

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10610

研究課題名(和文) 前立腺癌におけるアンドロゲン応答機構の解明とそれを制御する新規治療薬の開発

研究課題名(英文) The elucidation on androgen signaling pathway in prostate cancer and development of its targeting drug

研究代表者

高橋 悟 (TAKAHASHI, Satoru)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：50197141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺がんの発生・進展はアンドロゲンシグナルに依存するため、アンドロゲン受容体(AR)およびその活性を調節する転写協調因子が重要な役割を持つ。これまでに我々は、網羅的ゲノム解析により、新規アンドロゲン応答遺伝子および転写協調因子を同定してきた。本研究ではそれらについて機能解析と、それらを標的とした薬剤の開発を試みた。解析の結果、アンドロゲン応答遺伝子であるACSL3, ABHD2, G3BP2遺伝子が前立腺癌の増殖・浸潤に促進的に働くことを見いだした。さらにAR転写協調因子OCT1を標的とするピロール・イミダゾール・ポリアミドを合成し、抗腫瘍効果を示すことを確認した。

研究成果の概要(英文)：Since androgen receptor (AR) signaling pathway has crucial role in genesis and development of prostate cancer (PCa), androgen deprivation therapy (ADT) is the first-line treatment for prostate cancer (PC). However, long term treatment with ADT often results in the recurrence of lethal castration resistant PC (CRPC), which remains a large unmet medical need. To develop effective curatives for CRPC, we have tried to identify new androgen responsive genes and AR collaborator, which regulate AR activity. In the present study, we conducted the functional analyses of these candidate genes, and examined the efficacy of pyrrole-imidazole polyamides (PIPs) targeting them. Our current data clearly indicated that the candidate genes ABHD2, G3BP2, ACSL3 could be induced by androgen, and have tumor promoting function for PC cells. In addition, we found that PIP, which could recognize OCT1 binding site had anti-tumor function in vitro and in vivo.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 アンドロゲン受容体 アンドロゲン応答遺伝子 PIポリアミド

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化、超高齢社会の到来に伴い、我が国でも前立腺癌による死亡者数が近年増加している。アンドロゲン除去療法は臨床的に汎用される前立腺癌治療法の一つであるが、治療経過とともに癌細胞の形質が変化し、アンドロゲン除去療法が無効(去勢抵抗性、CRPC)になり、その後の治療が困難となるケースが多い。

アンドロゲン受容体(AR)は核内受容体であり、リガンドであるアンドロゲンと結合後核内に移行し、AR 転写補助因子と協調しながら標的遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー領域内の特定配列(AR responsive elements; ARE)に結合し、標的遺伝子の発現を調節する。AR の活性はリガンドの量だけでなく、転写協調因子の発現量や発現パターンによっても影響される。

これまでに我々は、クロマチン免疫沈降とマイクロアレイを組み合わせた方法(ChIP-chip 法)を用いて、ヒトゲノムにおける AR 結合領域を網羅的に解析した(Takayama K et al, Oncogene 26: 4453-63, 2007)。このうち、前立腺癌の増殖に關与する新規アンドロゲン応答遺伝子 ARFGAP3 を同定し、ARFGAP3 は AR 転写協調因子パキシリンと協調して、AR 活性のポジティブフィードバック作用を有することを明らかにした(Obinata D et al, Int J Cancer 130: 2240-2248, 2012)。また、前述の新規同定された AR 結合領域を検討したところ、転写協調因子 Oct1 が AR の転写活性を増強させていることを見出した。さらに Oct1 は前立腺癌細胞の増殖を促進させ、臨床検体を用いた検討において、Oct1 の発現亢進と AR 発現量ならびに臨床的予後が關联することを明らかにした(Obinata D et al, Int J Cancer 130: 1021-1028, 2012)。また、これらとは別に新規に同定された2つのアンドロゲン応答遺伝子(ABHD2, G3BP2)が、前立腺癌細胞の増殖とドセタキセル抵抗性に關与していることを最近明らかにした。これらの知見は、内分泌療法により組織内のアンドロゲン濃度が極めて低濃度になっても、転写協調因子の作用により AR の活性化が維持され、前立腺癌の増殖に有利な環境が形成・維持されることを示唆する。

これらのアンドロゲン応答遺伝子や AR の転写協調因子は、治療標的としても非常に有望である可能性が高い。その際、配列特異的に DNA に結合する性質を持つピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)は転写制御薬として非常に有望であると考えた。PIP は芳香族アミノ酸 N-methylpyrrole(Py)および N-methylimidazole(Im) で構成される分子であり、Im/Py と Py/Py の組み合わせ次第で、様々な DNA 配列に結合させることができる。したがって、PI ポリアミドを各遺

位に結合させることで、遺伝子特異的な発現抑制が可能である。siRNA などと比較して生体内での安定性が高く、転写因子に相当する高い DNA 親和性を持つことから、新しい分子標的治療薬として期待される。

2. 研究の目的

(1) 我々が同定した新規アンドロゲン応答遺伝子(ABHD2, G3BP2)および AR の協調因子である OCT1 の発現制御様式や前立腺がんの細胞機能における役割解明。

(2) ABHD2, G3BP2 の発現を抑制する PIP、OCT1 によるアンドロゲン応答遺伝子の発現制御を阻害する PIP 開発
以上2点を目的する。

3. 研究の方法

(1) 各遺伝子の機能解析

siRNA により前立腺がん細胞株における各遺伝子の発現を抑制し、細胞増殖能、遊走能、浸潤能を WST8 assay, Wound healing assay, Matrigel invasion assay 等により解析した。ABHD2 と G3BP2 については、発現ベクター導入による過剰発現も行い、同様の検討を行った。また生体内での腫瘍増殖能に対する作用を検討するため、前立腺癌細胞株を免疫不全マウス皮下に移植して Xenograft を作成し、各遺伝子に対する siRNA を局所注射して腫瘍増殖の程度を計測した。

(2) 各遺伝子に対する PIP の合成と機能検証
OCT1 の標的遺伝子の一つである acyl-CoA synthetase 3(ACSL3)の上流の OCT1 結合領域を認識する PIP を合成し、前立腺癌細胞への作用を invitro および invivo で検討した。

4. 研究成果

(1) ABHD2

前立腺がん細胞株 LNCaP における ABHD2 の発現を siRNA により抑制すると細胞増殖能と浸潤能が低下すること、逆に過剰発現させるとそれらが増強することを確認した。またマウス皮下に移植した LNCaP 細胞由来の腫瘍の増殖が、ABHD2 の siRNA 投与により有意に抑制された。ヒトの前立腺がん組織においては、ABHD2 の発現は、悪性度の指標となるグリアソンスコアの値と正の相関を示し、またリンパ節転移のあるものほど ABHD2 の発現が高かった。また、前立腺がん組織における ABHD2 の発現が高いほど、無病生存率は有意な低下を示し、さらにドセタキセル投与後の PSA 再発までの期間も ABHD2 が高発現なほど短かった(図1)。

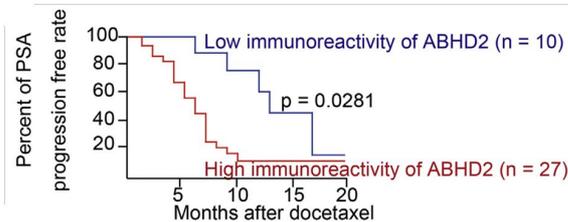


図1 ヒト前立腺がん組織におけるABHD2の発現量とドセタキセル投与後のPSA再発までの期間

(2) G3BP2

前立腺がん細胞株 LNCaP および VCaP における G3BP2 の発現を siRNA により抑制すると生存率が低下すること、逆に過剰発現させると生存率が上昇することを確認した。この生存率の変化は細胞周期の阻害/活性化によるものであり、さらに G3BP2 の過剰発現によりドセタキセルによるアポトーシスの誘導が抑制されることも確認した。マウス皮下に移植した前立腺がん細胞由来の腫瘍の増殖も、G3BP2 の siRNA 投与により有意に抑制された。更に詳細な解析により、G3BP2 はアンドロゲン刺激により SUMO-E3 ligase である RanBP2 を活性化させ、p53 の SUMO 化を引き起こすこと、これにより p53 が核外に移行し、細胞の生存率が上昇することを証明した。ヒト前立腺がんにおいても、組織における G3BP2 の発現が高いほど、術後の生存期間が短かった (図 2A)。また、p53 が核外で染まるケースでも、術後の生存期間の低下が観察された (図 2B)。加えて、CRPC の組織においては G3BP2 の発現上昇と核外での p53 の染色が、通常の前立腺がんと比較して高頻度に観察された (図 2C)。

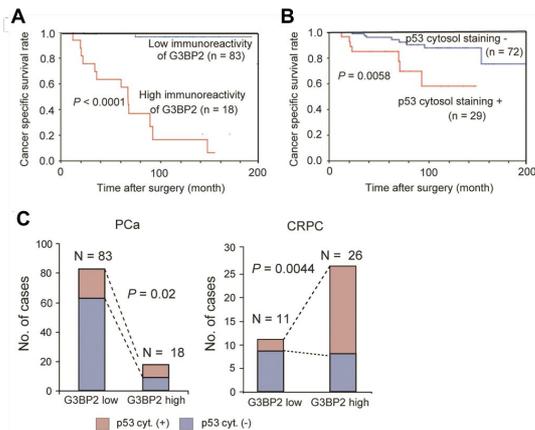


図2ヒト前立腺がん組織におけるG3BP2の発現

(3) OCT1

アンドロゲン応答遺伝子である ACSL3 の発現は AR および転写協調因子 OCT1 により制御されていることを確認した。前立腺がん細胞株 LNCaP における ACSL3 の発現を低下させると細胞の浸潤能が低下し、マウス皮下に移植した細胞の増殖も ACSL3 の発現抑制により阻害された。そこで ACSL3 上流の OCT1 結合サイトをブロックする PIP を合成し、細胞に投与したところ、ACSL3 の発現が低下し、細胞浸潤能も阻害された。マウス皮下腫瘍モデルに

おいても抗腫瘍効果が確認できた (図 3)。

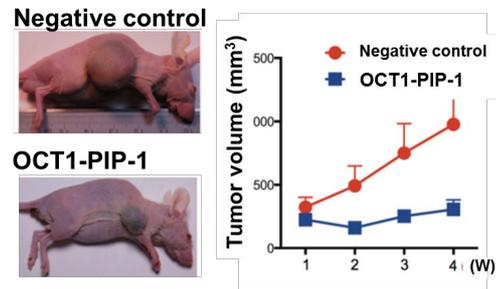


図3 マウス皮下移植ヒト前立腺がん腫瘍の増殖に対するOCT1-PIP-1の効果

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)

Ashikari D, Takayama KI, Obinata D, Takahashi S, Inoue S. CLDN8, an androgen-regulated gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Cancer Science*, 査読有, 7 巻, 2017, 1386-1393
DOI: 10.1111/cas.13269

Ashikari D, Takayama K, Tanaka T, Suzuki Y, Obinata D, Fujimura T, Urano T, Takahashi S, Inoue S. Androgen induces G3BP2 and SUMO-mediated p53 nuclear export in prostate cancer. *Oncogene*, 査読有, 45 巻, 2017, 6272-6281
DOI: 10.1038/onc.2017.225

Obinata D, Takayama K, Fujiwara K, Suzuki T, Tsutsumi S, Fukuda N, Nagase H, Fujimura T, Urano T, Homma Y, Aburatani H, Takahashi S, Inoue S. Targeting Oct1 genomic function inhibits androgen receptor signaling and castration-resistant prostate cancer growth. *Oncogene*, 査読有, 35 巻, 2016, 6350-6358
DOI: 10.1038/onc.2016.171

Obinata D, Takada S, Takayama K, Urano T, Ito A, Ashikari D, Fujiwara K, Yamada Y, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda, K, Horie-Inoue K, Homma Y, Takahashi S, Inoue S. Abhydrolase domain containing 2, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Eur J Cancer*, 査読有, 57 巻, 2016, 39-49,
DOI: 10.1016/j.ejca.2016.01.002. 2016

〔学会発表〕(計4件)

高田将吾, 芦苺大作, 大日方大亮, 高山賢一, 浦野友彦, 井上 聡, 高橋 悟. 前立腺癌の進行に關与する新規アンドロゲン応答遺伝子 ABHD2 の機能解析. 第25回泌尿器科分子・細胞研究会, 2016年

芦苺大作. 前立腺癌の進展に關与する新規AR応答遺伝子の同定及び機能解析. 第3回Urological Expert Camp, 2016年

芦苺大作. ゲノムワイドなARシグナル解析により同定された新規アンドロゲン応答遺伝子. 第2回Urological Expert Camp, 2015年

高田 将吾, 大日方大亮, 芦苺大作, 高山賢一, 浦野友彦, 井上聡, 高橋 悟. 新規アンドロゲン応答遺伝子 ABHD2 の同定及び機能解析. 第103回日本泌尿器科学会総会, 2015年

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 前立腺癌の判定、治療選択方法、予防又は治療剤
発明者: 大日方大亮, 高橋悟, 井上聡, 高山賢一
権利者: 日本大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2015/072494
出願年月日: 2015年8月7日
国内外の別: 国外

取得状況(計2件)

名称: 新規PIポリアミド
発明者: 大日方大亮, 高橋悟, 福田昇, 藤原恭子
権利者: 日本大学
種類: 特許
番号: 6044923
取得年月日: 2016年11月25日
国内外の別: 国内

名称: 新規PIポリアミド
発明者: 大日方大亮, 高橋悟, 福田昇, 藤原恭子
権利者: 日本大学
種類: 特許
番号: 6044935, US9522978 B2
取得年月日: 2016年11月25日(国内), 2016年12月20日(米国)
国内外の別: 国内および国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 悟 (TAKAHASHI, Satoru)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 50197141

(2) 研究分担者

山口 健哉 (YAMAGUCHI, Kenya)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 00297813

浦野 友彦 (URANO, Tomohiko)
国際医療福祉大学・国際医療福祉大学病院・教授
研究者番号: 20334386

福田 昇 (FUKUDA, Noboru)
日本大学・総合科学研究所・教授
研究者番号: 40267050

藤原 恭子 (FUJIWARA, Kyoko)
日本大学・医学部・助教
研究者番号: 40595708

芦苺 大作 (ASHIKARI, Daisaku)
日本大学・医学部・専修医
研究者番号: 70748053

(3) 連携研究者

井上 聡 (INOUE, Satoshi)
東京都健康長寿医療センター・研究所・研究部長
研究者番号: 40251251

高山 賢一 (TAKAYAMA, Kenichi)
東京都健康長寿医療センター・研究所・研究員
研究者番号: 50508075