

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791482

研究課題名 (和文) ダイオキシン類介在性アンドロゲン受容体分解による前立腺癌細胞増殖抑制

研究課題名 (英文) Inhibition of prostatic cancer cellular proliferation through degradation of androgen receptor by effects of dioxins

研究代表者

丸山 覚 (MARUYAMA SATORU)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：80507591

研究成果の概要 (和文)：ヒト前立腺癌を含む細胞株におけるダイオキシン受容体の発現状態をウェスタンブロットにより確認した。各種ダイオキシン類を選定し、これらリガンドの増殖能、転写能を確認したところ、代表的なリガンドとしての 3-Methylcholanthrene (3MC) の場合は LNCaP (前立腺癌細胞株) 増殖は抑制され、アンドロゲンレセプター (AR) 発現は減少していた。これは濃度依存性が認められた。それに対し、AR の転写能は逆に上昇していた。この現象はアンドロゲン存在下、非存在下いずれでもみられた。しかし他のあるリガンドでは増殖能、転写能ともに抑制していることが確認された。これによりホルモン不応性前立腺癌に対する治療効果が期待されると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：The expression status of the dioxin receptor (AhR) in the cell line including the human prostate cancer was confirmed by Western blot analysis. LNCaP, which is known as prostate cancer cell line, proliferation is controlled for 3-Methylcholanthrene (3MC) as a typical AhR ligand, and the proliferation potency and the transcriptional ability of these ligands were confirmed, and androgen receptor (AR) appearance has decreased. The concentration dependency was admitted. On the other hand, the transcriptional ability of AR rose oppositely. This phenomenon was seen also in the presence or absence of androgen. However, it was confirmed to control both proliferation potencies and the transcriptional abilities in other ligands. As a result, it was thought that the therapeutic gain to the hormone refractory prostate cancer was expected.

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	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：ダイオキシン受容体、前立腺癌、ホルモン不応性癌、アンドロゲン受容体

1. 研究開始当初の背景

性ホルモンは生理学的な働き以外に、内分泌関連組織由来の癌の増殖に関与す

る。具体的にはアンドロゲン依存性を示す前立腺癌やエストロゲン依存性を示す乳癌や卵巣癌などのホルモン依存性癌の

増殖作用である。前立腺癌では、たとえ遠隔転移を有する進行癌であっても、除手術、LH-RHアナログ投与などで血中アンドロゲンを低下させること、またはアンドロゲンとその受容体との結合を遮断することにより、癌細胞の成長抑止、apoptosisを促すホルモン療法が奏功する。しかし、その奏功期間は限られており半数は5年以内にホルモン非依存性となり制御不能となる。

近年このホルモン非依存性癌においてもホルモン依存性癌と同様に、その増殖にアンドロゲン刺激伝達系が関与していることがわかってきた。その機序として、1) アンドロゲン受容体(AR)発現分解の量的異常、2) ARおよびco-factorの質的異常、3) アンドロゲン以外の物質による受容体活性化などが挙げられる。すなわち、前立腺癌はホルモン非依存性となってもARを介した増殖の制御を受けており、この機構の解明によりさらなる癌の制御の可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

ホルモン受容体を含む転写因子の多くは、ユビキチン-プロテアソーム系によって分解制御されている。標的タンパク質のユビキチン化に必要な酵素群の中で、特にユビキチンリガーゼ E3 は標的タンパク質を認識し、最終的にユビキチンを付加する重要な酵素サブユニットである。この分解系の特徴は、基質特異性が高く、分解速度が速いことである。この特徴を利用して、転写因子や細胞シグナル伝達や癌遺伝子産物や癌抑制遺伝子産物は、自分自身のタンパク質としての発現量(分解量)を調節している。我々は前立腺癌細胞の性質または制御についてARのco-factorのユビキチン-プロテアソーム系による分解の研究でその一部を明らかにしてきた。しかしながら上述の機序のごとく、ARが存在するかぎり癌を完全に制御することは困難と考えられた。ARはMDM2やダイオキシン受容体(AhR)によるユビキチン化により分解されることが報告されている。しかしARの発現量を制御することにより前立腺癌の治療と関連づける報告はまだ少ない。そこで、**ARを直接分解することによりホルモン依存性、非依存性を問わず前立腺癌の増殖抑制をもたらす、治療的効果につながるか検討することを目的とするものである。**

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌細胞株におけるダイオキシン受容体(AhR)の発現

前立腺癌細胞株におけるAhRの

mRNAおよびタンパク質レベルでの発現量を計測する。

(2) ダイオキシン受容体発現前立腺癌株のAR転写活性および増殖能

AhRの発現の変化を確認した場合、その細胞株の*in vitro*での転写活性や増殖能を検討する。増殖能はMTSアッセイ法により、0, 2, 4, 6, 8日目に測定した。転写能はルシフェラーゼアッセイにて測定した。またそれぞれの実験系においてDHTおよびAhRリガンドの有無での比較を行った。AhRのsiRNAによる発現抑制株も同時に検討する。

(3) ダイオキシン受容体リガンド暴露による前立腺癌細胞株におけるAR発現量

前立腺癌細胞株の*in vitro*での各種AhRリガンドに暴露された状態におけるARの発現量を確認する。それぞれの実験系においてDHTおよび3MCの有無での比較を行う。AhRのsiRNAによる発現抑制株も検討する

4. 研究成果

(1) 前立腺癌細胞株におけるダイオキシン受容体(AhR)の発現

ARを発現する既存前立腺癌細胞株(LNCaP, 22RV1)ではAhRを発現していた。2種類の細胞株のみの検討であるが、ARの発現量とAhRの発現量には逆相関があることを想起させる結果であった。(図1)

(2) ダイオキシン受容体発現前立腺癌株のAR転写活性および増殖能

前立腺癌細胞株(LNCaP)に代表的なリガンドとしての3-Methylcholanthrene(3MC)を暴露して培養したところ、濃度依存性の増殖能の低下を認めた。アンドロゲン非存在下で増殖能は低下するが、3MCによる影響はアンドロゲン存在下でも非存在下でも同様の結果であった。(図2)

それに対し、AR転写活性は濃度依存性に上昇した。しかし別のリガンド(ligand X)では転写活性は低下した。また、プロテアソーム阻害薬; MG132によりligand XのAR転写効率減少が緩和された。(図3)

これにより、各リガンドにより異なる作用が認められることが判明した。

(3) ダイオキシン受容体リガンド暴露による前立腺癌細胞株におけるAR発現量

前立腺癌細胞株の*in vitro*での各種AhRリガンドに暴露したところ、ARの発現量は減少していた。(図4)

(4) ダイオキシシン受容体過剰発現株の作成

現在検討中である。

(5) ダイオキシシン受容体の抑制(siRNA)

現在検討中である。

図1 前立腺癌細胞株における AhR の発現

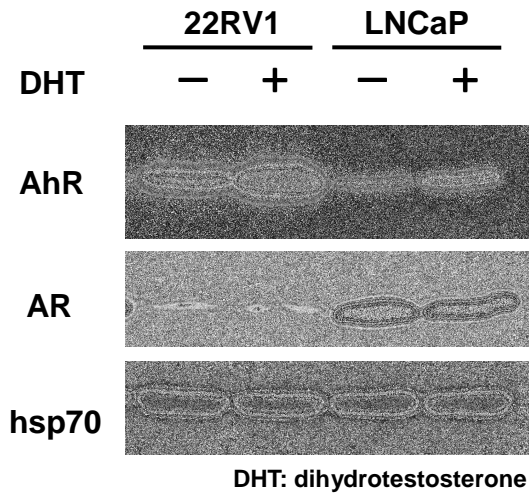


図2 AhR リガンドと前立腺癌細胞株増殖

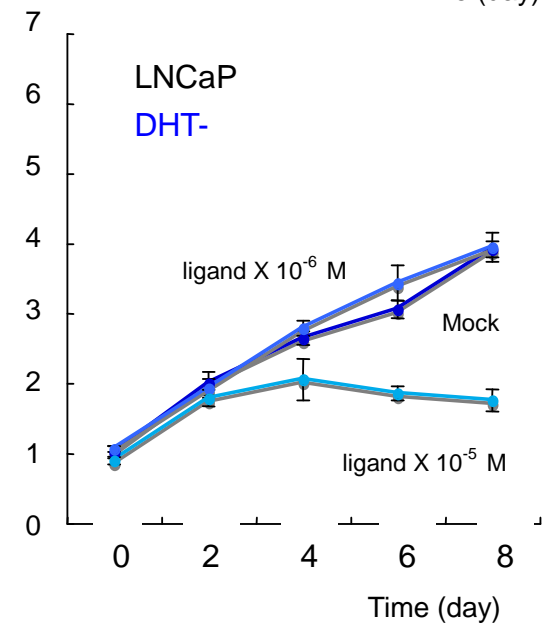
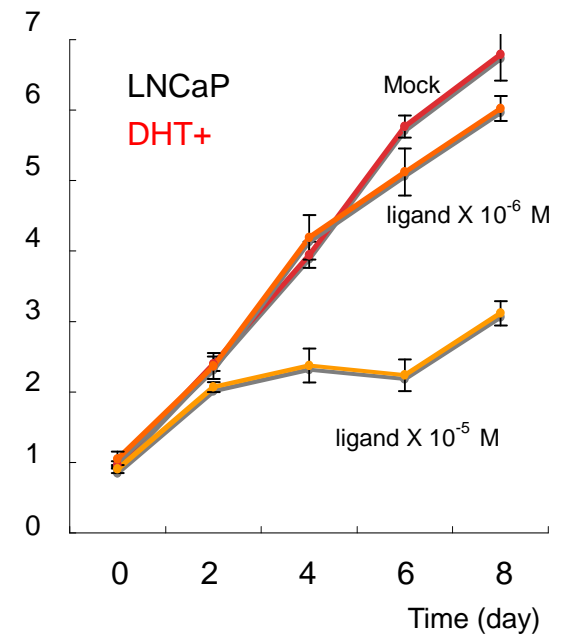
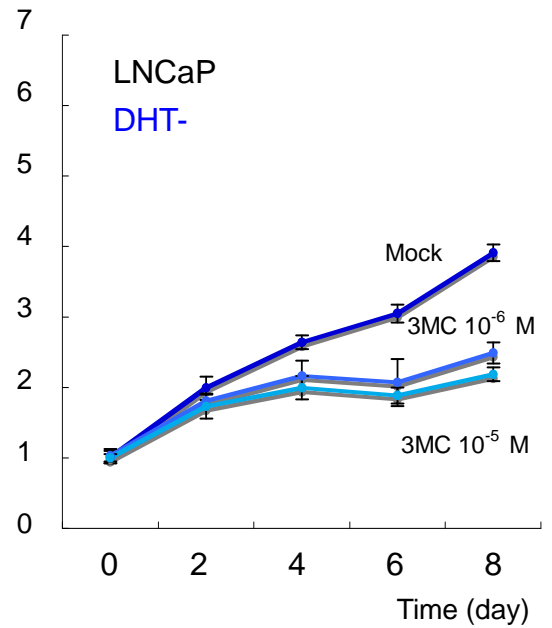
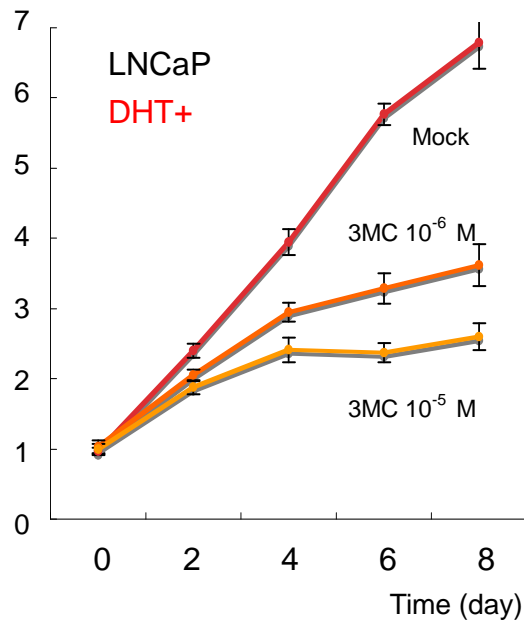


図3 AhR リガンドと AR 転写能

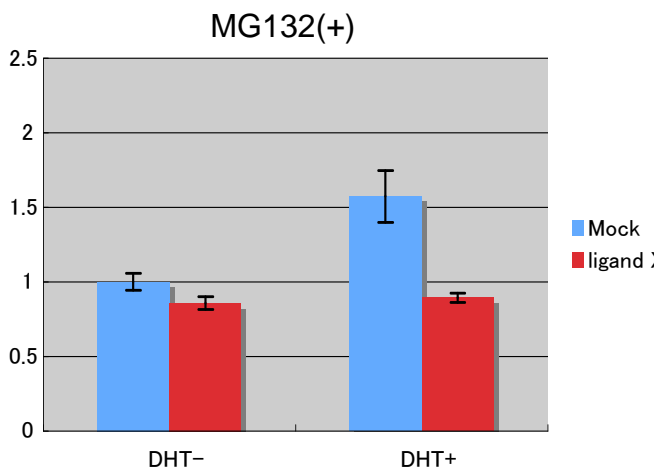
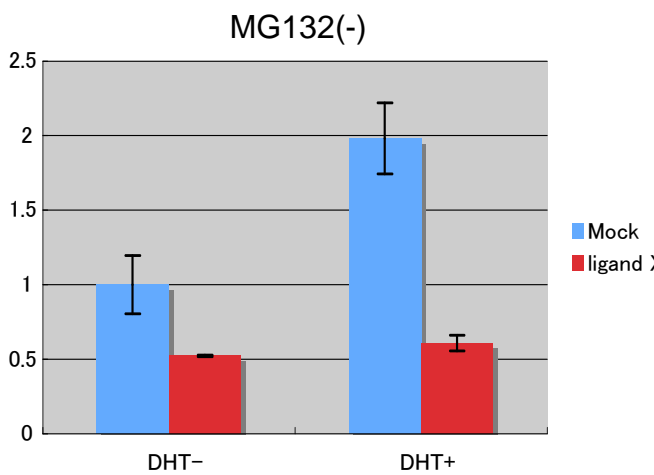
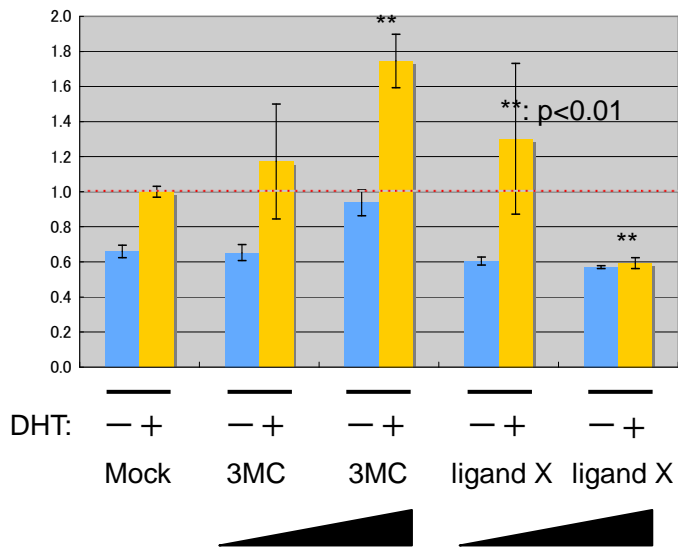
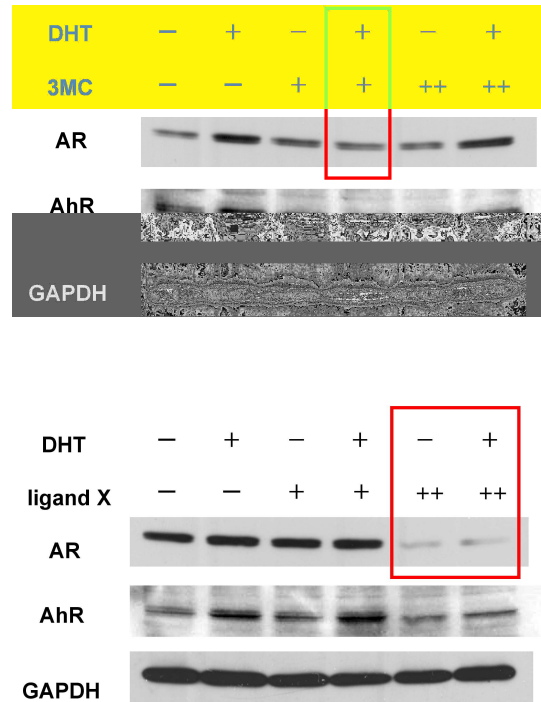


図4 AhR リガンドによる AR, AhR 発現の変化



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3件)

① 丸山 覚, 他. PSA 監視療法の適応基準と治療開始基準 PSA kinetics は有用か? 日本腎泌尿器疾患予防医学研究会誌, 19(1): 89-92, 2011. (査読: 無)

② 丸山 覚, 他. Stage C 前立腺癌の治療成績—動体追跡強度変調放射線療法と前立腺全摘除術の比較— 泌尿器外科. 23(8): 1105-1107, 2010. (査読: 無)

③ Miyajima N, Maruyama S, et al. TRIM36 interacts with the kinetochore protein CENP-H and delays cell cycle progression. Biochem Biophys Res Commun. 381(3): 383-7, 2009. (査読: 有)

[学会発表] (計3件)

① 丸山 覚, 他. Low risk 前立腺癌に対する PSA 監視療法における PSA doubling time の意義, 第 99 回日本泌尿器科学会総会, 2011 年 4 月 21 日, 名古屋

②丸山 覚, 他. PSA 監視療法の適応基準と治療開始基準～PSA kinetics の検討, 第 48 回日本癌治療学会総会, 2010 年 10 月 28 日, 京都

③丸山 覚, 他. PSA 監視療法の適応基準と治療開始基準-PSA kinetics は有用か? 第 19 回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会, 2010 年 7 月 8 日, 千葉

[図書] (計 2 件)

① 丸山 覚. PSA 監視療法が薦められる患者とはどんな患者でしょうか?
中外医学社 (笥 善行 編著: 前立腺癌診療 Q&A): 218-221, 2010.

② Maruyama S, Nonomura K, Hatakeyama S. Molecular mechanism of PSA expression in prostate cancer cells. NOVA publishers. (Editors: Jake A. Saylor and Lionel B. Michaels, PSA and Prostate Cancer), Chapter VII 137-152, 2010.

[その他]

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 覚 (MARUYAMA SATORU)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号: 80507591

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし