

## 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25年5月19日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591769

研究課題名（和文） 前立腺癌におけるアンドロゲン受容体の分子調節機構の解明と治療標的分子の同定

研究課題名（英文） The identification of molecular mechanisms of androgen receptor regulation and novel therapeutic target in prostate cancer

## 研究代表者

横溝 晃 (YOKOMIZO AKIRA)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：60346781

## 研究成果の概要（和文）：

前立腺癌におけるアンドロゲン受容体（AR）の機能解析は、ホルモン治療（ADT）に抵抗性となる、いわゆる去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）の病態を明らかにする上で最も重要な研究課題である。我々は、ADTやCRPCへの進展の際に活性酸素や酸化ストレスが大きな役割を果たしており、この酸化ストレスによって転写因子である Twist-1、YB-1 が発現誘導され、AR の発現誘導につながる分子機序を解明した。さらに、AR 共役因子の活性化や抗コレステロール薬であるスタチン、消炎鎮痛剤であるアスピリンが AR 調節に与える分子機序についても新しい知見を得た。

## 研究成果の概要（英文）：

The functional analysis of androgen receptor (AR) in prostate cancer is most important to clarify mechanisms of developing castration-resistant prostate cancer (CRPC). We identified that oxidative stress and reactive oxygen species had played an important role in the progression to CRPC. And the transcription factors, Twist-1 and YB-1, are induced by this oxidative stress and had significant function to regulate AR in developing to CRPC. In addition, we obtained the novel molecular mechanisms on AR co-activators. Furthermore, we found the novel pharmacological function of aspirin and statin on AR regulations.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、アンドロゲン受容体、酸化ストレス、去勢抵抗性

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌におけるアンドロゲン受容体 (Androgen receptor: AR) の機能解析は、ホルモン治療 (Androgen deprivation therapy: ADT) に抵抗性となる、いわゆる去勢抵抗性前立腺癌 (castration resistant prostate cancer: CRPC) の病態を明らかにする上で最も重要な研究課題である。

### 2. 研究の目的

AR 発現調節機構に関し、これまでの多くの研究がなされてきたが、我々は新たに、酸化ストレス、AR の核内移行シグナル、新規転写因子、ヒストン脱アセチル化酵素、アスピリンやスタチンなどが AR シグナルの活性化など、新規機序を解明し、CRPC に対する新たな分子標的を確立することで新規治療薬の開発へ繋げることを目的としている。

### 3. 研究の方法

前立腺癌細胞株である LNCaP とその CRPC 株として我々が樹立した CRx 細胞、CRPC の性格をもつ前立腺癌細胞株 PC-3、DU-145 細胞、過酸化水素耐性細胞を用いた。発現プラスミド、siRNA を用いて標的遺伝子の発現を増強もしくは抑制した。遺伝子発現は定量的リアルタイム PCR、ウエスタンブロット法にて解析した。転写因子の転写活性については、レポーターアッセイやクロマチン免疫沈降法を用いて解析した。分子間の会合は、プルダウンアッセイや共免疫沈降法にて行った。また、*in vitro* や *in vivo* での細胞増殖試験や細胞毒性試験を行い、細胞増殖の変化および治療感受性を評価した。具体的な研究内容は以下の通りである。

- (1) 酸化ストレスにおける AR の発現誘導の分子機序
- (2) AR の共役因子と CRPC との関連性
- (3) AR の細胞内局在に関する研究
- (4) statin による AR 発現抑制の分子機序
- (5) アスピリンと AR シグナルとの関連性

### 4. 研究成果

- (1) 酸化ストレスにおける AR の発現誘導の分子機序

前立腺がんに対する ADT や CRPC への進展の際に活性酸素や酸化ストレスが大きな役割を果たしていることを明らかにし、この酸化ストレスによって転写因子である Twist-1、YB-1 が発現誘導され、AR の発現誘導につながる分子機序を解明した。YB-1 は、CRPC 株で高発現し、前立腺全摘標本の免疫組織学的検討で高いグリソンスコアと相関する事が明らかにした。さらに、YB-1 は AR の発現を誘導することで、CRPC の形質を獲得していることを明らかとし、YB-1 が CRPC 治療における新たな標的分子となることを報告した。前

立腺癌細胞株において、ADT により、細胞内酸化ストレスが増加し、これが CRPC に至る原因の一つであることを報告した。また、細胞内の主要な酸化物質である Peroxiredoxin family の中で、Peroxiredoxin 2 が CRPC 株で過剰発現し、これが AR の活性を上昇させアンドロゲン感受性を増加させていることを明らかにした。さらに、Peroxiredoxin 2 は細胞質では AR 活性を高めるのに対し、核内では AR 活性を低下させるという 2 面性があることが判明した。CRPC 細胞では、Peroxiredoxin 2 は核内で減少する一方、細胞質で増加しており、これが CRPC 形質の獲得の機序であることを明らかにした。

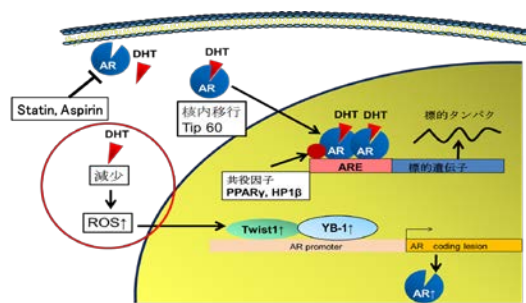
(2) AR の共役因子と CRPC との関連性  
Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Coactivator-1 $\alpha$  と Human heterochromatin protein  $\beta$  が、AR の新たな共役因子であることを見出し、この活性化が前立腺癌の増殖シグナルとなることを報告した。

(3) AR の細胞内局在に関する研究  
AR は dehydrotestosterone (DHT) と結合し、核内へ移動することで活性化するが、細胞内局在に関する研究としては、hinge region の核移行シグナルにある Lys<sup>630/632/633</sup> への変異導入により AR は核移行できなくなり、その部分が核移行に重要であることが示されている<sup>10)</sup>。我々は、アセチル化酵素である Tip60 が AR の転写共役因子であり、これらが、AR の細胞内局在に関与しており、CRPC 株でこの制御が破綻している可能性を示し、CRPC における AR の核移行が重要な現象であることを提唱した。

(4) statin による AR 発現抑制の分子機序  
抗コレステロール薬であるスタチンは、前立腺癌の化学予防薬として広く知られている薬剤であるが、その分子機序は不明であった。我々は、スタチンでは、AR の蛋白分解亢進によりアンドロゲン感受性を低下させることを新たに見出した。

(5) アスピリンと AR シグナルとの関連性  
アスピリンも、疫学的に前立腺がんの化学予防薬の可能性が指摘されている。アスピリンはプロスタグランジン受容体 EP2 と EP3 を介して AR の発現調節を行っていることを明らかにし、このシグナルを阻害することで前立腺癌細胞の増力抑制につながることを明らかにした。

以下に我々が明らかにした分子機序を図示する。



## 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 29 件)

原著

- (1) Shiota M, Yokomizo A, Tada Y, Inokuchi J, Kashiwagi E, Masubuchi D, Eto M, Uchiumi T, Naito S. : Castration resistance of prostate cancer cells caused by castration-induced oxidative stress through Twist1 and androgen receptor overexpression. *Oncogene* 29:237-50, 2010 (査読有)
- (2) Shiota M, Yokomizo A, Tada Y, Inokuchi J, Tatsugami K, Kuroiwa K, Uchiumi T, Fujimoto N, Seki N, Naito S. : Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  interacts with the androgen receptor and promotes prostate cancer cell growth by activating the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 24:114-27, 2010 (査読有)
- (3) Shiota M, Yokomizo A, Masubuchi D, Tada Y, Inokuchi J, Eto M, Uchiumi T, Fujimoto N, Naito S. : Tip60 promotes prostate cancer cell proliferation by translocation of androgen receptor into the nucleus. *Prostate* 70:540-54, 2010 (査読有)
- (4) Yokomizo A, Koga H, Shinohara N, Miyahara T, Machida N, Tsukino H, Uozumi J, Nishiyama K, Fuminori F, Sakai H, Naito S. : Skeletal-related events in urological cancer patients with bone metastasis: A multicenter study in Japan. *Int J Urol* 17:332-6, 2010 (査読有)
- (5) Shiota M, Song Y, Yokomizo A, Tada Y, Kuroiwa K, Eto M, Oda Y, Inokuchi J, Uchiumi T, Fujimoto N, Seki N, Naito S. : Human heterochromatin protein 1 isoform HP1{beta} enhances androgen receptor activity and is implicated in prostate cancer growth. *Endocr Relat Cancer*, 17:455-67, 2010 (査読有)
- (6) Choi K, Park S, Lim BJ, Seong AR, Lee YH, Shiota M, Yokomizo A, Naito S, Na Y, Yoon HG. : Procyanidin B3, an inhibitor of histone acetyltransferase, enhances the action of antagonist for prostate cancer cells via inhibition of p300-dependent acetylation of androgen receptor. *Biochem J* 433:235-44, 2010 (査読有)
- (7) Kim MJ, Seong AR, Lee YH, Kim YJ, Shiota M, Yokomizo A, Naito S, Lee J, Jun W, Yoon HG. : Histone Acetyltransferase Inhibitory Activity of Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) Ethanol Extract on Androgen Receptor-dependent Prostate Cancer Cell Growth. *Food Sci Biotechnol* 19:1503-1511, 2010 (査読有)
- (8) Amamoto R, Yagi M, Song Y, Oda Y, Tsuneyoshi M, Naito S, Yokomizo A, Kuroiwa K, Tokunaga S, Kato S, Hiura H, Samori T, Kang D, Uchiumi TA. : Mitochondrial p32/C1QBP is highly expressed in prostate cancer and is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *Cancer Sci* 102:639-47, 2011 (査読有)
- (9) Yokomizo A\*, Shiota M, Kashiwagi E, Kuroiwa K, Tatsugami K, Inokuchi J, Takeuchi A, Naito S. : Statins reduce the androgen sensitivity and cell proliferation by decreasing the androgen receptor protein in prostate cancer cells. *Prostate* 71:298-304, 2011 (査読有)
- (10) Shiota M, Yokomizo A, Kashiwagi E, Takeuchi A, Fujimoto N, Uchiumi T, Naito S. Peroxiredoxin 2 in the nucleus and cytoplasm distinctly regulates androgen receptor activity in prostate cancer cells. *Free Radic Biol Med* 51:78-87, 2011 (査読有)
- (11) Shiota M, Takeuchi A, Song Y, Yokomizo A, Kashiwagi E, Uchiumi T, Kuroiwa K, Tatsugami K, Fujimoto N, Oda Y, Naito S. Y-box binding protein-1 promotes

castration-resistant prostate cancer growth via androgen receptor expression. *Endocr Relat Cancer*. 18:505-17, 2011 (査読有)

- (12) Kashiwagi E, Shiota M, Yokomizo A, Itsumi M, Inokuchi J, Uchiumi T, Naito S. Downregulation of phosphodiesterase 4B (PDE4B) Activates Protein Kinase A and Contributes to the Progression of Prostate Cancer. *Prostate*, 72:741-51, 2012 (査読有)
- (13) Shiota M, Song Y, Takeuchi A, Yokomizo A\*, Kashiwagi E, Kuroiwa K, Tatsugami K, Uchiumi T, Oda Y, Naito S. Antioxidant Therapy Alleviates Oxidative Stress by Androgen Deprivation and Prevents Conversion From Androgen Dependent to Castration Resistant Prostate Cancer. *J Urol*. 187:707-14. 2012 (査読有)
- (14) Yokomizo A, Takakura M, Kanai Y., Sakuma T., Matsubara J., Honda K., Naito S., Yamada T., Ono M. Use of quantitative shotgun proteomics to identify fibronectin 1 as a potential plasma biomarker for clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Biomark*, 10(3-4):175-83, 2011-2012 (査読有)
- (15) Shiota M, Takeuchi A, Yokomizo A, Kashiwagi E, Tatsugami K, Naito S. Methyltransferase inhibitor adenosine dialdehyde suppresses androgen receptor expression and prostate cancer growth. *J Urol*. 188:300-6, 2012 (査読有)
- (16) Shiota M, Takeuchi A, Yokomizo A, Kashiwagi E, Tatsugami K, Kuroiwa K, Naito S. Androgen Receptor Signaling Regulates Cell Growth and Vulnerability to Doxorubicin in Bladder Cancer. *J Urol*. 188:276-86, 2012 (査読有)
- (17) Takakura M, Yokomizo A, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Banno M, Tomohiro Sakuma T, Imada K, Oda Y, Kamita M, i Honda K, Yamada T, Naito S and Ono M. Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *ISRN Oncology*, 2012:768190. doi:

10.5402/2012/768190 (査読有)

- (18) Kashiwagi E, Shiota M, Yokomizo A, Inokuchi J, Itsumi M, Uchiumi T, Naito S. Prostaglandin receptor EP3 mediates growth inhibitory effect of aspirin through androgen receptor and contributes to castration resistance in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2013, in press (査読有)
- (19) Itsumi M, Shiota M, Yokomizo A, Kashiwagi E, Takeuchi A, Tatsugami K, Inokuchi J, Song Y, Uchiumi T, Naito S. J Human heterochromatin protein 1 isoforms regulate androgen receptor signaling in prostate cancer. *Mol Endocrinol*. 2013, in press (査読有)

#### 総説

1. Shiota M, Yokomizo A, Naito S. Increased androgen receptor transcription: a cause of castration-resistant prostate cancer and a possible therapeutic target. *J Mol Endocrinol*. 47:R25-41 2011 (査読有)
2. Shiota M, Yokomizo A, Fujimoto N, Naito S. Androgen Receptor Cofactors in Prostate Cancer: Potential Therapeutic Targets of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 11:870-81, 2011 (査読有)
3. Shiota M, Yokomizo A, Naito S. Oxidative stress and androgen receptor signaling in the development and progression of castration-resistant prostate cancer. *Free Radic Biol Med*. 2011, 51(7):1320-8 (査読有)
4. 横溝 晃, 内藤誠二. 術後再発に対する治療戦略. *日本臨床* 69 Suppl 5:399-40, 2011 (査読有)
5. 塩田真己, 横溝 晃, 藤本直浩, 内藤誠二. アンドロゲン受容体共役因子の異常. *日本臨床* 69 Suppl 5:108-11, 2011 (査読有)
6. 内藤誠二, 横溝 晃: 前立腺疾患の最近の潮流. *臨床と研究* 88(11): 1398-1402, 2011 (査読有)

7. 横溝 晃、内藤誠二、: 前立腺癌根治術後再発に対する治療. 臨牀と研究 88(11) : 1347-1350, 2011 (査読有)
8. 塩田真己、横溝 晃、内藤誠二: 去勢抵抗性前立腺癌の成因と新規治療の展望. 福岡医学雑誌 103: 91-97, 2012 (査読有)
9. 横溝 晃、内藤誠二. 前立腺癌に対する一次内分泌療法的重要性-GnRH アンタゴニスト・デガレリクスの臨床的意義-泌尿器外科 25(6) 1389-1395, 2012 (査読有)
10. Shiota M, Yokomizo A, Naito S. Pro-survival and anti-apoptotic properties of androgen receptor signaling by oxidative stress promote treatment resistance in prostate cancer. Endocr Relat Cancer. 19: R243-253, 2012 (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Yokomizo A, Shiota M, Eiji Kashiwagi, Kuroiwa K, Tatsugami K, Inokuchi J, Takeuchi A, Naito S. Statins Reduce the Androgen Sensitivity and Cell Proliferation by Decreasing the Androgen Receptor Protein in Prostate Cancer Cells. SIXTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HORMONAL ONCOGENESIS, 2010
- (2) Yokomizo A, Shiota M, Tada Y, Inokuchi J, Masubuchi D, Eto M, Naito S. The castration-induced oxidative stress makes prostate cancer cells castration resistant through Twist1 and androgen receptor overexpression. ANNUAL MEETING OF AMERICAN UROLOGICAL ASSOCIATION 2010
- (3) Yokomizo A, Shiota M, Kashiwagi E, Kuroiwa K, Tatsugami K, Inokuchi J, Takeuchi A, Naito S, Statins Reduce the Androgen Sensitivity and Cell Proliferation by Decreasing the Androgen Receptor Protein in Prostate Cancer Cells. ANNUAL EUROPEAN UROLOGICAL ASSOCIATION CONGRESS 2011.
- (4) Yokomizo A, Shiota M, Inokuchi J, Tatsugami K, Kuroiwa K, Fujimoto N, and Naito S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

Coactivator-1 Interacts with the Androgen Receptor (AR) and Promotes Prostate Cancer Cell Growth by activating the AR. ANNUAL MEETING OF AMERICAN UROLOGICAL ASSOCIATION 2011

- (5) Yokomizo A, Shiota M, Kashiwagi E, Takeuchi A, Fujimoto N, Uchiumi T, and Naito S. Peroxiredoxin 2 in nucleus and cytoplasm distinctly regulates androgen receptor activity in prostate cancer cells. ANNUAL EUROPEAN UROLOGICAL ASSOCIATION CONGRESS 2012.
- (6) 柏木英志、横溝晃、塩田真己、田中慎吾、猪口淳一、内藤誠二. 前立腺癌における Phosphodiesterase 4B と Protein Kinase A を介した去勢抵抗性の獲得機序. 前立腺シンポジウム 2011
- (7) 塩田真己、横溝晃、宋裕賢、武内在雄、柏木英志、内藤誠二. 前立腺癌治療抵抗性獲得機序の解明とその克服法の研究. 前立腺シンポジウム 2012

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横溝 晃 (YOKOMIZO AKIRA)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号 : 60346781

### (2) 研究分担者

黒岩顕太郎 (KUROIWA KENTARO)

九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号 : 90403964

### (3) 連携研究者

塩田真己 (SHIOTA MASAKI)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号 : 20635445