

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870750

研究課題名(和文) 乳癌・前立腺癌の核内受容体ER・ARによるリガンド共有型の新規転写抑制機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of negative transcription mechanism via ER and AR activated by shared ligands in breast and prostate cancers.

研究代表者

諏佐 崇生 (SUSA, TAKAO)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：20445852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌は、男性ホルモンであるアンドロゲンにアンドロゲン受容体(AR)が応答して細胞増殖するホルモン応答性の癌であるが、本研究では前立腺癌由来の培養細胞であるLNCaP細胞を始めとした種々の細胞で、女性ホルモンであるエストロゲンがARを活性化することを見出した。前立腺癌ではしばしばARに変異が生じ、この変異がエストロゲンへの応答を引き起こすことが知られているが、本研究では変異型ではない野生型ARによるエストロゲンへの応答性を明らかにした。このことから、前立腺癌のARの活性化機構にはいまだ未知なるシグナル経路が存在すると期待され、今後の研究に興味を持たれる。

研究成果の概要(英文)：Most prostate cancers rely largely on the androgen-androgen receptor (AR) axis. In this study, we demonstrated the physiological signaling pathway between wild-type of AR and E2 in LNCaP cells, while the mutated AR (Thr-Ala877) expressed in the LNCaP cells has been reported to partially lose its ligand specificity and cross-react with several steroid hormones including E2. We speculate the existence of unknown regulatory mechanistic links between the AR signaling axis and E2 in LNCaP cells and other sex hormone-responsive cancer cells, and revealing these will be a novel finding. It is desirable to develop drugs targeting such cell-type-specific crosstalk between sex hormones with the ability to overcome anti-hormone resistance in certain types of prostate cancers.

研究分野：分子生物学

キーワード：前立腺癌 LNCaP エストロゲン アンドロゲン

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌、乳癌といった、性特異的な癌に共通する特徴として、以下の3点が挙げられる。

・性ステロイド(乳癌:エストロゲン、前立腺癌:アンドロゲン)依存性に増殖する。

・多臓器に転移を起こしやすい。

・高カルシウム血症を随伴し患者の Quality of Life (QOL) および予後を悪化させる。

申請者の所属研究室では、骨転移、および、高カルシウム血症を誘因する鍵となる副甲状腺関連蛋白 (PTHrP) の発現制御機構に着目した研究を行っている。PTHrP は癌患者の Quality of Life (QOL) の低下をもたらす主要な因子の1つであり、種々の悪性腫瘍の進行期においてのみ過剰産生され、「血流を介して高カルシウム血症を招く全身性の作用」と、骨転移における「骨融解悪循環形成という局所的な作用」の2つの作用がその機能の根幹を成す。しかし、このPTHrPの産生を抑制する試みは、癌の進行の前に挫折を重ねてきており、一部 TGF シグナル経路などの関与が示唆されているものの、PTHrPの発現制御機構の本態は全くわかっていない。

2. 研究の目的

近年、種々のステロイドホルモン(ビタミンD、アンドロゲン、エストロゲン、プロゲステロン、グルココルチコイド)によって、種々の細胞の PTHrP の発現が抑制的に制御されることが明らかとなってきた。当研究室でも、ステロイドホルモンとその受容体による PTHrP の発現制御機構を理解することを目的として、核内受容体の siRNA を併用した、ステロイドホルモンによる PTHrP の発現抑制機構の解析を行った [BBRC, 2011;407:472-78]。その結果、乳癌の MCF7 細胞では、多くのステロイドホルモンが共通して PTHrP を抑制することが確かめられた。一方、そのほとんどの抑制が各ステロイドホルモンに対応する受容体を介したリガンド依存的なものであったにもかかわらず、アンドロゲンの場合は、MCF7 細胞でも確かに発現している AR ではなく、ER を介した抑制機構であることが明らかとなり、また、前立腺癌細胞である LNCaP 細胞においては、上述の乳癌の場合とは鏡像関係的に、エストロゲンによる AR を介した抑制的な発現制御機構が確認された。

これまでに、依存性の転写活性化とその受容体による転写調節機構は、リガンド依存性の転写活性化が広く知られているが、リガンド依存性の転写抑制については未だ不明な

点が多い。その上、我々が見出したような、エストロゲンとアンドロゲンがお互いのレセプターを共用して転写抑制を行うという結果は、PTHrP 遺伝子ばかりでなく、ERの標的遺伝子である ERBB2、IGFBP5 の転写抑制系でも再現されたことから、新規の分子基盤としても期待している。そこで本研究では、PTHrP を1つの標的として未明なりガンド依存の転写抑制機構の分子基盤を解明したいと考えた。

そこで本研究では、以下の2点の研究のゴールを設定した。

(1) PTHrP 遺伝子の転写開始点上流領域に存在する NR 制御領域を明確に同定する

先行データとして、本研究室では既に、MCF7 乳癌細胞における PTHrP 遺伝子の転写抑制への関与が予想される NR 結合部位の候補領域を ChIP アッセイにより同定している。これらの配列は ER の half site を含む putative common response DNA 配列であり、既報の MCF7 細胞での E2 による ERBB2 遺伝子発現抑制に必要なエストロゲン応答配列 [Nature 2008; 456:663-6]にも類似していた。そこで本先行データを基に、プロモーターアッセイや、ゲルシフト・ChIP アッセイなどの手法により、乳・前立腺癌細胞でのリガンド依存的な NRs による、PTHrP の発現抑制の責任を担う制御領域を同定する。さらにその結果を踏まえ、ERBB2・IGFBP5 遺伝子におけるを同様な制御領域の同定へと研究を展開していく。

(2) 性ステロイド依存性の PTHrP・ERBB2・IGFBP5 の発現抑制機構の全貌を明らかにする

性ステロイド依存性の転写抑制に関与する因子については、ほとんどわかっていない。さらに、エストロゲンが AR を介して、また、アンドロゲンが ER を介して転写調節を行うという現象に至っては各リガンドが各受容体に直接働きかけているのかどうかも含めて全く不明である。最近になって、ER の発現がなく AR が発現している乳癌細胞株 MDA-MB453 においては、MCF7 細胞などの ER(+)細胞で E2-ER によって発現促進されている一連の ER 応答遺伝子群が、興味あることに、DHT-AR による発現調節を受け、その際 FoxA1 がそのクロストークに深く関与するという報告が出ている (EMBO J. 2011;30:3885-94, Cancer Cell 2011;20:119-131)。また LNCaP 細胞の AR はリガンド結合ドメインに変異が存在しホルモン応答性の厳格性が失われているとも報

告されている。申請者はこれらの知見も含めた上で包括的に制御機構の正体を解明したい。

3. 研究の方法

研究目的で記述した2点の研究のゴールを遂行するため、下記の2点に関する解析を行う。

(1) PTHrP・ERBB2・IGFBP5 遺伝子発現のステロイド依存的な抑制的制御機構の責任を担う制御領域の同定

実験手法としては、細胞培養を主な実験対象としてレポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、ChIP法を用いる。PTHrP 遺伝子近傍の配列を持つレポーターベクターを作製し、乳癌細胞の MCF7 と前立腺癌の LNCaP 細胞に遺伝子導入することでステロイド依存的な転写活性を測定し、その抑制的な制御の責任を担う領域をそれぞれの細胞ごとに同定する。

同定された領域に関してゲルシフトアッセイを行い、その制御機構が MCF7 細胞の場合には ER、LNCaP 細胞の場合には AR の直接的な DNA 結合によることを確認する。

同定した結合領域、制御領域を NRs の抗体を用いた ChIP 法により解析する。また、その結果によっては ChIP-on-chip 法や ChIP-sequence 法により、リガンド依存的な NRs の制御領域を網羅的に解析する。

新規な制御配列の候補が同定された場合は、上記の 1、2 の手法を用いて再検討も行う。

以上の実験を ERBB2・IGFBP5 遺伝子についても行い、抑制的制御機構を総括的に解析する。

(2) エストロゲン/アンドロゲンシグナル互換性がみられる遺伝子の網羅的解析

前立腺癌細胞株それぞれにエストロゲンとアンドロゲンを投与した上でマイクロアレイ解析を行い、PTHrP の発現変化のパターンと類似している遺伝子をピックアップする。その後、PTHrP・ERBB2・IGFBP5 と同様のアプローチで、エストロゲン/アンドロゲンシグナル互換的な転写調節機構を探ることで、普遍的な、あるいは逆に細胞特有のメカニズムを提唱したい。

4. 研究成果

乳癌培養細胞である MCF7 細胞を用いて、PTHrP 遺伝子発現のステロイド依存的な抑制

的制御機構の責任を担う制御領域の解析を行った結果、転写開始点上流-12kbp の領域に、エストロゲン依存的に ER が結合する候補領域を見出すことができた。この領域には ER コンセンサス配列が認められ、この領域を用いてルシフェラーゼアッセイで転写活性を測定したところ、エストロゲンに反応して転写活性が促進され、ER コンセンサス配列の変異でその反応が消失することが確かめられた。このことから、この領域に ER が結合し、転写活性に影響を及ぼし得ることが示されたが、人工的に加工したプロモーターを使用したことと、レポーターベクターでの一過性な遺伝子導入での解析であったために本来の転写制御機構を完全に再現することが出来ず、ER による転写抑制を再現できていないのかもしれない。本研究はここで一時中断しているが、今後、CRISPR/Cas9 などのゲノム編集技術を利用して、同定した領域が PTHrP のエストロゲンに反応した転写抑制に関わっているかを明らかにしていきたい。

一方、ヒト前立腺癌由来の株化細胞である LNCaP 細胞を用いて、エストロゲン/アンドロゲンシグナルの互換性の有無を調査したところ、本細胞ではエストロゲンがアンドロゲン受容体を介して PTHrP の転写抑制を含む、転写制御系を惹起することを突き止めた。LNCaP 細胞が発現する AR はリガンド結合領域に変異が生じており、アンドロゲン以外にエストロゲンやプロゲステロン、抗アンドロゲン剤などもリガンドとして結合して AR による転写活性を引き起こすことが知られていたが、本実験では野生型 AR を外来性に発現させる実験系により解析したところ、エストロゲンは野生型 AR の核内移行を引き起こし、転写制御することを明らかにした。このエストロゲン-AR 軸による転写制御は LNCaP 細胞だけでなく、同じく前立腺癌由来の Rv22 細胞や、乳癌由来の MCF7 細胞、MDA-MB-453 細胞でも観察されたことから、この新規シグナル経路が性ステロイド応答型の乳癌と前立腺癌に広く存在していることも考えられ、その分子機序の解明に興味を持たれる。

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 5 件)

1. Takao Susa, Reina Ikaga, Takashi Kajitani, Masayoshi Iizuka, Hiroko Okinaga, Mimi Tamamori-Adachi, and

- Tomoki Okazaki. Wild-type and Specific Mutant Androgen Receptor Mediates Transcription via 17 β -Estradiol in Sex Hormone-sensitive Cancer Cells. *J Cellular Physiol.* 査読有 Volume 230, Page 1594-1606, 2015. doi: 10.1002/jcp.24906.
2. Hiroko Fujii, Mimi Tamamori-Adachi, Kousuke Uchida, **Takao Susa**, Takashi Nakakura, Haruo Hagiwara, Masayoshi Iizuka, Hiroko Okinaga, Yuji Tanaka, and Tomoki Okazaki. Marked cortisol production by intracrine ACTH in GIP-treated cultured adrenal cells in which the GIP receptor was exogenously introduced. *PLoS ONE.* 査読有 Published: October 21, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0110543.
 3. Youj Uemae, Joe Sakamoto, Yoshie Hidaka, Ai Hiratsuka, **Takao Susa**, Yukio Kato, Masakazu Suzuki. Gene expression, function, and diversity of Nkx2-4 in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol.* 査読有 Volume 206, Page 193-202, 2014. doi:10.1016/j.ygcen.2014.07.007.
 4. Nobuto Katagiri, Youji Uemae, Joe Sakamoto, Yoshie Hidaka, **Takao Susa**, Yukio Kato, Shioko Kimura, Masakazu Suzuki. Molecular cloning and functional characterization of two forms of Pax8 in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol.* 査読有 Volume 198, Page 22-31, 2014. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.12.009.
 5. Masakazu Iizuka, **Takao Susa**, Yoshihisa Takahashi, Mimi Tamamori-Adachi, Takashi Kajitani, Hiroko Okinaga, Toshio Fukusato, Tomoki Okazaki. Histone acetyltransferase Hbo1 destabilizes estrogen receptor by ubiquitination and modulates proliferation of breast cancers. *Cancer Sci.* 査読有 Volume 104, Page 1647-1655, 2013. doi: 10.1111/cas.12303.
- Fujii, Mimi Adachi-Tamamori, Tomoki Okazaki. Distinct Signaling Pathways of 1,25(OH)₂D₃ and 25(OH)₂D₃ Via AR in Prostate Cancer LNCaP Cells. ENDO2016, April 1- 4, 2016. Boston (USA)
2. **齋佐 崇生**, 飯塚 眞由, 安達(玉盛) 三美, 岡崎 具樹. ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞において、ビタミン D3 と DHT がアンドロゲン受容体情報伝達系を共有する分子機構. BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会). 2015 年 12 月 1 日 ~ 4 日. 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
 3. **Takao Susa**, Masayoshi Iizuka, Mimi Adachi-Tamamori, Tomoki Okazaki. Involvement of Vitamin D3 in Intracellular Signaling between Dihydrotestosterone and Androgen Receptor in Prostate Cancer LNCaP cells. ENDO2015, March 5-8, 2015. San diego (USA)
 4. **齋佐 崇生**, 伊加賀 玲奈, 飯塚 眞由, 安達(玉盛) 三美, 岡崎 具樹. いくつかの男性/女性ホルモン感受性培養癌細胞では、17 β -estradiol は、DHT と同様に、外来性に導入した非変異型 AR の生理的アゴニストとして機能する. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日 ~ 27 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
 5. **Takao Susa**, Reina Ikaga, Takashi Kajitani, Masayoshi Iizuka, Mimi Adachi-Tamamori, Tomoki Okazaki. Aberrant, but physiological, interactions between the non-mutated androgen receptor and E₂ in several sex hormone-responsive cancer cells. ENDO2014, June 21-24, 2014. Chicago (USA)
 6. **齋佐 崇生**, 梶谷 宇, 飯塚 眞由, 安達(玉盛) 三美, 岡崎 具樹. AR と種々のステロイドホルモンによる未知の交絡した転写制御機構. 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日 ~ 6 日. 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
 7. **Takao Susa**, Takashi Kajitani, Masayoshi Iizuka, Mimi Tamamori-Adachi, Tomoki Okazaki. The androgen receptor in the human prostate cancer cell line, LNCaP, mediates multihormonal regulation of

[学会発表](計 7 件)

1. **Takao Susa**, Masayoshi Iizuka, Hiroko

both parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and PSA genes.
ENDO2013, June 13-18, 2013. San Francisco (USA)

〔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 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

<http://researchmap.jp/tsusatsusa/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

諏佐 崇生 (SUSA Takao)
帝京大学・医学部・助教
研究者番号：20445852

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし