

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592037

研究課題名（和文） 前立腺癌の増殖に関与するアンドロゲン応答性遺伝の同定と増殖関連腫瘍マーカーの開発

研究課題名（英文） Identification of androgen-response genes related with the proliferation and development of proliferation-related marker in prostate cancer

研究代表者

溝上 敦 (ATSUSHI MIZOKAMI)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：50248580

研究成果の概要（和文）：我々は、前立腺癌の増殖に影響を与えている遺伝子の中で、アンドロゲン受容体の感受性にも影響を与える遺伝子の同定を試みた。前立腺針生検で得られた数名ずつの前立腺癌組織と正常組織を用いた cDNA microarray による遺伝子発現プロファイルを比較し、それらの遺伝子の中で癌患者において約 6 倍発現の亢進している CAMKK2 に焦点を当てた。CAMKK2 はアンドロゲン感受性前立腺癌細胞株 LNCaP において、DHT により発現が誘導された。前立腺組織の免疫組織染色および in vitro における研究により、CAMKK2 は癌抑制遺伝子として機能していた。

研究成果の概要（英文）：We tried identification to affect the androgen receptor sensitivity in the gene which affected the proliferation of the prostate cancer. We compared a gene expression profile by cDNA microarray which we used a normal tissue for with the prostate cancer tissue by several obtained by prostatic needle biopsy. Then we focused on CAMKK2 which the approximately 6 times expression enhanced in patients with cancer in those genes. As for CAMKK2, expression was induced in androgen-sensitive prostate cancer cell line LNCaP by DHT. In immunohistochemical staining of the prostatic tissue and in vitro study, CAMKK2 functioned as antioncogene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：腫瘍学

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：前立腺癌、アンドロゲン、アンドロゲン感受性、CAMKK2

1. 研究開始当初の背景

進行前立腺癌の治療は androgen | deprivation therapy (ADT) が主流で、約

90%の症例でその効果をあげている。しかし、やがてアンドロゲン非依存癌へと進行する。この前立腺癌の再燃の機序は徐々に明らかになりつつあるものの、まだ十分解決されておらず、再燃癌に対する決め手となる有効な治療法はまだない。この再燃の機序においてARの発現の亢進、アンドロゲン感受性の亢進が認められ、ARおよびアンドロゲンがkey playerであることに間違いはない。アンドロゲン-ARのシグナルがどのような標的遺伝子に作用して増殖に関与していくのかを明らかにすることは、今後前立腺癌の治療戦略を立てるのに非常に重要と考える。これまでに我々は、ARに対する抗体の作成、ARプロモータの解析、AR非翻訳領域での翻訳調節機構、アンドロゲン感受性亢進の機序、副腎性アンドロゲンの再燃への関与の可能性など、アンドロゲン、ARの研究を精力的に行ってきた。

2. 研究の目的

アンドロゲンは癌細胞内のアンドロゲン受容体(AR)に結合した後に標的遺伝子に作用し、様々な細胞の変化を起こすが、ある標的遺伝子はARにより活性化され、またある標的遺伝子はその発現が抑制されることで、癌細胞が増殖していくと考えられる。増殖に関与するアンドロゲン応答性の標的遺伝子を同定し、その機能を解析することによって、ARのシグナルがどのように増殖へ関与していくかが明らかとなり、ひいては前立腺癌のアンドロゲン非依存性への機序や再燃癌の治療戦略を考える上での基盤を構築することを目的とした。そこで我々は、LNCaPでGRを持続的に強制発現する細胞株LNCaP/GR2を樹立した。LNCaP/GR2はDHTで増殖が促進されるが、デキサメサゾン(Dex)では促進されない。このLNCaP/GR2をDHTあるいはDexで刺激し、発現パターンの異なる遺伝子をcDNA microarrayを用いて同定することによって、数多くあるアンドロゲンで発現の変化する遺伝子から、Dexでは反応せず、増殖に関与する遺伝子を絞り込むことができるはずである。これらに遺伝子の中から増殖に関与す

る可能性のある遺伝子を同定し、それらの遺伝子がどのように増殖に影響を及ぼすのか、またARとGRの認識配列がどのように異なるのか、ARのシグナルが直接作用するのか、間接的に作用するのかを明らかにしていく。

3. 研究の方法

①LNCaPにGR発現ベクターを導入し、G418存在下で培養することにより、GR安定発現細胞株LNCaP/GR2を樹立した。このLNCaP/GR2はDHTで増殖は促進されるが、Dexでは促進されない。しかし、PSAなどのアンドロゲン応答遺伝子の多くは、前述のごとくARとGRのDNA結合配列が基本的には同一なので、DHTでもDexでも同様に誘導・抑制がかかると考えられる。従って、DHTとDexでLNCaP/GR2を刺激後、RNAを抽出し、cDNA microarray法(アジレント社約40,000の遺伝子をスクリーニング)を行うことによりDHTとDexで発現の差のある遺伝子を同定することができれば、その遺伝子が、増殖と平行して変化する遺伝子の可能性が高くなる。これらの遺伝子の機能、組織発現の状況、発現調節のメカニズムを明らかにする。

②正常前立腺組織と前立腺癌組織から得られたRNAからcDNA microarrayを行うことにより、発現レベルの異なる遺伝子を同定しつつある。その中で活性酸素に関与する様々な遺伝子のうち、ある遺伝子の発現が正常と癌で大きく発現が異なることを既に確認している。この遺伝子から合成されたタンパク質の発現のレベルをこれまでに保存されてきた患者前立腺癌組織の中で免疫組織染色にて調べることにより、発癌・増殖・悪性度との関係を検討する。

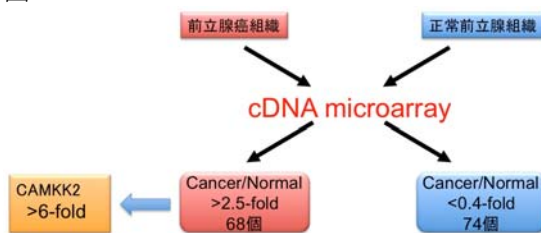
4. 研究成果

①GR安定発現細胞株LNCaP/GR2をしようし、DHTとDexにより発現誘導の異なる遺伝子を同定した。24時間でDHT4倍以上DEX1.41倍以下の発現誘導される遺伝子が、47種類、DHT-3倍以下DEX-1.5以上誘導される遺伝子が34種類同定された。これらの遺

伝子のうち、比較的発現量の多い遺伝子に注目してそれらの遺伝子の発現を亢進させたり、ノックダウンさせたりして機能解析を行ったが、十分な結果が得られなかった。

②そこで、正常前立腺組織と前立腺癌組織から得られたRNAからcDNA microarrayを行い、がん組織で発現が亢進した遺伝子、抑制された遺伝子を同定した(図1)。これらの遺伝子のうち前立腺癌組織で発現量が高い遺伝子 calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CAMKK2)に焦点を当てて、様々な解析を行った。

図 1



前立腺組織の Tissue microarray を用いた免疫組織染色では、癌組織に CAMKK2 は発現を強く認められたが、悪性度とは逆相関の関係にあった。また、CAMKK2 の発現の低い前立腺癌では、発現の高いものと比べ、ホルモン療法後早期に再燃していることが判明した。in vitro において、CAMKK2 はアンドロゲン感受性前立腺癌細胞株 LNCaP において、DHT により発現が誘導され、DHT 非存在下では発現が減弱した(図2)。LNCaP の CAMKK2 の発現を siRNA でノックダウンしたところ増殖が促進された。CAMKK2 抑制により、DHT に対する感受性は上昇した(図3)。次に、CAMKK2 強制発現 LNCaP に導入し、CAMKK 強制発現 LNCaP 株 (LNCaP/GFP-CAMKK2) を樹立した(図4)。LNCaP/GFP-CAMKK2 は非発現株 LNCaP/GFP と比較し、DHT に対する感受性は低下した(図5)。in vivo において、SCID mouse の皮下に LNCaP/GFP-CAMKK2 を移植したところ、去勢の有無に関わらず、LNCaP/GFP よりも腫瘍の増大が抑制された(図6)。さらに CAMKK2 の活性化はエネルギー代謝に関係のある AMPK の活性化を促進していた。AMPK の活性化は DHT の働きを減弱させた(図7)。

図 2

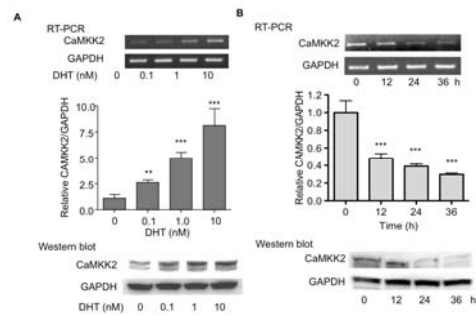


図 3

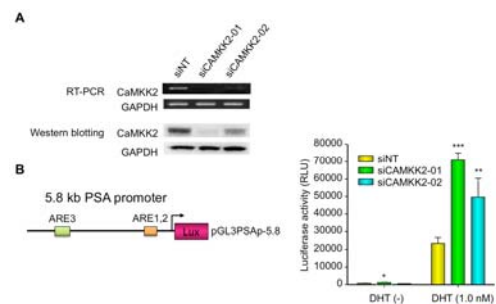


図 4

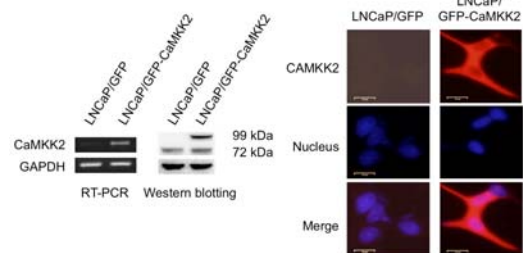


図 5

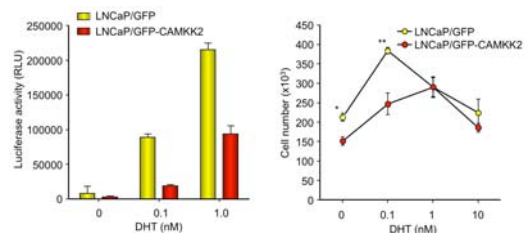


図 6

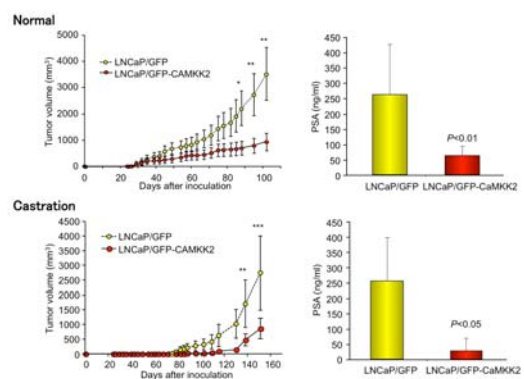
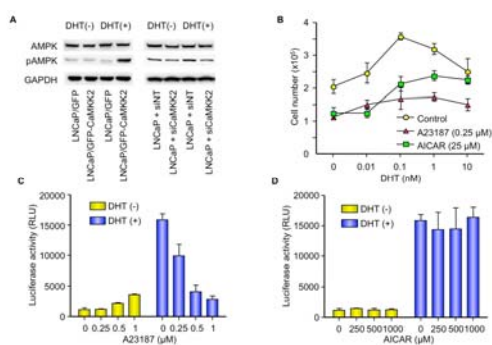


図 7



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 1 件)

- ① Takashi Shima, Atsushi Mizokami, Toru Miyagi, Keiichi Kawai, Kouji Izumi, Misako Kumaki, Mitsuo Ofude, Jian Zhang, Evan T. Keller, and Mikio Namiki, Down-regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 by androgen deprivation induces castration-resistant prostate cancer. *The Prostate*, 2012, in press. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Takashi Shima, Atsushi Mizokami, Toru Miyagi, Keiichi Kawai, Kouji Izumi, Misako Kumaki, Zhang Jian, Evan T. Keller, and Mikio Namiki. Down-regulation of CAMKK2 by androgen deprivation induces castration-resistant prostate cancer. AACR Annual Meeting 2012, 4.1, McCormick Place in Chicago (USA)
- ② 溝上 敦、島 崇、熊木 美紗子、並木 幹夫 Gene-S の発現抑制は前立腺癌細胞の増殖を促進し、アンドロゲン高感受性を誘導する. 第 19 回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 福岡大学病院 2011, 11. 26, 福岡県

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 前立腺癌治療組成物及び前立腺癌治療組成物の有効成分のスクリーニング方法

発明者: 溝上 敦、並木 幹夫

権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-183183

出願年月日: 2011. 8. 25

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝上 敦 (MIZOKAMI ATSUSHI)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号: 50248580

(2) 研究分担者

三輪 聡太郎 (MIWA SOTAROU)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号: 80507070

宮城 徹 (MIYAGI TORU)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号: 60467107