

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 3 月 31 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 年度～ 2011 年度

課題番号：21791493

研究課題名（和文）転写因子 ATBF1 の前立腺癌細胞内局在の分子機構の解明と前立腺癌予後診断への応用

研究課題名（英文）The association of intracellular localization and expression of ATBF1 with the malignant potential of prostate cancer

研究代表者 原 昇（HARA NOBORU）

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：50397113

研究成果の概要（和文）：アンドロゲン依存性が高い前立腺癌ではアンドロゲン依存性のカリクレインなどの分子の発現とともに細胞増殖や細胞周期もアンドロゲン依存性である可能性が示唆された。一方、アンドロゲン依存性が低い前立腺癌細胞ではアンドロゲン依存性の分子の発現は特定のアンドロゲン濃度で発現が高くなり、細胞増殖／細胞周期はアンドロゲンの影響を受けにくいことが示された。ATBF1 の細胞質移行／消失は前立腺癌の悪性度の上昇に関わることが示唆された。アンドロゲン除去療法への反応性を示す細胞周期関連分子の制御に ATBF1 が関わることを示唆された。

研究成果の概要（英文）：Loss of ATBF1 was associated with the high malignant potential in prostate cancer. Processing of ATBF1 may be involved in the alteration of cell cycle markers, which are indices for susceptibility to androgen deprivation. In androgen receptor-active prostate cancer cells, transcription levels of androgen-responsive KLKs were upregulated by adrenal androgens in a concentration-dependent manner. The present study verified that androgen synthesis mediated by the pituitary-adrenal axis is a potential target for advanced ADT.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌；ATBF1；予後診断；内分泌療法；分子機構

1. 研究開始当初の背景

限局性前立腺癌患者の治療結果をより正確

に予測できる因子の発見と診断法の開発が望まれている。進行性前立腺癌においても予後因子の検索は重要課題である。転写因子 ATBF1 は神経の増殖と分化を制御する重要な分子であることがわかってきている。前立腺癌のアンドロゲン除去療法不応性に神経内分泌分化が大きく関ることから、ATBF1 は前立腺癌細胞の増殖性と分化程度の指標となる可能性が示唆される。

2. 研究の目的

我々の予備実験では、ATBF1 の局在がホルモン環境により異なり、p21 や p27 といった細胞周期に関する分子の制御に重要な役割を果たす可能性が示されている。本研究の目的は、① ATBF1 の前立腺癌細胞内局在の分子機構を明らかにする、② 前立腺癌予後診断への応用へ向けて疫学調査を行う、の2点である。

3. 研究の方法

1) 前立腺癌症例の臨床病理学的検討、対象症例の抽出：新潟大学医歯学総合病院泌尿器科にて1995年4月から2004年3月の10年間で、前立腺全摘除術を行った前立腺癌患者 97+ α 例の病理組織像および臨床経過を検討する。

(2) ATBF1 免疫染色のための抗原賦活法の検討、選択：独自に開発したポリクロナール抗 ATBF1 抗体、D1-120 を使用する。まず抗原賦活方法を検討はすでに終了している。前立腺全摘除標本を使用。型通りパラフィン切片を作成、DAKO Envision を使用した免疫染色を行う。

(3) 3種類の前立腺癌培養細胞の基本となる増殖能を検索 (LNCaP, PC3, DU145) : 分子レベル基礎研究として、アンドロゲンレセプターの point mutation がすでに明確にされているヒト前立腺癌由来培養細胞 LNCaP、およびアンドロゲンレセプターが欠落している PC3 と DU145 の増殖能の差に基づき、

アンドロゲン応答性がやや低い 22RV1 及び VCaP を用いて、アンドロゲン依存性分子である hk12, hk13, hk14, hk115 につき、様々な性ホルモン環境の培地を用いて同様の検討を行う。

(4) 前立腺癌培養細胞における ATBF1 およびその上流下流の細胞周期制御分子の mRNA 定量解析：様々な性ホルモン環境の培地 (通常濃度アンドロゲン～アンドロゲン非含有培地) 内での前立腺癌培養細胞 (22RV1, VCaP) より total RNA を抽出、定量的 PCR (Real-Time PCR) にて ATBF1, ATM, p21, p27, p53, mdm2, p14/arf, p16 を含む 54 分子の mRNA の定量を行う。

4. 研究成果

アンドロゲン環境を変えた培地における前立腺細胞のアンドロゲン応答遺伝子：klk-3/PSA 及び klk-2, klk-4, klk-15 の産生は何れの細胞においても DHEA-S 依存性、DHT と testosterone に関しては LNCaP では濃度依存性であった。これらの結果からアンドロゲン環境の変化による各細胞株の増殖変化と PSA に代表されるカリクレインの産生変化が明らかとなった。また患者血清を用いた検討でも血清 klk-3/PSA 値は ACTH-DHEA 依存性であった。アンドロゲン環境の変化と前立腺癌細胞株の細胞周期関連マーカー：Real-time PCR を用いた検討では LNCaP では何れのアンドロゲンも 10^{-9} mol/l 以下とした際に細胞周期 G2 停止を示唆する CyclinD1 の発現増加を認め、p21/p53 経路の活性化と p27 の発現増加が認められたが、ATBF1 に関しては有意な発現の増加は認めなかった。Cell block の免疫組織化学を用いた検討で、22RV1 と VCaP では LNCaP に比し、通常のアンドロゲン環境下で ATBF1 の核内発現が減少していることが示された。ここまでの研究より、ア

アンドロゲン依存性が高い前立腺癌ではアンドロゲン依存性のカリクレインなどの分子の発現とともに細胞増殖や細胞周期もアンドロゲン依存性である可能性が示唆された。一方、アンドロゲン依存性が低い前立腺癌細胞ではアンドロゲン依存性の分子の発現は特定のアンドロゲン濃度で発現が高くなり、細胞増殖／細胞周期はアンドロゲンの影響を受けにくいことが示された。

ATBF1 の細胞質内発現と悪性度に関する患者検体を用いた検討は解析段階である。予備解析の結果を以下に示した。前立腺癌細胞株 LNCaP を通常条件またはアンドロゲン除去培地にて培養を行い、ATBF1 および関連分子の転写を Real-time PCR にて、それらの発現を免疫組織化学にて評価した。前立腺全摘除標本を用いた免疫組織化学的検討では、Gleason score 6 以下の 18 腫瘍中 13 腫瘍 (72.2%) で ATBF1 は核内に発現していたのに対し、Gleason score 7 以上では ATBF1 の核内発現は 20 腫瘍中 4 腫瘍 (20.0%) にとどまった ($p=0.004$)。ATBF1 の細胞質移行／消失を認めた 16 症例では核内発現のみを認めた 14 症例に比し、初診時 PSA がより高い傾向 ($p=0.085$) を認め、PSA 非再発率がより高い傾向 (\log -rank $p=0.090$) を認めた。また、ATBF1 の細胞質移行／消失症例では核内発現症例に比し、全摘標本における神経周囲浸潤をより多く認めた (71.4% vs 29.4%, $p=0.024$)。Real-time PCR による LNCaP における検討では、ATBF1 の転写は通常培養とアンドロゲン除去環境培養下で差異を認めなかった。LNCaP のセルブロックにおける免疫組織化学的検討では通常培養細胞に比しアンドロゲン除去環境培養した LNCaP において ATBF1、p53 および ATM の発現の減弱を認めた。Cyclin D1 は通常培養細胞では核染色性を示したが、アンドロゲン除去環境培養細胞では細胞質

への移行を認めた。ATBF1 の細胞質移行／消失は前立腺癌の悪性度の上昇に関わることが示唆された。今回の検討結果からは ATBF1 の発現状態と去勢抵抗性との関連は不明であるが、アンドロゲン除去療法への反応性を示す細胞周期関連分子の制御に ATBF1 が関与することが示唆された。

アンドロゲン除去による内分泌環境変化に関する関連論文も以下にあるように多く発表されている。

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 13 件)

1. Hara N. Prostate carcinogenesis with diabetes and androgen deprivation therapy-related diabetes: An update. *Experimental Diabetes Research*. 2012 (in press)
2. Ishizaki F, Hara N, Takizawa I, Nishiyama T, Isahaya E, Kawasaki T, Takahashi K. Deficiency in androgens and upregulation of insulin-like growth factor-1 are involved in high bone turnover in men receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Growth Hormone & IGF Research*. 2012 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ghir.2012.04.003>)
3. Ishizaki F, Hara N, et al. Prediction of pathological and oncological outcomes based on extended prostate biopsy results in patients with prostate cancer receiving radical prostatectomy: A single institution study. *Diagnostic Pathology* 2012 (<http://www.diagnosticpathology.diagnomx.eu/vs/8790262771042628>)
4. Hara N, Takizawa I, Isahaya E, Nishiyama T, Hoshii T, Ishizaki F, Takahashi K. Insulin-like growth factor-1 is associated with regulation of the luteinizing hormone

production in men receiving androgen deprivation therapy with gonadotropin-releasing hormone analogues for localized prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars & Original investigations*. 2012 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2010.11.001>)

5. Komatsu S, Hara N, Ishizaki F, Nishiyama T, Takizawa I, Isahaya E, Kawasaki T, Takahashi K. Altered association of interleukin-6 with sex steroids in lipid metabolism disorder in men with prostate cancer receiving androgen deprivation therapy. *The Prostate*. 2011(doi: 10.1002/pros.22471.)

6. Ishizaki F, Hoque MA, Nishiyama T, Kawasaki T, Kasahara T, Hara N, Takizawa I, Saito T, Kitamura Y, Akazawa K, Takahashi K. External validation of the UCSF-CAPRA (University of California, San Francisco, Cancer of the Prostate Risk Assessment) in Japanese patients receiving radical prostatectomy. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2011;41(11): 1259-64

7. Takizawa I, Hara N, Nishiyama T, Isahaya E, Hoshii T, Takahashi K. Adrenocorticotrophic hormone is involved in regulation of androgen synthesis in men receiving androgen deprivation therapy for localized prostate cancer. *The Journal of Urology*. 2010;184(5):1971-6.

8. Takizawa I, Nishiyama T, Hara N, Hoshii T, Ishizaki F, Miyashiro Y, Takahashi K. Trilostane, an inhibitor of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, has an agonistic activity on androgen receptor in human prostate cancer cells. *Cancer Letter*. 2010;297(2):226-30.

9. Nishiyama T, Hara N, Isahaya E, Hoshii T, Takahashi K. Serum prostate-specific antigen levels reflect the androgen milieu in patients with localized prostate cancer receiving androgen deprivation therapy: Tumor malignant potential and androgen milieu. *Takizawa I, The Prostate*. 2010;70(13):1395-401.

10. Takeda K, Hara N, Kawaguchi M, Nishiyama T, Takahashi K. Parathyroid hormone-related peptide-producing non-familial pheochromocytoma in a child. *International Journal of Urology*. 2010;17(7):673-6.

11. Hara N, Nishiyama T, Takizawa I, Saito T, Kitamura Y, Takahashi K. Decline of the red blood cell count in patients receiving androgen deprivation therapy for localized prostate cancer: impact of ADT on insulin-like growth factor-1 and erythropoiesis. *Urology*. 2010;75(6):1441-5.

12. Hara N. RE: Decline of the red blood cell count in patients receiving androgen deprivation therapy for localized prostate cancer: impact of ADT on insulin-like growth factor-1 and erythropoiesis. 2010;76:1021

13. Isahaya E, Hara N, Nishiyama T, Hoshii T, Takizawa I, Takahashi K. Bone metabolic disorder in patients with prostate cancer receiving androgen deprivation therapy (ADT): impact of ADT on the growth hormone/insulin-like growth factor-1/parathyroid hormone axis. *The Prostate*. 2010;70(2):155-61

[学会発表] (計 5 件)

1. 原 昇, アンドロゲン環境と血清 PSA 値及びグリーゾンスコアとの関連. 第 49 回日本癌治療学会学術集会 2011 年 10 月 27 日名古屋市

2. 原 昇, Associations Among Anabolic Endocrine Axes in Patients with Prostate Cancer Receiving Androgen Deprivation Therapy. 第 31 回国際泌尿器科学会 2011 年 10 月 18 日 ドイツ ベルリン

3. 原 昇, アンドロゲン除去療法による骨代謝障害: GH/IGF-1/PTH 内分泌軸への影響. 第 48 回日本癌治療学会 2010 年 10 月 28 日京都市

4. 原 昇, アンドロゲン除去療法による骨代謝障害: 成長ホルモン/インスリン様成長

因子1 (IGF-1) / 副甲状腺ホルモン内分泌軸への影響. 第98回日本泌尿器科学会総会
2010年4月27日 盛岡市

5. 原 昇, Functional inactivation of insulin-like growth factor-1 in the bone may be relevant to osteoporosis during androgen deprivation therapy. 第25回欧州泌尿器科学会 2010年4月19日 スペイン バルセロナ

[図書] (計0件)

[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◇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 原 昇 (HARA NOBORU)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：50397113

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：