

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591863

研究課題名（和文） 前立腺癌のホルモン耐性獲得におけるチェックポイント機構の関与

研究課題名（英文） The contribution of the checkpoint genes to prostate cancer hormone resistant

研究代表者

橋本 良博 (HASHIMOTO YOSHIHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：40244561

研究成果の概要（和文）：前立腺癌のホルモン耐性にアンドロゲン受容体の転写を取り巻く細胞周期制御因子のチェックポイント機構が関与を解析した。Nek6は前立腺組織内に特異的に発現し、9番染色体長腕33-34領域に位置していた。アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株LNCaP-HRでは、Nek6発現量がLNCaPの50%以下、Chk1の発現はLNCaPの約80%と低下しており、ホルモン抵抗性前立腺癌検体でもChk1の発現量は低下していた。また、in vitroでNek6がChk1の発現とChk1のリン酸化を誘導することから、Nek6がChk1の上流に位置する遺伝子であり、RNRの発現を介してS期を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The checkpoint mechanism of the cell cycle that surrounded the transcript of the androgen receptor to the hormone resistance of the prostate cancer was analyzed. Nek6 appeared in the peculiarity in the prostate tissue, and was located in 33-34 chromosome. The amount of the Nek6 appearance decreases in androgen non-dependency prostate cancer cell LNCaP-HR with about 80% of LNCaP by 50% or less of LNCaP. The amount of appearance of Chk1 has decreased in the hormone resistance prostate cancer tissues. Moreover, it was a gene that Nek6 is located in the upstream of Chk1 because Nek6 induced the appearance of Chk1 and the phosphorylation of Chk1 with in vitro, and the possibility of controlling S period by the appearance of RNR was suggested.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

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、ホルモン耐性、チェックポイントキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌はアンドロゲン存在下で発癌し、アンドロゲンの除去（ホルモン療法）によ

り癌細胞はアポトーシスを起こし、制癌される。しかし、効果は長期間持続せずアンドロゲンの除去にもかかわらず再増殖し

始める。この現象をホルモン耐性といい、一度ホルモン耐性となると有効な治療法はなく、例外なく癌死する。このように前立腺癌は他領域の癌と異なりユニークな特徴があり、前立腺癌治療の最終目標はホルモン耐性解明に尽きると考えられる。前立腺癌のホルモン耐性の一因子として影響を及ぼす可能性がある遺伝子は報告されているが、その遺伝子を操作してもホルモン耐性機構は改善されず、そのメカニズムの解明にまで到っていないのが現状である。

アンドロゲン受容体はステロイド受容体に属する核内受容体でアンドロゲン依存性に転写を活性化し、前立腺癌の発生、増殖に関与している。私たちはアンドロゲン受容体の転写を活性化する因子を研究してきた。これまでにアンドロゲン依存性ヒト前立腺癌細胞株を用いた研究で、細胞周期制御因子であるサイクリンおよびcdc25B がアンドロゲン受容体の転写を活性化する一因子であることを証明した。また、ステロイド受容体転写共役活性化因子（コアクチベーター）SRC-3 が前立腺癌の増殖、予後に関与していることを報告してきた。しかし、治療対象であるホルモン耐性前立腺癌臨床検体でサイクリン、cdc25B およびコアクチベーターは特異的に発現しておらず、前立腺癌の死亡原因となるホルモン耐性機構への関与は認められなかった。以上の結果から、私たちは前立腺癌のホルモン耐性機構にはアンドロゲン受容体の転写を取り巻く細胞周期制御因子のチェックポイント機構の破綻が関与するという仮説を立てた。

2. 研究の目的

細胞周期のチェックポイントとは、染色体DNA異常が適切に修復されるまで細胞周期を次の事象に移行しないように停止する機構で、これにより異なった遺伝情報が娘細胞に伝達されるのを防いでいる。細胞周期チェックポイント機構は細胞周期をコントロールして、DNA複製や染色体分配といった細胞増殖におけるイベントを順序どおりに、かつ正確に進行させる。我々はDNA損傷チェックポイントに関与するチェックポイントキナーゼであるヒト Chk1 をクローニングし、ノックアウトマウスの

解析から Chk1 が cdc25 による Cdc2 活性化を抑制し、G2/M 期チェックポイントに必須であり、DNA 傷害や DNA 複製阻害による細胞周期停止に関与していることを報告した。細胞周期はサイクリン依存性キナーゼ (Cdk) として知られるセリン・スレオニンキナーゼの連続した活性化により制御されている。ヒト細胞の DNA 合成と細胞分裂はサイクリンと Cdk の急激な活性化により引き起こされ、その活性化には NIMA キナーゼの活性も必要となる。私たちは NIMA 関連キナーゼ (NIMA-related kinase: Nek) を解析し、ヒト Nek6 を同定した。

本研究は前立腺癌のホルモン耐性機構獲得における細胞周期のチェックポイント機構、特に G2/M 期で働くチェックポイントキナーゼ Chk1 や Nek6 の関与について解析する。

3. 研究の方法

(1) ヒト前立腺癌におけるチェックポイントキナーゼ Chk1 と Nek6 の発現

内分泌療法に対する効果の異なる前立腺癌臨床検体を総数 160 例用いて Chk1、Nek6、アンドロゲン受容体の mRNA、タンパクレベルでの前立腺癌組織内発現量を調べる。

(2) Chk1 と Nek6 の結合と Nek6 による Chk1 のリン酸化

Chk1、Nek6 の cDNA をコードした発現プラスミドベクターを E. coli、前立腺癌細胞株 LNCaP に各々導入し、発現させた後に E. coli、細胞からタンパクを抽出する。また、昆虫細胞 (Sf9) に Chk1、Nek6 の cDNA をコードしたバキュロウイルスベクターを感染させ、GST-fused protein として GST-Chk1、GST-Nek6 を各々抽出する。GST-Chk1、GST-Nek6 に細胞から抽出したタンパクと GST beads を反応させた後に、洗浄した beads のみをゲル上に展開し、結合の相手となる Nek6、Chk1 抗体で検出する。抽出した Nek6、GST-Chk1、GST beads を反応させ、洗浄した beads をゲル上に展開し、オートラジオグラフィーにて検出する。

(3) Chk1 と Nek6 の stable cell line の樹立

Chk1、Nek6 の cDNA とネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだ発現ベクターをサブクローニング法で既に作製した。この発現ベクターを Chk1、Nek6 の発現の低いアンドロ

ゲン非依存性前立腺癌株 LNCaP-HR に導入し、永久発現細胞を樹立する。

(4) Chk1 と Nek6 の stable cell line の解析

樹立したアンドロゲン非依存性前立腺癌株 LNCaP-HR の永久発現細胞株 LNCaP-HR/Chk1、LNCaP-HR/Nek6 の発現量を分析し、テストステロン非存在下での増殖能、DNA 合成能、細胞サイズを LNCaP-HR と比較検討する。

(5) Chk1 と Nek6 の発現抑制時のアンドロゲン依存性細胞株 LNCaP の解析

Chk1、Nek6 を発現しているアンドロゲン依存性細胞株 LNCaP に 2 本鎖 RNA (double-stranded RNA; dsRNA) を導入し、その配列特異的な mRNA の分解により Chk1、Nek6 各々の遺伝子発現を抑制する RNA interference を用い、Chk1 と Nek6 の発現量を mRNA、タンパクレベルで確認し、増殖能、DNA 合成能、細胞サイズ、アンドロゲン感受性をコントロールと比較検討する。

4. 研究成果

前立腺癌のホルモン耐性にアンドロゲン受容体の転写を取り巻く細胞周期制御因子のチェックポイント機構が関与するという仮説を基に、DNA 損傷チェックポイントに関与するチェックポイントキナーゼであるヒト Chk1 をクローニングした。

Chk1 は cdc25 による Cdc2 活性化を抑制し、G2/M 期チェックポイントに必須であり、DNA 傷害や DNA 複製阻害による細胞周期停止に関与する。

また、G2 期停止を引き起こす NIMA 関連キナーゼ (Nek) を解析し、ヒト Nek6 を同定できた。Nek6 は細胞周期特異的であり、G1 初期において発現が低下し、DNA の複製、転写、修復等に重要であるヒストンを効率的にリン酸化することから、分裂期 (M 期) キナーゼであることを確認した。

これまでに Nek6 の mRNA は前立腺組織内に特異的に発現し、9 番染色体長腕 33-34 領域に位置していた。

アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 LNCaP-HR では、Nek6 発現量が LNCaP の 50% 以下、Chk1 の発現は LNCaP の約 80% と低下しており、ホルモン抵抗性前立腺癌検体でも Chk1 の発現量は低下していた。

また、in vitro で Nek6 が Chk1 の発現と

Chk1 のリン酸化を誘導することから、Nek6 が Chk1 の上流に位置する遺伝子であり、RNR の発現を介して S 期を制御している可能性が示唆された。

また、Nek6 の発現は細胞周期特異的であり、G1 初期において発現が低下し、DNA の複製、転写、修復等に重要であるクロマチン構造タンパクのヒストン H1 と H3 を効率的にリン酸化した。

一方、Chk1 の発現は LNCaP-HR では LNCaP の約 80% と軽度の低下を認めたが、活性を持つリン酸化 Chk1 の発現量は Nek6 と同様に LNCaP-HR では LNCaP の約 20% 以下であった。他のアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 (PC3、DU145) においても Nek6 とリン酸化 Chk1 の発現量はアンドロゲン依存性前立腺癌細胞 LNCaP と比べると明らかに低下していた。in vitro で、Nek6 が Chk1 の発現と Chk1 のリン酸化を誘導し、Nek6 が Chk1 の上流に位置する遺伝子である可能性が示唆された。

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 8 件)

- ① Niimi K, Hashimoto Y, Kurokawa S, Okada A, Tozawa K, Kohri K : Embryonal rhabdomyosarcoma of the prostate. Int J Clin Oncol.、査読有、15:93-96, 2010
- ② Niida H, Murata K, Shimada M, Ogawa K, Ohta K, Suzuki K, Fujigaki H, Khaw AK, Nakanishi M : Cooperative functions of Chk1 and Chk2 reduce tumour susceptibility in vivo. EMBO J.、査読有、29(20):3558-70, 2010
- ③ Niida H, Katsuno Y, Sengoku M, Shimada M, Yukawa M, Ikura M, Ikura T, Kohno K, Shima H, Suzuki H, Tashiro S, Nakanishi M : Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. Genes Dev.、査読有、24:333-338, 2010
- ④ Nagata D, Hashimoto Y, Nakanishi M, Naruyama H, Okada S, Ando R, Tozawa K, Kohri K : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and growth inhibition

by its ligands in prostate cancer. Cancer Detect Prev.、査読有、32:259-66, 2008

- ⑤ Naruyama H, Hashimoto Y, Shimada M, Niida H, Zineldeen DH, Kohri K, Nakanishi M: Essential role of Chk1 in S phase progression through regulation of RNR2 expression. Biochem Biophys Res Commun.、査読有、374:79-83, 2008
- ⑥ Ando R, Hashimoto Y, Itoh Y, Umemoto Y, Ikeda N, Tozawa K, Kohri K, Tokudome S: Inverse relationship between obesity and serum prostate-specific antigen level in healthy Japanese men: a hospital-based cross-sectional survey, 2004-2006. Urology.、査読有、72:561-5, 2008
- ⑦ Shimada M, Niida H, Zineldeen DH, Tagami H, Tanaka M, Saito H, Nakanishi M: Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. Cell.、査読有、132:221-232, 2008
- ⑧ Shimada M, Yamada-Namikawa C, Murakami-Tonami Y, Yoshida T, Nakanishi M, Urano T, Murakami H: Cdc2p controls the forkhead transcription factor Fkh2p by phosphorylation during sexual differentiation in fission yeast. EMBO J.、査読有、27:132-142, 2008

[学会発表] (計6件)

- ① 河合憲康、戸澤啓一、永田大介、黒川覚史、丸山哲史、橋本良博、郡健二郎: 再発転移性尿路上皮癌に対する Gemcitabine/Pacritaxel 併用療法の役割。第98回日本泌尿器科学会総会、2010.4.27-30、岩手県盛岡市・いわて県民情報交流センター
- ② 橋本良博、戸澤啓一、安藤亮介、池上要介、岡田真介、内木拓、河合憲康、岡村武彦、郡健二郎: 尿路上皮癌に対するセカンドライン化学療法としての Gemcitabine-Docetaxel 療法の検討。第47回日本癌治療学会学術集会、2009.10.22-24、横浜市・パシフィコ横浜
- ③ Hashimoto Yoshihiro, Tozawa Keiichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Overexpress of Cdc25A, an androgen receptor coactivator, in human prostate cancer. AUA 2009 Annual

Meeting, 2009.4.25-30, McCormick Place Convention Center, Chicago(USA)

- ④ 橋本良博、戸澤啓一、安藤亮介、池上要介、岡田真介、林祐太郎、郡健二郎: 進行性尿路上皮癌に対するセカンドライン化学療法としての Gemcitabine-Docetaxel (GD) 療法の経験。第97回日本泌尿器科学会総会、2009.4.16-19、岡山市・岡山コンベンションセンター
- ⑤ 橋本良博、成山泰道、安藤亮介、岡田真介、戸澤啓一、郡健二郎: 前立腺癌における Steroid Receptor Co-activator ファミリーの役割。第96回日本泌尿器科学会総会、2008.4.25-27、横浜市・パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 良博 (HASHIMOTO YOSHIHIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 40244561

(2) 研究分担者

戸澤 啓一 (TOZAWA KEIICHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 40264733

中西 真 (NAKANISHI MAKOTO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 40217774

岡田 真介 (OKADA SHINSUKE)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 40381818

郡 健二郎 (KOHRI KENJIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 30122047