

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 5 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591170

研究課題名（和文） 内分泌因子によるユビキチン化経路解明に基づく
増殖性前立腺疾患治療分子標的の同定研究課題名（英文） Identification of novel androgen-responsive
and therapeutic target genes in prostate disorders

研究代表者

浦野 友彦（URANO TOMOHIKO）

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：20334386

研究成果の概要（和文）：本研究では男性ホルモンであるアンドロゲンを中心とした内分泌因子によるシグナル伝達経路を網羅的に同定することで、前立腺疾患発症へと結びつく Key regulator の同定を試みた。本解析により Oct1、ARFGAP3、TACC2、miR-148a といった新規アンドロゲン応答遺伝子ならびにマイクロ RNA をゲノム上から包括的に同定し、その新規機能と前立腺癌における臨床的意義を明らかにした。今後、これらシグナル伝達経路を標的とした臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Aging is a risk factor for prostate hyperplasia and cancer. Such disorders affect the quality of daily living and life span in the elderly. The causes of these age-related disorders are affected by genetic and environmental factors. We are focusing on the functions of sex hormone, androgen, in prostate disorders. We performed Genome-wide screening of androgen target genes in prostate cancer cells. We found that both androgen-regulated coding genes and noncoding RNAs, including Oct1, ARFGAP3, TACC2 and miR-148a. We also found that androgen-regulated ubiquitin ligase, NEDD4L and TRIM36. We infer that these genes are potential therapeutic targets in prostate cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：癌・シグナル伝達・老化・トランスレーショナルリサーチ・プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

高齢男性の多くが前立腺肥大もしくは前立腺癌に罹患し、これら疾患に伴う排尿障害さらには前立腺癌の浸潤、転移等に伴う合併症は高齢男性の QOL に大きく影響を及ぼす。

前立腺細胞は思春期において一度増殖し、その後プラトーに達した後に壮年期ならびに老年期に再び増殖が亢進することで、加齢に伴い前立腺疾患が発症する。これら疾患の原因となる前立腺細胞の増殖異常に関わる分

子機構は未だ十分明らかにされていない。前立腺細胞の異常増殖には性ホルモンであるアンドロゲンが重要であることが示されてきた。細胞増殖を研究するにあたっては、細胞周期制御因子のユビキチン化とそれに伴う蛋白分解制御機構の解明が重要と考えられている。我々は、このホルモン応答と細胞周期制御とを結びつける因子として Efp を同定した。我々は Efp が性ホルモンであるエストロゲンにより発現誘導されることを見出すと同時に、Efp が癌細胞において、細胞周期停止を行う 14-3-3 σ のユビキチン化と蛋白分解をホルモン依存性に促進させるユビキチン化酵素(ユビキチンリガーゼ)であることを発見した(*Nature* 2002; 417: 871-875)。さらに近年、申請者らは Efp の新たなユビキチン化蛋白として RIG-I を同定し、RIG-I が行うインターフェロン産生などの自然免疫作用において Efp が必須な因子であることを見出した(*Nature* 2007; 446: 916-920)。以上の実績から、我々はホルモン応答に伴うユビキチンリガーゼの発現変化を介したユビキチン化経路の活性化やその他のホルモン応答遺伝子が前立腺疾患の発症において重要な一因となるという、独自の仮説を着想した。

2. 研究の目的

本研究は、前立腺細胞がアンドロゲンを中心とした性ホルモンならびに内分泌ホルモンシグナル依存性に増殖ならびに癌化する際のシグナル伝達因子の同定を網羅的に行う。網羅的な解析から同定された候補因子の前立腺由来の細胞を用いた *in vitro* モデルでの解析、マウス疾患モデルを用いた *in vivo* での解析、さらにはヒト前立腺疾患での臨床サンプルを用いた発現解析を組み合わせることで前立腺疾患の診断ならびに治療ターゲットとなる新規遺伝子、新規シグナル伝達経路を同定し、前立腺疾患の臨床応用へとつなげることを目的とする。

3. 研究の方法

我々は既に性ホルモンに応答するユビキチンリガーゼとして Efp を同定し、乳癌における予後規定因子であることを報告している。そこで Efp 結合蛋白を探索し、Efp 結合蛋白の疾患における役割を検討した。さらに Efp は TRIM ファミリー蛋白の一つであり、TRIM ファミリー蛋白はヒトでは 60 種類程度存在する。今回、内分泌ホルモンに応答する TRIM 蛋白、ならびに TRIM ファミリーに結合する蛋白を探索、同定し、その機能検索を行った。

次に内分泌因子、性ホルモンの中で前立腺疾患の発症や進展において重要な役割を果たすことが知られるアンドロゲン応答遺伝子をゲノムワイドの手法を用いて網羅的に

同定した。具体的には、アンドロゲン受容体 (AR) が高発現している前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞を用いた。本細胞にアンドロゲン添加した際の遺伝子発現変化ならびにゲノム上での AR 結合部位を同定するため、マイクロアレイ法、クロマチン免疫沈降法、ゲノムタイリングアレイ (DNA チップ)、ならびに CAGE 法といった最新の方法を組み合わせることで、前立腺癌細胞におけるヒトゲノム上での AR 結合部位の変化とその近傍で発現変化するアンドロゲン応答遺伝子をヒト全遺伝子上で網羅的に同定した。

さらに、ゲノムワイドでの解析により同定された因子の臨床における重要性を検討し、新規前立腺疾患治療への応用を目指した。ゲノムワイド解析より得られたデータをもとに、前立腺疾患の病因、診断、治療の分子標的となる因子をリストアップする。これら因子のヒト前立腺肥大と前立腺癌患者検体での mRNA ならびに蛋白レベルでの発現を検討した。発現レベルの解析においては、レーザーダイジェスジョンにより得られたサンプルの mRNA を用いたリアルタイム PCR 法、検体より得られた切片を用いた免疫染色法により比較検討した。次に、これらの解析により得られた発現パターンと前立腺疾患の程度、病理学的ステージさらには生命予後との関連を多変量解析し、新たな前立腺疾患評価のマーカーを探索した。

また、本解析により疾患における重要性が期待された因子の高発現細胞株や siRNA を用い、動物実験モデルにおいてその発現量を増減させることで、同因子の機能と疾患における役割を明らかにした。

4. 研究成果

我々はユビキチンリガーゼである Efp と結合する因子を探索した結果、A 型インフルエンザウイルスの構成蛋白である NS1 を同定した。NS1 は Efp と直接結合することで、その基質蛋白である RIG-I との結合、ユビキチン化を阻害することで自然免疫機構を抑制し、インフルエンザウイルスの増殖を誘導する分子機構を解明した (*Cell Host Microbe* 2009; 5: 439-449)。また Efp と同じ TRIM ファミリー蛋白の一つである Terf/TRIM17 が自己ユビキチン化を誘導すること、ならびに TRIM44 と結合することで、自己ユビキチン化が抑制され、TRIM17 蛋白が安定化することを明らかにした (*Biochem Biophys Res Commun* 2009; 383: 263-268)。さらには内分泌ホルモンとして知られるグルココルチコイド応答遺伝子をマイクロアレイ法により探索し、その結果 TRIM ファミリー蛋白である TRIM63 を同定した。同時に TRIM63 は骨肉腫細胞株において分化ならびに増殖制御を行っていることを見出した (*Endocr J* 2009;

56: 843-849)。今後、TRIM ファミリー蛋白のシグナル伝達ネットワークと疾患発症との関連を解明することで、新たな前立腺疾患治療標的の同定が期待される。

また、前立腺癌の発症や進展において重要な役割を果たす性ホルモンであるアンドロゲンから、その受容体であるアンドロゲン受容体(AR)を介したシグナルに焦点を当てて研究を行った。その中で申請者らはマイクロアレイ法、クロマチン免疫沈降法、ゲノムタイピングアレイ(DNA チップ)、ならびにCAGE法といった最新の方法を組み合わせることにより前立腺癌細胞におけるヒトゲノム上でのアンドロゲン-ARシグナルに応答する遺伝子を網羅的に同定した(*Oncogene* 2011; 30: 619-630)。これら遺伝子の中にはユビキチンリガーゼとして機能する蛋白が2種類含まれていた。一つはNEDD4L遺伝子であり、もう一つは前述したEfpと同じTRIMファミリー蛋白の一つであるTRIM36であった(*Oncogene* 2011; 30: 619-630)。さらに前立腺癌においてアンドロゲン応答するmicroRNAとしてmiR-148aを新たに同定した(*Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010; 13: 356-361)。本研究においてmiR-148aがCAND1というユビキチン分解酵素(SCF複合体蛋白質)を負に制御する遺伝子の発現制御を行うことで、前立腺癌細胞の増殖を制御する分子機構を見出した。さらに転写因子であるOct1がARと協調的に作用し前立腺癌細胞の増殖を制御している分子機構を臨床サンプルならびに細胞実験により明らかにした(*Int J Cancer* 2012; 130: 1021-1028)。また、網羅的解析により同定したアンドロゲン応答遺伝子であるARFGAP3がPaxillinと協調して、前立腺癌細胞の増殖と遊走を制御する分子機構を見出した(*Int J Cancer* 2012; 130: 2240-2248)。さらに網羅的解析により同定したアンドロゲン応答遺伝子TACC2は前立腺癌細胞の細胞周期進行を誘導し、増殖制御を行う分子機構を見出した。また、臨床サンプルならびに動物モデルを用い、TACC2が前立腺癌の予後を規定する重要な診断マーカーであり、治療標的遺伝子としても重要であることを示した(*Mol Endocrinol* 2012; 26: 748-761)。最後に、転写因子であるOct1がARと協調的に作用し前立腺癌細胞の増殖を制御している新規分子機構を臨床サンプルならびに細胞実験により明らかにした(*Int J Cancer* 2012; 130: 1021-1028)。以上のように、本研究期間において、アンドロゲンを中心とした内分泌因子応答遺伝子ならびに内分泌因子を介したシグナル伝達経路を網羅的に探索する中で、前立腺疾患における臨床診断マーカーならびに治療標的として重要な因子ならびにシグナル伝達経路を複数同定した。今後、これら因子を標的とした前立腺疾患をはじめとし

た様々な疾患への臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Takayama K, Horie-Inoue K, Suzuki T, Urano T, Ikeda K, Fujimura T, Takahashi S, Homma Y, Ouchi Y, Inoue S: TACC2 is an androgen-responsive cell cycle regulator promoting androgen-mediated and castration-resistant growth of prostate cancer. *Mol Endocrinol* (in press) 査読有.
DOI: 10.1210/me.2011-1242.
2. Urano T, Shiraki M, Yagi H, Ito M, Sasaki N, Sato M, Ouchi Y, Inoue S: GPR98/Gpr98 gene is involved in the regulation of human and mouse bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E565-E574, 2012, 査読有.
DOI: 10.1210/jc.2011-2393.
3. Obinata D, Takayama K, Urano T, Murata T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Takahashi S, Inoue S: ARFGAP3, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Int J Cancer* 130, 2240-2248, 2012, 査読有.
DOI: 10.1002/ijc.26224.
4. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Tanaka T, Zhang W, Azuma K, Takayama K, Obinata D, Murata T, Horie-Inoue K, Kodama T, Ouchi Y, Homma Y, Inoue S: Clinical significance of steroid and xenobiotic receptor (SXR) and its targeted gene CYP3A4 in human prostate cancer. *Cancer Sci* 103, 176-180, 2012, 査読有.
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02143.x.
5. Obinata D, Takayama K, Urano T, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Homma Y, Ouchi Y, Takahashi S, Inoue S: Oct1 regulates cell growth of LNCaP cells and is a prognostic factor for prostate cancer. *Int J Cancer* 130, 1021-1028, 2012, 査読有.
DOI: 10.1002/ijc.26043.
6. Urano T, Narusawa K, Sasaki N, Shiraki M, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, Inoue S: A single-nucleotide polymorphism in the hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1) gene is associated with spinal osteophyte formation and disc degeneration in Japanese women. *Eur Spine J* 20, 572-577, 2011, 査読有.
DOI: 10.1007/s00586-010-1598-0.
7. Takayama K, Tsutsumi S, Katayama S, Okayama T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano

- T, Kawazu C, Hasegawa A, Ikeo K, Gojyobori T, Ouchi Y, Hayashizaki Y, Aburatani H, Inoue S: Integration of cap analysis of gene expression and chromatin immunoprecipitation analysis on array reveals genome-wide androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Oncogene* 30, 619-630, 2011, 査読有.
DOI: 10.1038/onc.2010.436.
8. Kou I, Takahashi A, Urano T, Fukui N, Ito H, Ozaki K, Tanaka T, Hosoi T, Shiraki M, Inoue S, Nakamura Y, Kamatani N, Kubo M, Mori S, Ikegawa S: Common variant s in a novel gene, *FONG* on chromosome 2q33.1 confer risk of osteoporosis in Japanese. *PLoS ONE* 6, e19641, 2011, 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pone.0019641.
 9. Azuma K, Urano T, Watabe T, Ouchi Y, Inoue S: PROX1 suppresses vitamin K-induced transcriptional activity of steroid and xenobiotic receptor. *Genes Cells* 16, 1063-1070, 2011, 査読有.
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01551.x.
 10. Urano T, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Ouchi Y, Inoue S: Identification of non-synonymous polymorphisms in the WDSOF1 gene as novel susceptibility markers for low bone mineral density in Japanese postmenopausal women. *Bone* 47, 636-642, 2010, 査読有.
DOI: 10.1016/j.bone.2010.06.017.
 11. Murata T, Takayama K, Katayama S, Urano T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Takahashi S, Kawazu C, Hasegawa A, Ouchi Y, Homma Y, Hayashizaki Y, Inoue S: miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 13, 356-361, 2010, 査読有.
DOI: 10.1038/pcan.2010.32.
 12. Azuma K, Casey SC, Ito M, Urano T, Horie K, Ouchi Y, Kirchner S, Blumberg B, Inoue S: Pregnane X receptor knockout mice display osteopenia with reduced bone formation and enhanced bone resorption. *J Endocrinol* 207, 257-263, 2010, 査読有.
DOI: 10.1677/JOE-10-0208.
 13. Gack MU, Albrecht RA, Urano T, Inn KS, Huang IC, Carnero E, Farzan M, Inoue S, Jung JU, García-Sastre A: Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by RIG-I. *Cell Host Microbe* 5, 439-449, 2009, 査読有.
DOI: 10.1016/j.chom.2009.04.006.
 14. Urano T, Usui T, Takeda S, Ikeda K, Okada A, Ishida Y, Iwayanagi T, Otomo J, Ouchi Y, Inoue S: TRIM44 interacts with and stabilizes terf, a TRIM ubiquitin E3 ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 383, 263-268, 2009, 査読有.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.04.010.
 15. Azuma K, Urano T, Ouchi Y, Inoue S: Vitamin K2 Suppresses Proliferation and Motility of Hepatocellular Carcinoma Cells by Activating Steroid and Xenobiotic Receptor. *Endocr J* 56, 843-849, 2009, 査読有.
DOI: 10.1507/endocrj.K09E-290.
- [学会発表] (計 13 件)
1. Inoue S: [Symposium] Genome-wide Androgen Signaling in Prostate Cancer. (2011.11.8-10) The 42nd International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Tokyo, Japan.
 2. Inoue S: Genome-wide androgen receptor signaling in prostate cancer. (2011.8.4-5) US-Japan conference on inflammation, diabetes and cancer, Duarte, California, USA.
 3. 浦野友彦、白木正孝、成澤研一郎、中村利孝、大内尉義、井上聡：スクレロシチンの血中濃度は骨量、脊椎変形ならびに体脂肪量と正に相関し、SOST 遺伝子近傍の SNP とも関連する (2011.7.28-30) 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 (大阪)
 4. 浦野友彦、白木正孝、大内尉義、井上聡：[シンポジウム] 骨粗鬆症の CNV 解析 (2011.6.16-19) 遺伝医学合同学術集会 2011 (京都)
 5. 浦野友彦、白木正孝、斎藤充、大内尉義、井上聡：[優秀演題賞受賞] 葉酸代謝関連マーカーを用いた骨折リスクの解析 (2011.6.15-17) 第 53 回日本老年医学会学術集会 (東京)
 6. Urano T, Shiraki M, Yagi H, Ito M, Sato M, Ouchi Y, Inoue S: GPR98 gene in the regulation of human and mouse bone mineral density. (2011.6.4-7) ENDO 2011: The 93rd Annual Meeting & Expo, Boston, USA.
 7. 浦野友彦、白木正孝、大内尉義、井上聡：[研究助成受賞講演] 骨・関節における加齢状態を予測するゲノムマーカーならびにバイオマーカーの探索と同定 (2011.5.27-29) 第 11 回日本抗加齢医学会総会 (京都)
 8. 浦野友彦、白木正孝、成澤研一郎、大内尉義、中村利孝、井上聡：エストロゲン

受容体 α ならびに LRP5 遺伝子における
遺伝子多型を用いた高齢女性における脊
柱変形のリスク評価 (2011.5.27-29) 第 11
回日本抗加齢医学会総会 (京都)

9. Inoue S: [Symposium] Genome-wide androgen signaling. (2011.5.3-7) 5th PacRim Breast and Prostate Cancer Meeting, Kingscliff, NSW, Australia.
10. 浦野友彦、白木正孝、八木秀司、佐藤真、大内尉義、井上聡: SNP アレイを用いた骨量との関連解析-ヒトゲノム、マウスマodel、ならびに発現解析を用いた骨粗鬆症疾患関連遺伝子の同定 (2010.10.21-23) 第 12 回日本骨粗鬆症学会 (大阪)
11. Urano T, Shiraki M, Yagi H, Sato M, Ouchi Y, Inoue S: Large scale human SNP analysis revealed an association of GPR98 gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women and Gpr98 deficient mice display osteopenia (2010.10.11-15) American Society of Bone and Mineral Research 32nd Annual Meeting, Toronto, Ontario, Canada.
12. 浦野友彦、白木正孝、大内尉義、井上聡: 葉酸トランスポーター遺伝子多型は血中葉酸値を規定し骨粗鬆症ならびに骨折発症に関わる (2010.6.11-13) 第 10 回日本抗加齢医学会総会 (京都)
13. Urano T, Tsukui T, Usui T, Ikeda K, Takayama K, Azuma K, Ouchi Y, Inoue S: Estrogen-responsive finger protein as a tumor-promoting factor and a therapeutic target for breast cancer. (2009.10.1-3) 第 68 回日本癌学会学術総会 (横浜)

6. 研究組織

(1)研究代表者

浦野 友彦 (URANO TOMOHIKO)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号: 20334386

(2)研究分担者

井上 聡 (INOUE SATOSHI)
東京大学・医学部附属病院・特任教授
研究者番号: 40251251