に標的タンパク質をユビキチン化し、ユビキチン化された標的タンパク質はプロテアソームと呼ばれる複合体によって速やかに分解される。この生化学的反応は、細胞周期制御、シグナル伝達及び癌化などの生命現象に関与していることが知られている。ユビキチンリガーゼには、現在までHECT(homologous to E6-AP carboxyl terminus)、RING、U-boxファミリーが知られている。

TRIM68は、RING-finger、B-box、coiled-coilという3つのドメインを共通に有するTRIM(tripartite motif-containing protein)ファミリーの一つである。TRIM68はさらにそのC末端にPRY/SPRYドメインを有する。RINGドメインはユビキチン化に重要であり、実際にTRIMファミリーのメンバーの多くはユビキチンリガーゼとして機能しており、C末端の多様性によりそれぞれの基質特異性を決定している。これまでに、TRIMファミリーは様々な生命現象に関与し、その変異は遺伝病、ウイルス感染、発癌など様々な病態の原因となっていることが報告されている。TRIM68は、シェーグレン症候群に関与する分子として同定され、血清中の抗TRIM68抗体は新たなシェーグレン症候群のマーカーとして報告されている。しかし、その機能的な役割はいまだ解明されていない。近年遺伝子発現データベース上において、TRIM68は、前立腺組織で特異的に発現しているとの報告がある。一方TRIM21は、構造的にTRIM68に類似の分子であり、同様にシェーグレン症候群に関連した自己抗体であ

る。近年、TRIM21はDNAに結合し転写因子として働き、さらに細胞増殖や細胞死に関与すると報告されている。したがって我々は、前立腺に特異的な発現パターンや、その類似分子の転写因子としての働きを考え、TRIM68が前立腺や前立腺癌におけるAR等の転写因子に関与しているだろうと推測した。

## 2. 研究の目的

ARは、転写共役因子により適切な転写バランスが保たれている。アンドロゲン非存在下では、転写抑制因子により転写が抑制されているが、アンドロゲン存在下では、転写抑制因子に代わり転写活性化因子がARに結合し、転写が活性化される。刻々と変化するアンドロゲン環境に素速く対応し、新たな転写を適切に行っていくために、古いARや転写共役因子は次々と分解されなければならないといわれている。

ユビキチン・プロテアソーム系蛋白質分解機構は翻訳後修飾の一つである。この系は、リソソームなどの非特異的自然分解系と違い、基質特異性をもつユビキチン化酵素が標的蛋白質をユビキチン化し、プロテアソームと呼ばれる複合体で速やかに分解することにより、細胞周期制御やシグナル伝達などダイナミックな変化を必要とする生命現象に大きく関与している。ユビキチン化酵素の異常は癌化や神経変性病など様々な疾患の原因となっている。例えば、ユビキチン化酵素であるVHL蛋白質の異常が、HIF1をユビキチン化、分解できず腎癌化に関与したり、ユビキチン化酵素BRCA1が乳癌の原因遺伝子であることは有名である。近年、ARを含む核内受容体や転写共役因子もユビキチン化により分解制御されていることが判明し、基礎的研究が盛んに行われている。しかし、前立腺癌細胞の増殖や進展にユビキチン化が関与し、実際の前立腺癌患者におけるユビキチン化酵素の発現異常を明らかにした報告は少ない。

そのため今回、前立腺特異的ユビキチン化酵素であるTRIM68の前立腺癌細胞増殖への影響や、前立腺癌組織におけるTRIM68の発現異常を検討することにより、ユビキチン化による前立腺癌増殖、進展の分子機構を明らかにすることを目的とした。また、本研究計画により、ユビキチン化酵素を阻害することによる前立腺癌制御の可能性を示し、前立腺癌に対する、ユビキチンを介した新たな分子標的治療を確立することをさらなる目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) RNA 干渉

U6プロモーターにTRIM68に特異的な配列とloop配列(5'-TTCAAGAGA-3')を

short-hairpin RNA として組み込んだ pMX-puro ベクターを作製した。TRIM68 に特異的な配列としてヌクレオチド 329-349 (siTRIM68-1)と 796-816 (siTRIM68-2)を使用した。コントロールとして enhanced green fluorescent protein (GFP)を使用した。作製した pMX-puro/shRNA ベクターをレトロウイルスを用いて LNCaP 細胞に感染させた。

#### (2) ルシフェラーゼアッセイ

24 ウエルプレートにて LNCaP 細胞 (1×10<sup>5</sup>) に mouse mammary tumor virus-luciferase (MMTV-Luc)レポーターベクターと pRL-TK ベクターを TRIM68 と共に Fugene を使用し導入した。アンドロゲン不含培養液で 24 時間培養した後、10<sup>-8</sup> M DHT 添加もしくは無添加の培養液でさらに 24 時間培養した。細胞を溶解した後 Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

#### (3) 細胞増殖アッセイ

96 ウエルプレートにて LNCaP 細胞 (5×10<sup>3</sup>) をアンドロゲン含培養液で培養し、2 日毎に CellTiter 96 one solution を用いて OD 490 をルミノメーターにて測定した (MTS アッセイ)。

#### (4) 免疫沈降

各プラスミドはリン酸カルシウム法で導入し、293T 細胞に一過性に発現させた。24 時間培養した後、細胞を溶解緩衝液にて可溶化し、4 で 12,000 回転、20 分間遠心したのち、その上清を用いた。抽出液は各抗体と 4 で 2 時間反応させ、次に Protein A Sepharose を 4 で 1 時間反応させ沈降し、その後溶解緩衝液で 5 回洗浄してサンプルとし免疫プロット法にて検出した。

#### (5) ユビキチン化アッセイ

TRIM68 タンパク質と基質(候補)蛋白質を発現させる各プラスミドをリン酸カルシウム法で導入し、293T 細胞に一過性に発現させた。24 時間培養した後、細胞を溶解緩衝液にて可溶化し、4 で 12,000 回転、20 分間遠心したのち、その上清をサンプルとし免疫プロット法を行った。抗ユビキチン抗体および基質(候補)蛋白質抗体を使用してユビキチン化を検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) AR 転写活性に対する作用

TRIM68 の AR に対する機能的な役割について調べた。AR の転写活性に及ぼす影響を調べるため、MMTV と呼ばれる AR 結合配列を含むプロモーター領域を持つレポーターベクター (MMTV-Luc) を LNCaP と CWR22Rv1 細胞に発現させ、その後 DHT を加え、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、TRIM68 は用量依存性に AR の転写活性を増強させた。一

方、ユビキチンリガーゼ活性を失活させた TRIM68 RING はいわゆる dominant negative な効果を示した。これにより TRIM68 は AR の転写活性化因子として働き、さらにその転写活性化能は、自身のユビキチンリガーゼ活性に依存的であることが判明した。

TRIM68 の機能をさらに確認するため、RNA 干渉法を用いて、LNCaP 細胞内の内在性 TRIM68 の発現を抑制し、ルシフェラーゼアッセイを行った。2 つの異なる配列をターゲットとした TRIM68-siRNA を作製しレトロウイルス法にて LNCaP 細胞内に導入し、免疫プロット法にて TRIM68 の発現量を確認した。その結果、2 つの異なる siRNA で共に LNCaP 細胞内の内在性 TRIM68 の発現抑制が確認された。さらにその細胞でルシフェラーゼアッセイを行ったところ、TRIM68 発現抑制 LNCaP 細胞ではコントロールに比べ AR 転写活性が減少していた。

#### (2) 前立腺癌細胞増殖への影響

次に、TRIM68 が前立腺癌の細胞増殖に及ぼす影響について調べた。siRNA 法にて LNCaP 細胞内の内在性 TRIM68 の発現抑制を行い、MTS 法にて経時的に生細胞数を測定しその細胞増殖能を調べた。コントロールとして GFP に特異的な siRNA を導入した LNCaP 細胞を使用した。その結果、TRIM68-siRNA を導入した LNCaP 細胞では、コントロールの LNCaP 細胞に比べて有意に細胞増殖能が減少していた。

#### (3) TRIM68 の標的蛋白質検索

TRIM68 はユビキチン化酵素であるため、何らかの基質蛋白質(標的蛋白質)をユビキチン化し分解することで、生体シグナルに関与しているはずである。しかし、現在までに TRIM68 が標的とする標的蛋白質の報告はない。そのため今回、TRIM68 の標的蛋白質検索を行った。TRIM68 は、ユビキチン化活性依存的に AR 転写制御に関与しているため、おそらく AR 転写共役因子(活性因子、抑制因子)が TRIM68 の標的蛋白質と推測した。

その候補となり得る約 30 種類の AR 転写抑制因子の特異抗体と、申請者がすでに独自に作成している TRIM68 特異抗体を使用し、免疫沈降法にて TRIM68 と結合する転写抑制因子の同定を試みた。

結果、転写活性化因子 TIP60 と転写抑制因子 P300 が TRIM68 の結合蛋白質として同定された。しかし、その後のユビキチン化アッセイでは、TRIM68 がそれら標的候補蛋白質をユビキチン化・分解しなかった。

前述の実験では、他の前立腺癌細胞株に比べ TRIM68 が約 5 倍豊富に存在する LNCaP 細胞を用いて免疫沈降法を行ったが、標的蛋白質を同定することができなかった。内因性蛋白質では発現が弱く同定が困難であったことが予想され、次いで plasmid を用いて外因性に TRIM68 や各転写抑制因子を 293T 細胞に

transfectionし過剰発現させ、さらに TRIM68 の AR 結合ドメインのみを Truncate した plasmid を過剰発現させた上で免疫沈降を行った。

結果、複数の TRIM68 結合蛋白質は同定されたが、それらはやはり TRIM68 でユビキチン化・分解されることはなかった(今回の実験においては、TRIM68 の標的蛋白質を同定することはできなかった)。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

泌尿器外科

2016年8月号(Vol.29 No.8)

「ユビキチン化酵素を介した去勢抵抗性前立腺癌の治療法開発」

(医学図書出版・1239-1240)

宮島直人

北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

宮島 直人 (MIYAJIMA, naoto)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号: 40581111

##### (2)研究分担者

篠原 信雄 (SHINOHARA, nobuo)

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号: 90250422

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号:

##### (4)研究協力者

( )