

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592328

研究課題名(和文)核内受容体・NF- $\kappa$ Bクロストークを標的とした去勢抵抗性前立腺癌に対する治療戦略研究課題名(英文)A novel treatment strategy for castration-refractory prostate cancer targeting cross-talk between NF- $\kappa$ B and an intranuclear steroid receptor superfamily

研究代表者

小中 弘之 (Konaka, Hiroyuki)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：40334768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌に対する新規治療法の確立には、再燃メカニズムの包括的解明は必要不可欠である。核内ステロイド受容体スーパーファミリーに属する、アンドロゲン受容体、グルココルチコイド受容体、エストロゲン受容体の転写系と転写因子NF- $\kappa$ Bのシグナル伝達系のクロストークという新たな観点から前立腺癌再燃メカニズムを解明した。また、そのクロストークを標的とした各種シグナル伝達阻害技術を駆使して、去勢抵抗性前立腺癌に対する集学的治療戦略を構築した。さらに、各核内受容体間における転写系シグナル伝達ネットワークの存在が明らかにされ、同クロストークはCRPCに対する新規標的治療となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Elucidating a comprehensive mechanism through which most patients with advanced prostate cancer have an initial response to androgen deprivation therapy, but eventually progress to a castration-resistant state is critical to establish a novel treatment strategy for castration refractory prostate cancer (CRPC). We investigate the mechanism of CRPC from the perspective of some cross-talks in signal transduction pathway between NF- $\kappa$ B and an intranuclear steroid receptor superfamily containing androgen receptor, glucocorticoid receptor, and estrogen receptor. Also we target the cross-talk with various methods of inhibiting the signaling transduction pathway and established the integrated treatment strategy of CRPC. Consequently, our study made it clear that cross-talk between NF- $\kappa$ B and an intranuclear steroid receptor superfamily might exist, and also suggested inhibiting the cross-talk of signaling pathway network might be novel therapeutics for the management of CRPC.

研究分野：腫瘍学

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：去勢抵抗性前立腺癌 核内受容体 NF- $\kappa$ B クロストーク アンドロゲン受容体 エストロゲン受容体  
 グルココルチコイド受容体 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌はその大部分がアンドロゲン依存的にアンドロゲン受容体(AR)を介して増殖するため、アンドロゲン除去(去勢)を根幹としたホルモン療法が有効である。進行性前立腺癌でも初期にはホルモン治療が約80%以上で有効であるが、その半数以上は5年以内にアンドロゲン非依存性となり再燃する。このような去勢抵抗性前立腺癌の予後は極めて不良であり、Docetaxel療法等を含め様々な治療が施行されても、ほとんどの症例は数年以内に死亡する。現在までの多数の基礎研究と、それに裏打ちされた創薬(GVAX, Abiraterone, MDV3100, Zibotentan等)にもかかわらず、去勢抵抗性前立腺癌の予後は未だ改善されず、新たな治療戦略の確立が待望されている。

去勢抵抗性前立腺癌に対する新規治療法を開発していく上で、再燃メカニズムの解明は必須である。従来からそのメカニズムとして、アンドロゲン非依存性に、1) ARを介する系と2) ARを介さない系に大別される。後者には、シグナル伝達系の亢進によって、ARの活性化を経由せずに細胞増殖が促進される経路が含まれるが、これまで我々はそのシグナル伝達系の1つとして、NF-κBに着目して研究をすすめてきた。NF-κBは転写因子の一つで、その活性化が癌細胞の増殖促進、アポトーシス抑制、血管新生誘導、転移浸潤能を引き起こすことが知られており、乳癌をはじめとして、肺癌、甲状腺癌、メラノーマ、膀胱癌、腎癌、大腸癌、白血病等の多くの悪性腫瘍において恒常的なNF-κB活性化が報告されている。

応募者は研究代表者として従事した過去の基盤研究(C)―「ホルモン非依存前立腺癌に対する遺伝子治療を根幹とした新たな集学的治療戦略の確立」(平成16-17年度)、「ホルモン不応性前立腺癌におけるNF-κB活性化の意義とその経路を標的とした治療戦略」(平成18-19年度)、「再燃前立腺癌におけるエストロゲン受容体を介したシグナル伝達機構の包括的解明」(平成20-22年度)―において、前立腺癌の再燃初期にNF-κB活性化が関与することを示すとともに、NF-κBとAR/NF-κBとGRのクロストークについても言及した。また、前立腺癌におけるGRおよびERの役割を明らかにし、GR、ERを標的とした遺伝子治療の可能性を示した。

これら成果の中で特に強調したいのは、恒常的なNF-κB活性化がアンドロゲン非感受性前立腺癌細胞株PC-3, DU145に認められたこと、アンドロゲン感受性前立腺癌細胞株LNCaPからアンドロゲンを除去することによってそれまで認められなかったNF-κB活性が亢進したことにある。すなわち、NF-κB活性化が去勢抵抗性前立腺癌の契機となる可能性が示唆された点にある。また、我々は、NF-κBの結合部位がPSAプロモーターのアンドロゲン応答配列(ARE)近傍に存在することを見出し、活性化されたNF-κBがARと拮抗することによって、ARを介するPSAの発現が抑制されることを報告した。(Biochem J. 2004)

以上の学術的背景から、去勢抵抗性前立腺癌の病態生理や悪液質において恒常的なNF-κB活性化が重要な役割を果たしており、NF-κB活性の阻害が去勢抵抗性前立腺癌に対する治療戦略の1つになりうる可能性が示唆される。

一方、前立腺癌に対するグルココルチコイド療法とエストロゲン療法は、従来から二次あるいは三次のホルモン療法としてその有用性は広く認識されてきた。その作用機序―Dexamethasone(DEX)をはじめとするグルココルチコイド製剤は、視床下部・下垂体に対する負のフィードバックによって下垂体からのACTH分泌を抑制し副腎由来アンドロゲンの産生を低下させる; Estradiol(E2)をはじめとするエストロゲン製剤は、視床下部・下垂体に対する負のフィードバックによって下垂体からのLH分泌を抑制しテストステロンの産生を低下させる―は、間接的な中枢作用によるものと考えられていた。また、DEXおよびE2による直接的な抗腫瘍効果も示唆されているが、それぞれの受容体であるGRおよびERを介する転写系に関しての前立腺癌における基礎研究は極めて少ない。

GRおよびERは、前立腺癌のアンドロゲン依存性に重要な役割を果たしているARと同様に、核内受容体スーパーファミリーに属し、リガンドであるステロイドホルモンと結合し、転写を活性化する一群の転写因子である。いずれもホモダイマーを形成し、標的遺伝子のプロモーター近傍のホルモン応答配列を認識し、さらに特異的リガンドと結合することで標的遺伝子の転写を活性化するという共通の作用機構をもつ。また、NF-κBはp65とp50とのヘテロダイマーであり、通常その核内移行シグナルをマスクする分子IκBαと結合して細胞質に存在することでその活性が抑制されている。何らかの刺激でIκBαがシグナル依存的にリン酸化を受け、ユビキチン化され、プロテソームによって分解されると、遊離したNF-κBは核内に移行し、標的遺伝子の転写活性化が誘導される。

これまでに、核内受容体とNF-κBに共通した共役因子が存在する可能性、ホルモン応答配列とκB応答配列が同一のプロモーター上に近接して存在する可能性、を想定したGRとNF-κBのクロストーク、あるいはERとNF-κBのクロストークに関する報告は前立腺癌以外の領域では散見されるが、去勢抵抗性前立腺癌における核内受容体とNF-κBとのクロストーク・核内受容体間のクロストークを包括的に解明した報告はない。

## 2. 研究の目的

過去の前立腺癌に関する基盤研究の成果を踏襲して、今回われわれは、核内受容体転写系とNF-κBのシグナル伝達系のクロストークという新たな観点から前立腺癌の再燃メカニズムを解明すると共に、そのクロストークを標的とした各種シグナル伝達阻害技術を検討し、去勢抵抗性前立腺癌に対する新たな包括的治療戦略を構築することを立案した。さらに、各核内受容体間

における転写系シグナル伝達ネットワークの存在を明らかにし、去勢抵抗性前立腺癌における AR, GR, ER 間クロストークの基礎的及び臨床的意義についても明らかにする。

去勢抵抗性前立腺癌における AR, GR, ER の発現プロファイルと NF- $\kappa$ B 活性のステータスを、前立腺癌細胞株と前立腺癌ヒト組織アレイを用いて解析する。次に以下の転写因子クロストーク — 1) AR と NF- $\kappa$ B, 2) GR と NF- $\kappa$ B, 3) ER と NF- $\kappa$ B, 4) AR と GR, 5) AR と ER — の詳細を解明する。さらに、去勢抵抗性前立腺癌に対する治療戦略として — 1) NF- $\kappa$ B 活性化を阻害する分子標的治療, 2) DEX 投与と GR 強制発現による遺伝子治療, 3) E2 投与と ER $\beta$ の強制発現による遺伝子治療 — を計画しており、in vitro, in vivo で検討を加え、その有用性を検討する。本研究の学術的な特色は、去勢抵抗性前立腺癌における再燃メカニズムの解明と新たな治療戦略の構築を第一義とし、核内受容体: AR, GR, ER とコピキチン・プロテアソーム系の代表分子である NF- $\kappa$ B に着目した点にある。また、核内受容体と NF- $\kappa$ B のクロストークのみならず、核内受容体間におけるクロストークの解析にまで踏み込んで、そのクロストークを標的とした治療戦略を確立することにある。去勢抵抗性前立腺癌において、転写制御機構の何らかの破綻が、しかるべきシグナル伝達系の亢進を惹起することで、その再燃に関与しうるとしたら、転写因子間のクロストークの解明は極めて意義深い。従来から前立腺癌の基礎研究においては、主要なアンドロゲンである dihydrotestosterone (DHT) に依存した AR 転写系の研究がゴールドスタンダードであるため、GR あるいは ER 転写系に関する研究は極めて少ない。従って、本研究のように AR のみならず GR, ER 転写系を再考し、クロストークという視点からの前立腺癌の基礎研究は極めて独創的かつ斬新である。

本研究から予想される結果と意義として、アンドロゲン除去による NF- $\kappa$ B 活性化の状況下、1) DEX/GR 転写系の亢進による NF- $\kappa$ B 活性化の抑制、2) E2/ER 転写系の亢進による NF- $\kappa$ B 活性化の抑制、が予想される。以上を踏まえた治療戦略として、まず NF- $\kappa$ B 阻害剤の使用が推奨される。また、DEX 投与による NF- $\kappa$ B 活性の抑制効果も期待した DEX と GR 発現ベクターを用いた遺伝子治療、さらに、ER $\beta$ による前立腺癌の増殖抑制も期待した E2 と ER $\beta$ 発現ベクターを用いた遺伝子治療、の有用性が示唆されれば、今後、去勢抵抗性前立腺癌治療における大きなブレイクスルーになりうると確信する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 核内受容体の発現プロファイル

アンドロゲン依存性前立腺癌株 LNCaP, アンドロゲン非依存性前立腺癌株 PC-3, DU145, 正常前立腺上皮細胞 PrEC, 正常前立腺間質細胞 PrSC, 乳癌細胞株(コントロール)を用いて、AR, GR, ER $\alpha$ および ER $\beta$ の発現プロファイルにつき、RT-PCR 法と Western-blot 法によって、mRNA とタンパク質レベルで調べる。また、癌化

ヒト組織アレイ Human Neoplastic Tumor Tissue Microarray シリーズ(タカラバイオ社)の前立腺版を用いて、核内受容体の発現を同様に解析する。

#### (2) 発現ベクターの構築

CMV プロモーターによって GR, ER $\beta$ がドライブされる発現ベクター: pCMV-GR と pCMV-ER $\beta$ を構築する。発現ベクターが機能するか調べるため、LNCaP 細胞に FuGENE6 を用いてプラスミドを一過性に導入後、GR, ER $\beta$ の mRNA, タンパクの発現をそれぞれ RT-PCR 法, Western-blot 法にて確認する。

#### (3) 核内受容体と NF- $\kappa$ B のクロストーク

DHT によって誘導される AR 転写活性, DEX によって誘導される GR 転写活性, あるいは E2 によって誘導される ER 転写活性が、NF- $\kappa$ B 転写活性を抑制するか否かを NF- $\kappa$ B プロモーター活性, Western-blot 法, 免疫染色を用いて調べる。逆に NF- $\kappa$ B 活性を誘導することによって AR, GR, ER 転写活性が抑制されるか否かについても、以前構築したレポータープラスミド: pGL3-ARE3-Luc, pGL3-GRE4-Luc, pGL3-ERE4-Luc を用いてルシフェラーゼアッセイにて検討する。

さらに、LNCaP 細胞における DEX あるいは E2 投与による PSA プロモーター活性を解析し、DEX あるいは E2 による AR 転写活性が抑制されるか否かを検討する。

#### (4) NF- $\kappa$ B の活性阻害による in vitro 殺細胞効果

いかにして NF- $\kappa$ B 活性を効率良く阻害するかを以下の方法で、以前樹立した LNCaP-SF 細胞(アンドロゲンフリーで培養可能)及び LNCaP- $\kappa$ B 細胞(p65 を強制発現)を用いて、in vitro における殺細胞効果を WST-assay にて比較検討する。

さらに、殺細胞効果が認められた細胞にアポトーシスが起きているか、Tunel assay あるいは Annexin-V assay にて解析する。

ドミナントネガティブ...IKK によって I $\kappa$ B $\alpha$ がリン酸化をうけるセリン 32 と 36 の部位をアラニンにかえた変異体タンパク SR-I $\kappa$ B $\alpha$ の発現ベクターを用い、I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化を阻害する。

デコイ... $\kappa$ B コンセンサス配列 NGGGGAMTTTCCNN を有する二本鎖 DNA を、M あるいは N の塩基を変えて数種類作製予定である。また、Gal4 コンセンサス配列 CGGAGTACTGTCCTCC を有する二本鎖 DNA を合成し、コントロールとして使用する。

siRNA...業者に委託して作製した数種類を実験に使用する。

プロテアソーム阻害薬... Bortezomib (Vercade<sup>TM</sup>) は、タンパクの制御において中心的な役割を担うコピキチン・プロテアソーム系を標的分子とした新規薬剤で、I $\kappa$ B $\alpha$ のプロテアソームによる分解を阻害することで NF- $\kappa$ B 活性化を抑制する。既に本邦でも多発性骨髄腫に対して臨床応用されている。また、実験用試薬として発売されている強力なプロテアソーム選択的阻

害剤: Epoxomicin も使用する。

なお、～ は、トランスフェクション試薬: FuGENE6 を用いて細胞導入し、については各種の濃度設定で培養液に添加する。

#### (5) SCID マウスを用いた担癌モデルの作成

LNCaP 細胞をマトリジェルと共に SCID マウスの背部皮下に移植し、皮下腫瘍の形成を確認後、除癌術を施行して腫瘍が再形成されたものを去勢抵抗性前立腺癌のモデルとして以下の実験に使用する。

#### (6) NF- $\kappa$ B 阻害薬による in vivo 抗腫瘍効果

担癌モデルに対して、プロテアソーム阻害薬: Bortezomib, Epoxomicin の腹腔内投与とドミナントネガティブ: SR-I $\kappa$ B $\alpha$  のアデノウイルスベクターの局所投与による in vivo 抗腫瘍効果を検討する。抗腫瘍効果は腫瘍のサイズを経時的に計測し、コントロールと比較検討することによって評価する。

#### (7) アデノウイルス発現ベクターの作製

既に構築した pCMV-GR, pCMV-ER $\beta$  プラスミドから CMV プロモーターと GR あるいは ER $\beta$  をインサートとして切り出し、コスミドベクターに挿入する。このコスミドと Eco T22I 処理を行った DNA-TPC を, E1A・E1B を恒常的に発現している 293 細胞へトランスフェクションして、ウイルス DNA とコスミド DNA との相同組み換えによりアデノウイルスベクター ( Ad-CMV-GR と Ad-CMV-ER $\beta$ ) を作製する。

#### (8) リガンド投与とアデノウイルスベクター局注による抗腫瘍効果

担癌マウスに Ad-CMV-GR あるいは Ad-CMV-ER $\beta$  を腫瘍内局注後、腹腔内に DEX あるいは E2 を投与して、in vivo 抗腫瘍効果を検討する。コントロールとして Ad-CMV-GFP を腫瘍内局注したマウスに GCs あるいは E2 を投与した群と比較検討する。

#### (9) 改良 PSA プロモーターを用いた癌特異的発現ベクター構築

前立腺癌特異的発現系を構築するために、我々は既に PSA プロモーター領域に修飾を加え、野性型の 3 倍以上のプロモーター活性を有する新たな XPSA プロモーターを構築済である。その下流に治療用遺伝子である GR あるいは ER $\beta$  を挿入し、同様に目的の組み換えアデノウイルスベクター ( Ad-XPSA-GR と Ad-XPSA-ER $\beta$ ) を作製する。担癌マウスの尾静脈からベクターを注射し、DEX あるいは E2 の腹腔内投与による抗腫瘍効果を検討する。

## 4. 研究成果

平成 23 年度は、核内受容体スーパーファミリーに属する、アンドロゲン受容体 (AR), グルコルチコイド受容体 (GR), エストロゲン受容体 (ER) の転写系と、転写因子 NF- $\kappa$ B のシグナル伝達系のクロストークという新たな観点から前立腺癌再燃メカニズムを解明すると共に、そのクロストークを標的とした各種シグナル伝達阻害技術を駆使して、去勢抵抗性前立腺癌に対する包

括的治療戦略を構築することを究極の目的のもと、前立腺癌における核内受容体の発現プロファイル、発現ベクターの構築、核内受容体と NF- $\kappa$ B のクロストーク、NF- $\kappa$ B の活性化抑制による殺細胞効果とし、主として in vitro での実験を計画した。AR, GR, ER を介した転写系と NF- $\kappa$ B シグナル伝達系の包括的解明に取り組んだ。

その結果、アンドロゲン依存性前立腺癌株 LNCaP, アンドロゲン非依存性前立腺癌株 PC-3, DU145, 正常前立腺上皮細胞 PrEC, 正常前立腺間質細胞 PrSC, 乳癌細胞株 (コントロール) における, AR, GR, ER および ER の発現プロファイルと、癌化ヒト組織アレイの前立腺癌版における核内受容体の発現を明らかにした。さらに、CMV プロモーターによって GR, ER がドライブされる発現ベクター (pCMV-GR と pCMV-ER) を構築した。

これは、これまでも基礎研究から臨床試験までに渡って去勢抵抗性前立腺癌に対する各種治療戦略の取り組みが精力的に検討されてきたにもかかわらず、必ずしも大きなブレイクスルーがなかったという背景において、去勢抵抗性前立腺癌に対する新たな治療法の開発に向けたプロログとして大変意義深いものである。

平成 24 年度は、ドミナントネガティブ、デコイ、siRNA, プロテアソーム阻害薬を用いた NF- $\kappa$ B 活性の阻害による in vitro 殺細胞効果の検討した。SR-I $\kappa$ B $\alpha$  の発現ベクターのトランスフェクションおよび Bortezomib の投与にて、LNCaP-SF の NF- $\kappa$ B 活性が抑制された。しかしながら、デコイでの抑制は不十分であった。今回、委託作製した siRNA でも同様であった。また、核内受容体と NF- $\kappa$ B のクロストークに関する検討では、NF- $\kappa$ B と GR, NF- $\kappa$ B と AR のクロストークの存在は示唆されたが、NF- $\kappa$ B と ER $\beta$  のクロストークの存在は明確ではなかった。

最終年度の平成 25 年度の実験内容は、SCID マウスを用いた担癌モデルの作成、NF- $\kappa$ B 阻害薬による抗腫瘍効果、アデノウイルスベクターによる抗腫瘍効果で、前年度までの in vitro 実験の結果を踏まえつつ、去勢抵抗性前立腺癌に対する分子標的治療あるいは遺伝子治療を試みた。担癌モデルは作成できたが、作成予定であったアデノウイルスベクター: Ad-CMV-GR と Ad-CMV-ER $\beta$ , および Ad-XPSA-GR と Ad-XPSA-ER $\beta$  は完成できなかった。担癌モデルに対するアデノウイルスベクター Ad-SR-I $\kappa$ B $\alpha$  の局所投与および Bortezomib の腹腔内投与において、いずれも in vivo における抗腫瘍効果が認められた。

以上より、アンドロゲン除去による NF- $\kappa$ B 活性化の状況下、1) DEX/GR 転写系の亢進による NF- $\kappa$ B 活性化の抑制、2) E2/ER 転写系の亢進による NF- $\kappa$ B 活性化の抑制、が示されたと共に、今後、NF- $\kappa$ B 活性を阻害する治療戦略が、去勢抵抗性前立腺癌治療における大きなブレイクスルーになりう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5件)

Repression of cell proliferation and androgen receptor activity in prostate cancer cells by 2'-hydroxyflavanone.  
Ofude M, Mizokami A, Kumaki M, Izumi K, Konaka H, Kadono Y, Kitagawa Y, Shin M, Zhang J, Keller ET, Namiki M.  
Anticancer Res. 2013 Oct; 33(10): 4453-61.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24123015>

Exogenous SPARC suppresses proliferation and migration of prostate cancer by interacting with integrin 1.  
Shin M, Mizokami A, Kim J, Ofude M, Konaka H, Kadono Y, Kitagawa Y, Miwa S, Kumaki M, Keller ET, Namiki M.  
Prostate. 2013 Aug; 73(11): 1159-70.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23532895>

Tri-Modality therapy with I-125 brachytherapy, external beam radiation therapy, and short- or long-term hormone therapy for high-risk localized prostate cancer (TRIP): study protocol for a phase III, multicenter, randomized, controlled trial.  
Konaka H, Egawa S, Saito S, Yorozu A, Takahashi H, Miyakoda K, Fukushima M, Dokiya T, Yamanaka H, Stone NN, Namiki M.  
BMC Cancer. 2012 Mar 22; 12:110.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439742>

Increases in bone turnover marker levels at an early phase after starting zoledronic acid predicts skeletal-related events in patients with prostate cancer with bone metastasis.  
Izumi K, Mizokami A, Itai S, Shima T, Shigehara K, Miwa S, Maeda Y, Konaka H, Koh E, Namiki M. BJU Int. 2012 Feb; 109(3): 394-400.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21599822>

What is appropriate neoadjuvant/adjuvant androgen deprivation for high-risk/locally advanced prostate cancer?  
Namiki M, Konaka H.  
Asian J Androl. 2011 Jul; 13(4): 624-5.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21642996>

〔学会発表〕(計1件)

Effect of adrenal androgens and HSD17B5 inhibitors on androgen receptor activity in prostate cancer microenvironment  
熊木 美紗子, 溝上 敦, 金 延任, 島 崇, 大筆光夫, 角野 佳史, 小中 弘之, 北川 育秀, 申 琨京, 並木 幹夫

第70回日本癌治療学会総会, 2011年10月3日~10月5日, 名古屋国際会議場(名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小中 弘之 (Konaka Hiroyuki)  
金沢大学・大学病院・講師  
研究者番号: 40334768

(2) 研究分担者

北川 育秀 (Kitagawa Yasuhide)  
金沢大学・大学病院・講師  
研究者番号: 0452102

角野 佳史 (Kadono Yoshifumi)  
金沢大学・大学病院・助教  
研究者番号: 10397218

京 哲 (Kyo Satoru)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号: 50272969