

機関番号：24403

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21780132

研究課題名（和文）前立腺がん進行機序の解明と食品成分による抑制作用の解析

研究課題名（英文）Inhibitory mechanisms of food factors on the progression of prostate cancer

研究代表者

原田 直樹 (HARADA NAOKI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：00529141

研究成果の概要（和文）：ホルモン療法後、前立腺がんが再発する機構について検討した結果、ホルモン療法に類似した状態では、アンドロゲン受容体（AR）がプロセッシングされ、C末端領域を欠く短鎖型 AR が産生されることを見出した。この短鎖型 AR は、リガンド非依存的な転写活性を持つことが予想された。また、レスベラトロールの AR 機能抑制には AR の DNA 結合を抑制することと AR のアセチル化を減少させることが重要であった。さらに、レスベラトロールは短鎖型 AR の機能も抑制することが推察された。

研究成果の概要（英文）： We studied on the molecular mechanisms underlying the development of hormone therapy-resistant prostate cancer. The C-terminal truncated form of androgen receptor (AR) was produced when prostate cancer cells were incubated in the absence of ligand or in the presence of androgen antagonist. It was expected that the short form of AR acts as transcription factor in a ligand-independent manner. Resveratrol inhibited DNA binding of AR, presumably by decreasing its level of acetylation. In addition, it was speculated that resveratrol inhibits the transcriptional activity of the short form of AR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	2, 000, 000	600, 000	2, 600, 000
22 年度	1, 500, 000	450, 000	1, 950, 000
年度			
年度			
年度			
総計	3, 500, 000	1, 050, 000	4, 550, 000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：機能性食品，レスベラトロール，アンドロゲン受容体，アセチル化，転写，ホルモン療法，前立腺がん

1. 研究開始当初の背景

前立腺がんは欧米男性において最も罹患率

が最いがんであり、男性におけるがん死亡者のおよそ 20% を占める。前立腺がんは、加齢と共に発生率が高くなることに加えて、食習

慣との関連が強く疑われる疾患である。実際に、高齢社会と食の欧米化が進むわが国で、男性のがん罹患率において最も増加している部位となっている。一方で、食との関係から、機能性食品による疾患の予防や、進行の遅延効果が大きい期待できる疾患であると言える。実際に、機能性食品因子が前立腺がんの発症や進行に効果を持つことが、近年徐々に明らかになってきているが、その作用機構に関しては不明な点が多く残っている。

男性特異的な生殖器官である前立腺は、男性ホルモンであるテストステロンやジヒドロテストステロン (DHT) の制御を受けて増殖・機能維持されるため、初期の前立腺がんの増殖も男性ホルモン依存的である。このため、初期前立腺がんの治療では、外科的な前立腺摘出に加えて、男性ホルモンの受容体であるアンドロゲン受容体 (AR) をターゲットとした内分泌療法が行われる。つまり、男性ホルモン産生器官である精巣を取り除く去勢や、男性ホルモンの分泌を促進する性腺刺激ホルモンの拮抗抑制剤 (LH-RH アナログ)、テストステロンや DHT に拮抗して AR に結合しアンタゴニストとして作用する抗アンドロゲン剤の投与が一般的に行われる。ホルモン療法により一時的にがんは小康状態に達するものの、長期間にわたるホルモン療法により 5 年生存率が 20~30% と予後不良な再発がんの発生を招く。前立腺がんの再発は、血中の前立腺特異抗原 (PSA) 濃度の上昇により規定される。PSA は転写因子として機能する AR の標的遺伝子であることから、ホルモン療法によって抑制された AR 機能が再燃することが再発がんに繋がると考えられているが、この前立腺がんの再発する機構は未だよく分かっていない。

2. 研究の目的

本研究は、前立腺がんの進行を抑制することを目的として AR に着目し、(1) 初期前立腺がんの治療として行われるホルモン療法後、前立腺がんが再発する機序の一端を解明すること、(2) AR 機能に及ぼす機能性食品因子 (特にレスベラトロール) の作用機構について解析した。

3. 研究の方法

ヒト前立腺がん細胞株 (LNCaP、PC-3) を用いて、AR の形態や局在、機能に関して生化学的手法 (Western blotting、免疫染色、免疫沈降、クロマチン免疫沈降、ルシフェラーゼレポーターアッセイ、RT-PCR) により解析を行った。

4. 研究成果

(1) 前立腺がん進行機序の解明

LNCaP 細胞をステロイド物質を除いた培地で培養すると、プロテアソーム阻害剤である MG132 や PS341 に依存して、野生型 AR (115 kDa) に加えて~90 kDa の AR 抗体に反応するタンパク質が蓄積することが判明した。この~90 kDa タンパク質は siRNA や外来遺伝子の導入、さらにエピトープの異なる抗体を用いた検討により、C 末端の一部を欠く短鎖型 AR であることが判明した。短鎖型 AR は、アゴニストであるテストステロンや DHT 存在下には産生されず、男性ホルモン非存在下、さらにピカルタミド、ヒドロキシフルタミド、酢酸シプロテロンといったアンドロゲンアンタゴニスト存在下でのみ産生された。これは、短鎖型 AR はホルモン療法に類似した環境で特異的に産生されるということを示唆する。セリンプロテアーゼによって短鎖型 AR の蓄積が抑制されたことから、短鎖型 AR はセリンプロテアーゼによるプロセッシングにより産生されることが示唆された。

野生型 AR は、C 末端に Helix 1 から 12 までで構成されるリガンド結合ドメインを持つが、短鎖型 AR はこの Helix 1 周辺 (アミノ酸領域 660~685 までの間) で切断されたリガンド結合ドメインの大部分を欠く AR であった。これまでの報告と照らし合わせると、短鎖型 AR は核移行シグナル、DNA 結合ドメイン、N 末端ドメインに存在する転写活性化領域 (AF-1) を持つことで、恒常的に核内に存在し、リガンド非依存的な転写因子として機能することが強く示唆された。また、AR は、リガンドの結合により、Helix 1 付近の構造を顕著に変化させることが示唆された。

本研究によって、ホルモン療法時に産生された短鎖型 AR が蓄積することで AR 機能の再燃を生じさせ、前立腺がんの再発に関与する機構が考えられた。

(2) AR 機能に及ぼす機能性食品因子の影響
これまでに、我々はブドウの果皮に含まれるポリフェノールであるレスベラトロールが AR の転写活性化を抑制することを見出している (Harada *et al.* *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 53, 2007, 556-560)。本研究では、その詳細な AR 機能抑制機構に関して検討を行った。これまで、レスベラトロールによる AR の転写抑制作用は、AR プロモーター活性の抑制と AR タンパク質の半減期の短縮による作用であると考えられていた。しかし、AR 機能を抑制するレスベラトロールの有効濃度から、タンパク質減少作用以外の機構が存在することが考えられた。DHT が結合した AR は細胞質から核内へと移行して転写因子として機能するが、レスベラトロールは、AR の核移行には影響を与えなかった。しかし、レスベラトロールは核内 AR 量を変化させない状態で PSA プロモーターに結合する AR 量を減少させることを見出した。AR の翻訳後修飾に着目して検討を行った結果、レスベラトロールは AR のアセチル化を減少させることが判明した。アセチル化修飾を受けない変異体 AR (K630T) においては、レスベラトロールによる転写活性抑制作用が野生型 AR に比べて有意に低かったことから、レスベラトロールは、AR のアセチル化レベルを減少させることで AR の DNA 結合を抑制することが示唆された。さらに、DNA に結合できない AR は、核内に蓄積せず細胞質に移行することが判明した。

(3) 前立腺がん進行と食品因子の作用

(1) により見出した前立腺がん進行に関わると推測される短鎖型 AR と構造的に類似した ARΔC-Nuc (AR の 1-660 アミノ酸からなる C 末端欠損変異体 AR) に及ぼすレスベラトロールの作用に関して検討した。アンドロゲンアンタゴニストであるビカルタミドはリガンド結合ドメインを欠く ARΔC-Nuc の転写活性に影響を及ぼさなかったが、レスベラトロールは野生型 AR の転写活性と同程度 ARΔC-Nuc の転写活性を抑制し、さらに、ARΔC-Nuc の核内蓄積の抑制も観察された。これらの結果から、レスベラトロールは前立腺がんの再発に対して有効な食品因子であると考えられた。

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 2 件)

- ① Naoki Harada, Kiyotaka Atarashi, Yohei Murata, Ryoichi Yamaji, Yoshihisa Nakano, and Hiroshi Inui. "Inhibitory mechanisms of the transcriptional activity of androgen receptor by resveratrol: implication of DNA-binding and acetylation of the receptor" *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 査読有 123(1-2), 2011, 65-70.
- ② Naoki Harada, Takakazu Mitani, Yasuki Higashimura, Ryoichi Yamaji, Kazuki Okamoto, Yoshihisa Nakano, and Hiroshi Inui. "Involvement of three glutamine tracts in human androgen receptor transactivation" *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 査読有 118 (1-2), 2010, 77-84.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 原田 直樹ら “アンドロゲンシグナルに及ぼすレスベラトロールの作用”, 第 63 回 日本栄養・食糧学会大会, 2009 年 5 月 20~22 日, 長崎 (ブリックホール).
- ② Naoki Harada et al. “Resveratrol inhibits nuclear accumulation of androgen receptor”, 19th International Congress of Nutrition, 2009 年 10 月 4~9 日, Bangkok (BITEC).
- ③ 原田 直樹ら “ヒトアンドロゲン受容体の転写を調節する 3 つのグルタミン領域について”, 第 82 回 日本生化学会, 2009 年 10 月 21~24 日, 神戸 (神戸国際会議場).
- ④ 新 清孝ら “レスベラトロールによる核内 AR の減少について”, 第 48 回 日本栄養・食糧学会近畿支部大会, 2009 年 11 月 8 日, 京都 (京都女子大学).
- ⑤ 原田 直樹ら “レスベラトロールはアン

ドロゲン受容体のアセチル化を減少させる”，2010 年度 日本農芸化学会大会，2010 年 3 月 27～30 日，東京（東京大学）。

- ⑥ 原田 直樹ら “アンドロゲン受容体のアセチル化修飾を介したレスベラトロールの作用”，第 64 回 日本栄養・食糧学会大会，2010 年 5 月 21～23 日，徳島（アスティ徳島）。
- ⑦ 井上 薫ら “前立腺がんにおける短鎖型アンドロゲン受容体の役割”，2010 年度 日本農芸化学会関西支部大会，2010 年 10 月 2～3 日，奈良（近畿大学）。
- ⑧ Kaoru Inoue *et al.* “Production of the short form of androgen receptor in prostate cancer cells”，第 33 回 日本分子生物学会年会 第 83 回 日本生化学会大会 合同大会，2010 年 12 月 7～10 日，神戸（国際会議場）。
- ⑨ 原田 直樹ら “短鎖型アンドロゲン受容体の産生と機能について”，2011 年度 日本農芸化学会大会，2011 年 3 月 25～28 日，京都（京都女子大学）。

[その他]

ホームページ等

<http://www.biochem.osakafu-u.ac.jp/NC/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 直樹 (HARADA NAOKI)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：00529141

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：