

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2016
課題番号：15K20116
研究課題名(和文)ゲノムワイドなアンドロゲンシグナル解析による前立腺癌去勢抵抗性獲得機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms of castration-resistant prostate cancer using genome-wide androgen signaling analysis

研究代表者
芦莉 大作 (ASHIKARI, Daisaku)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：70748053
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ChIP-sequence法を用いたゲノムワイドなARシグナル解析により同定したアンドロゲン応答遺伝子(Androgen responsive gene: ARG)に着目し機能解析を行った。ARGはアンドロゲン依存的に発現上昇し前立腺癌細胞の増殖能及び遊走能を亢進させていた。さらにARG配列特異的なsiRNAにて発現抑制するとその増殖能や遊走能は抑制された。また臨床病理検体の免疫組織化学染色によりARGは正常前立腺組織と比較して癌組織内で有意に高発現であることが示された。これらの結果よりこのARGは前立腺癌の増殖や進展に重要な因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Functional analyses were performed focusing on the androgen responsive gene (ARG) identified by genome-wide AR signaling analysis using the ChIP-sequence method. ARG was upregulated in an androgen-dependent manner and promoted prostate cancer cell proliferation and migration. Furthermore, siRNA targeting CLDN8 suppressed its growth and migratory ability. In addition, immunohistochemical analysis of clinical pathological specimens showed that ARG was significantly high immunoreactivity in cancerous tissues compared to benign prostatic tissues. These results suggested that ARG is an important role of proliferation and progression of prostate cancer.

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 去勢抵抗性

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は欧米では非常に罹患率の高い癌で、本邦においても近年の食生活の欧米化や高齢化社会の到来などにより急速に増加傾向にある。

前立腺癌は男性ホルモン(アンドロゲン)を介したシグナルの活性化により発症・進展することが知られており、細胞内において核内受容体であるアンドロゲン受容体(Androgen Receptor: AR)が転写因子として重要な役割を果たしている。AR はリガンドであるアンドロゲンと直接結合して複合体を形成すると核内に移行し、アンドロゲン応答配列(androgen response element : ARE)に結合して下流の標的遺伝子を発現させる。このようにして転写・活性化されたアンドロゲン応答遺伝子群の中には前立腺癌の発症や進展を促すものがある。そのためアンドロゲンを阻害する内分泌療法は前立腺癌に対する確立された治療法の一つであるが、しばしば治療中に癌が再燃しアンドロゲン非依存的に増殖する去勢抵抗性前立腺癌(castration resistant prostate cancer : CRPC)へと進行する。現在 CRPC に対する確立した治療法は非常に少なく、タキサン系抗癌剤を用いた抗癌化学療法は CRPC に対して有効性が示されているが、実際の臨床においては CRPC へ至り抗癌化学療法にも抵抗性を獲得した前立腺癌患者が増加しており大きな課題となっている。

こうした背景の中、前立腺癌研究が盛んに行われさらなる新規治療薬の開発や治療抵抗性獲得機序の解明に注目が集まっている。非常に興味深いことに近年の研究により CRPC 細胞内においてもアンドロゲン濃度は上昇しており、CRPC への進行や細胞増殖に AR の活性化やアンドロゲン応答遺伝子の発現亢進が依然として重要であることが明らかとなった。そのため、前立腺癌の発症及び進展に重要な役割を果たしているアンドロゲンの標的遺伝子に着目した研究が盛んに行われるようになった。

我々は新規アンドロゲン応答遺伝子を同定する手法としてクロマチン免疫沈降法(ChIP assay) に DNA チップを組み合わせた ChIP-chip 法を応用して、これまでに網羅的な AR シグナル解析を行い報告してきた(Takayama K et al. *Oncogene* 26: 4453-4463, 2007)。さらに新たな手法として ChIP assay に次世代シーケンサーによるゲノムシーケンスを組み合わせた ChIP-sequence 法によりゲノムワイドに AR 結合領域(Androgen Receptor Binding Sites : ARBS) を同定した。これまでに同定されたアンドロゲン応答遺伝子を機能解析することで前立腺癌の増殖や治療抵抗性獲得に関するいくつかの報告をしてきている(Takayama K et al. *EMBO J* 32: 1665-1680, 2013)。これらの方法により得られるゲノムデータを解析し、いくつかのアン

ドロゲン応答遺伝子候補を絞り込み、さらに詳細な機能解析により前立腺癌の増殖や治療抵抗性獲得機序の解明を目指した。

2. 研究の目的

(1) ChIP-sequence 法を用いてゲノムワイドにヒト前立腺癌細胞内における AR 結合領域を解析し、新規アンドロゲン応答遺伝子を同定する。

(2) 応答遺伝子の機能解析を行うことで去勢抵抗性獲得機序を明らかにし、将来の新規診断マーカーや新規前立腺癌治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) ChIP-sequence 法より得られた全ゲノムデータを解析し ARBS を同定する。様々な遺伝子のエンハンサー・プロモーター領域に ARBS が存在する遺伝子を候補遺伝子として抽出する。同定された転写開始点近傍の ARBS を含む約 1kb を抽出し Luciferase-construct を作製する。AR 陽性前立腺癌細胞株(LNCaP, VCaP) にトランスフェクションさせ vehicle 処理群と dihydrotestosterone(DHT) 処理群に分け、Luciferase assay によりアンドロゲン応答性を検証する。

(2) DHT により転写の活性化が認められた領域について、公共データベースのコンピューター配列解析ソフト TRANSFAC にて AR 結合配列を解析し、ARE 及び類似の候補配列を検索する。同定した配列への AR の結合を明らかにするために、その候補配列に mutation を入れた Luciferase-vector を作成し、(1)と同様の方法で Luciferase assay を施行し、アンドロゲン応答性の変化を解析する。さらに同定した配列への AR 結合能を Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) を用いて評価する。

(3) アンドロゲン応答遺伝子候補に対するプライマーを設計し quantitative RT-PCR 法により、vehicle 処理群及び DHT 処理群に分けて発現レベルを定量化し評価する。抗アンドロゲン剤(Bicalutamide) を用いてこれらのアンドロゲン応答性の変化について検討する。また、それぞれの遺伝子に対する特異抗体を購入、もしくは作製し Western Blotting (WB) 法によりタンパクレベルでのアンドロゲン作用による誘導を検証する。

(4) さらなる詳細な機能解析を行うために遺伝子特異的な安定過剰発現細胞株(Stable 細胞) を樹立する。作製した Stable 細胞と control 細胞を用いて細胞増殖能や遊走能に与える影響を proliferation assay 及び cell

migration assay にて検討する。

(5) 各遺伝子に対する特異的な siRNA を用いて発現抑制系の前立腺癌細胞に与える影響を qRT-PCR, WB, proliferation assay 及び cell migration assay を用いて検討する。

(6) 臨床病理検体より得られるヒト前立腺癌組織及び正常前立腺組織を用いて応答遺伝子の免疫組織化学染色を施行し病理組織学的な検討を行う。

4. 研究成果

以下より ChIP-sequence 法により同定したアンドロゲン応答遺伝子候補として Claudin8 (CLDN8) 遺伝子を例に記述していく。

(1) AR 陽性前立腺癌細胞株 LNCaP を用いた ChIP-sequence 法のデータより CLDN8 の転写開始点近傍に ARBS を同定した。さらに TRANSFAC の解析によりこの ARBS 内には 2 ヶ所の ARE 配列が存在することが確認された。それらの配列への AR の結合の有無及び AR の結合により転写が活性化され CLDN8 がアンドロゲン応答性に発現上昇するかを確認するために、上記方法に記載したとおりに Luciferase-construct を作製した。LNCaP にトランスフェクションさせ vehicle 処理群と DHT 処理群に分け Luciferase assay を施行したところ、DHT 処理群において有意に転写の活性化が起きていることを確認できた。さらにこの候補配列に mutation を入れた construct を用いて Luciferase assay を施行すると mutation を入れることにより DHT による転写の活性化は消失することが確認できた。また同配列への AR 結合能を EMSA で評価した結果、2 ヶ所の ARE 各々に確かに AR が結合することが明らかとなり、それぞれの配列への AR の結合がアンドロゲン依存的な転写の活性化に重要な働きをしていることが明らかとなった (図 1)。また CLDN8 に対するプライマーを設計し qRT-PCR 法により、vehicle 処理群と DHT 処理群に分けて発現レベルを定量化したところ、アンドロゲン応答性に mRNA の増加が認められた。さらに抗アンドロゲン剤 (Bicalutamide) 処理することにより、この DHT 依存的な発現上昇は消失し、CLDN8 のアンドロゲン応答性が明らかとなった。

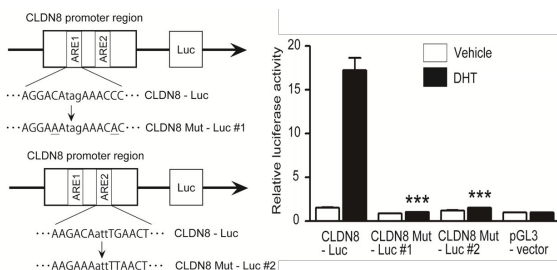


図 1 Luciferase assay を用いたアンドロゲン応答性の検討

CLDN8 promoter region に 2 ヶ所の ARE を認め、それぞれが転写の活性化に重要な配列であった。(vs CLDN8 - Luc. DHT, * * * : $p < 0.001$)

(2) 詳細な機能解析を行うため CLDN8 安定過剰発現細胞株 (以下 Stable 細胞) を LNCaP より樹立した。Stable 細胞を用いてまず初めに細胞増殖能や遊走能に与える影響について検討した。Stable 細胞と control 細胞を proliferation assay 及び cell migration assay を用いて比較検討したところ、細胞増殖能ばかりでなく遊走能も Stable 細胞において有意に亢進していることが見いだされた。また CLDN8 に対する配列特異的な siRNA を用いて CLDN8 の発現抑制系における細胞増殖能や遊走能に与える影響について検証したところ細胞増殖能及び遊走能どちらも有意に抑制されることが確認された (図 2)。

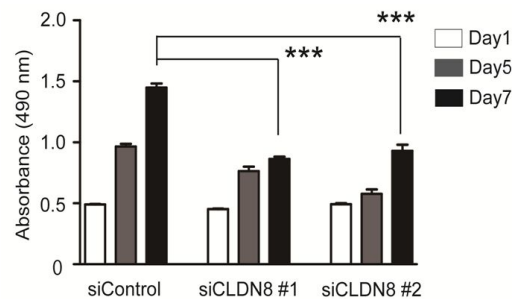


図 2 細胞増殖能に与える影響
CLDN8 を特異的に発現抑制することで前立腺癌細胞の増殖能は抑制された。(* * * : $p < 0.001$)

(3) 臨床病理検体 (ヒト前立腺癌組織及び正常前立腺組織) を用いて CLDN8 の免疫組織化学染色を行い検討した。ヒト前立腺癌組織における CLDN8 の発現は正常前立腺組織と比較して有意に高発現であった ($P = 0.0039$, Wilcoxon signed rank test) (図 3)。この結果は Oncomine data base 上で確認できる解析結果と同様の結果であった。

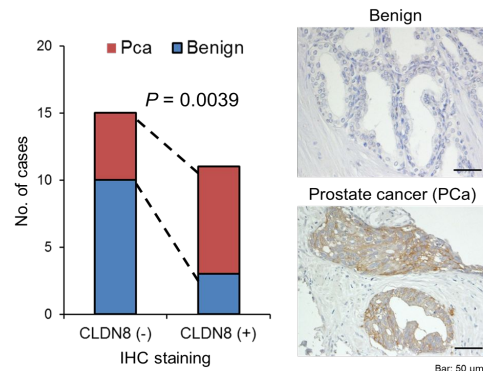


図3 ヒト前立腺組織の免疫組織化学染色
CLDN8は有意に癌組織に高発現していた。

(4) この CLDN8 のアンドロゲン依存的な発現上昇は前立腺癌細胞内で有意に認められ、細胞増殖能や遊走能の亢進に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これらの結果から癌の発育、進展や治療抵抗性の獲得に関わる重要な因子である可能性、また予後予測因子などの分子マーカーや新たな分子標的治療薬としての臨床応用の可能性などが示唆された。

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 4 件)

CLDN8, an androgen-regulated gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. Ashikari D, Takayama K, Obinata D, Takahashi S and Inoue S. Cancer Sci. 査読有り, May, 2017. Epub ahead of print. doi: 10.1111/cas.13269.

A novel prognostic factor TRIM44 promotes cell proliferation and migration, and inhibits apoptosis in testicular germ cell tumor. Yamada Y, Takayama KI, Fujimura T, Ashikari D, Obinata D, Takahashi S, Ikeda K, Kakutani S, Urano T, Fukuhara H, Homma Y, Inoue S. Cancer Sci. 査読有り, 108(1): 32-41, Jan, 2017. doi: 10.1111/cas.13105.

Increased Expression of Tripartite Motif (TRIM) 47 Is a Negative Prognostic Predictor in Human Prostate Cancer. Fujimura T, Inoue S, Urano T, Takayama K, Yamada Y, Ikeda K, Obinata D, Ashikari D, Takahashi S, Homma Y. Clin Genitourin Cancer. 査読有り, 14(4): 298-303, Aug, 2016. doi: 10.1016/j.clgc.

Abhydrolase domain containing 2, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. 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. Eur J Cancer. 査読有り, 57:

39-49, Apr, 2016.
doi: 10.1016/j.ejca.

[学会発表](計 6 件)

芦苺大作: 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の機能解析. 第2回日本泌尿器腫瘍学会, 神奈川県横浜市 ランドマークホール, 2016年10月23日

芦苺大作: 前立腺癌における p53 制御を担う新たなアンドロゲン作用メカニズム. 第89回日本内分泌学会学術総会, 京都府京都市 国立京都国際会館, 2016年4月21日

高田将吾、芦苺大作: 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, 大阪府大阪市 ハイアットリージェンシー大阪, 2016年2月27日

芦苺大作: 新規アンドロゲン応答遺伝子を応用した前立腺癌治療、診断マーカーの探索. 日本大学先端バイオフォーラム 日本大学学部連携研究推進シンポジウム, 東京都千代田区 日本大学本部 日本大学会館, 2016年1月27日

芦苺大作: 当院におけるエンザルタミドの初期使用経験. 第53回日本癌治療学会学術集会, 京都府京都市 国立京都国際会館, 2015年10月29日

芦苺大作: 新規アンドロゲン応答遺伝子 G3BP2 を介した前立腺癌における治療抵抗性獲得機序の解明. 第103回日本泌尿器科学会総会, 石川県金沢市 金沢都ホテル, 2015年4月15日

[図書](計 1 件)

芦苺大作、高橋悟: 前立腺癌の分子マーカー研究の現況 日本臨床社, 74: 50-54, 2016年1月

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究協力者

高橋 悟 (TAKAHASHI, Satoru)
大日方 大亮 (OBINATA, Daisuke)
高田 将吾 (TAKADA, Shogo)

井上 聡 (INOUE, Satoshi)
高山 賢一 (TAKAYAMA, Kenichi)