

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592352

研究課題名(和文) 前立腺癌における融合遺伝子とアンドロゲン応答機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of prostate cancer specific fusion genes and novel androgen dependent genes involved in prostate cancer growth

研究代表者

高橋 悟 (Takahashi, Satoru)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：50197141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：成果(1)アンドロゲン受容体の応答機構について網羅的に検討を行った。その中で新規アンドロゲン応答遺伝子であるARFGAP3がパキシリンと協調し、前立腺癌の増殖を促進していることが示された。(2)核内受容体協調因子であるOct1がアンドロゲン応答遺伝子AX3の転写活性化に重要であることを示し、前立腺癌の悪性度に影響を与えていることが示された。(3)AX3の発現を抑制する化合物を作製し検討した。遺伝子配列特異的に結合し、生体内での安定性が高いピロールイミダゾールポリアミドを用いた。(4)新規アンドロゲン応答遺伝子ARG1を見出し、機能解析に着手した。

研究成果の概要(英文)：(1) We identified ARFGAP3 as a primary androgen target genes that interacted with paxillin and enhanced androgen receptor (AR) activity in LNCaP cells. (2) Our previous chromatin immunoprecipitation combined with DNA microarray showed that the upstream region of AX3 includes a functional AR binding site, which was a putative AX3 enhancer. We found that two AR response elements (AREs) and one Oct1 binding site cooperatively regulate this putative AX3 enhancer in an androgen-dependent manner. (3) We developed novel synthetic pyrrole-imidazole (PI) polyamides targeting this Oct1 binding sites to control AX3 expression. Treatment of this polyamide showed suppressed AX3 mRNA expression and the proliferation of LNCaP cells. (4) We found the novel androgen responsive gene ARG1, and performed functional analysis for ARG1 works in prostate cancer.

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 アンドロゲン応答遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年食生活の欧米化、超高齢社会の到来に伴い、我が国において、前立腺癌による死亡者増加している。アンドロゲンレセプター (AR) は前立腺癌の進行増殖において重要な役割を担っている。また、AR はリガンド依存性核内受容体である。AR はリガンド (アンドロゲン) と結合後核内に移行し、AR 転写補助因子と協調しながら標的遺伝子の転写調節領域内の特定配列 (AR responsive elements; ARE) に結合し、標的遺伝子の発現を調節する。最近前立腺癌において、染色体再配列によりアンドロゲン応答遺伝子と癌原遺伝子 ETS family が融合し、癌の悪性度、アンドロゲン感受性が変化することが報告され、注目されている (Tomlins SA et al, Science 310:644-648, 2005)。TMPRSS2 の他にも ETS family と融合する幾つかのアンドロゲン応答遺伝子が報告されつつある。

我々は、クロマチン免疫沈降法を応用した網羅解析 (ChIP-chip) により、ヒトゲノム領域に新規の AR 結合部位を系統的に同定した (Takayama K et al, Oncogene 26:4453-4463)。同研究結果により、さまざまな新規アンドロゲン応答遺伝子が同定された。本研究においてすでに我々が前立腺癌細胞の細胞増殖能を亢進させていることを見出している新規アンドロゲン応答遺伝子 ARFGAP3 および新規アンドロゲン応答遺伝子群に着目し、前立腺癌における影響について、検討を行った。

2. 研究の目的

(1) 新規アンドロゲン応答遺伝子 ARFGAP3 に関係するタンパクを同定し、前立腺癌における影響を解析する。

(2) アンドロゲン応答遺伝子 AX3 の新たに見出された AR 転写調節領域のアンドロゲン応答機構を解析し、さらに前立腺癌細胞に与える影響を観察する。

(3) AX3 遺伝子を抑制させる新規化合物を開発し、前立腺癌新規治療薬の可能性について検討した。

3. 研究の方法

(1) AR を発現している前立腺癌細胞株 LNCaP を用い、ARFGAP3 安定発現細胞を作成。同細胞よりタンパクを抽出し、ARFGAP3 と関連のあるタンパクを同定する。

(2) 前立腺全摘によって摘出された前立腺組織内におけるアンドロゲン応答遺伝子 AX3 の発現を検討する。

(3) ChIP-chip 法で同定された AX3 の新規アンドロゲン結合領域内を配列解析ソフト TRANSFAC とルシフェラーゼアッセイを用いて、アンドロゲン活性に影響を与えている配列を同定し、生体内で安定性が高く、配列特異的に結合できる化合物ピロールイミダゾールポリアミドを用いて、同遺伝子を制御する新規薬剤を作成し、その効果を検討する。

(4) ChIP-chip 法で同定された未解明の新規アンドロゲン応答遺伝子 ARG1 (Androgen responsive gene; ARG1) の機能解析に着手する。

4. 研究成果

(1) 我々は既に ARFGAP3 が細胞遊走能を亢進させる事を見出しており、そこで細胞遊走能に関連するパキシリンと ARFGAP3 との結合を検討した。抗パキシリン抗体を用いた免疫沈降と蛍光免疫染色で、ARFGAP3 はパキシリンと結合することが認められた。パキシリンは AR の転写活性を増強させる作用があることが過去の報告にあり、レポーター遺伝子とともに ARFGAP3 とパキシリンを発現させ、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、それぞれの発現でアンドロゲン応答性の転写活性が増強するのみならず、共発現において最も活性の増強を示した。本検討において、ARFGAP3 はパキシリンとの結合を認め、さらにパキシリンの細胞内再配置に関わり、その機能を活性化していることが考えられた。網羅解析の結果、ARFGAP ファミリーで ARFGAP3 のみ強いアンドロゲン応答性を認めたことから、前立腺癌において、ARFGAP3 が ARFGAP ファミリーの中で一番、浸潤能に影響を与えていると考えられた。パキシリンは過去の報告において、AR の転写活性を増強させることが示唆されており、細胞遊走能の亢進、および AR の転写活性増強による前立腺癌細胞増殖亢進に影響を与えていることが示唆された。

(2) 前立腺癌検体 55 例における AX3 の発現を調べたところ、有意に癌部で発現が増強していた。

(3) 前立腺癌細胞株 LNCaP を用いて ChIP-chip 法で同定した AX3 のエンハンサー領域内の配列について、AR 応答に必須の配列の同定を試みた。同領域内には AR 結合配列が 2 カ所認められ、さらに同配列の近傍に存在する転写協調因子 Oct1 結合配列が重要な影響を及ぼしていることが認められた。そこで、同配列に特異的な PI ポリアミドを設計し、開発した。まず、ゲルシフトアッセイにて標的配列への特異的結合能を確認後、LNCaP 細胞に投

与し、効果を検討した。LNCaP にポリアミドを投与し、コントロールと比較したところ、有意に AX3 の発現抑制と、細胞増殖能ならびに遊走能の低下が認められた。

続いて雄ヌードマウスの右腋窩に LNCaP を接種し、一定のサイズまで増大した事を確認後、週一回経静脈的に PI ポリアミドの投与を行い、腫瘍サイズを測定した。投与開始から 4 週間後に評価したところ、コントロールと比べ、有意に腫瘍サイズの縮小が得られた。また、PI ポリアミド投与によるヌードマウスの死亡は認められなかったことより安全性が高く、有効な薬剤であることが考えられた。上記結果より、設計した PI ポリアミドは前立腺癌の予防、治療に有用かつ安全で安定したマテリアルになり得る可能性が示唆された。

(4)LNCaP を用いて新規アンドロゲン応答遺伝子 ARG1 の検討を行った。まず、アンドロゲン刺激を行い、ARG1 の発現変化を RT-qPCR ならびにウエスタンブロットを行ったところ、アンドロゲン依存性に発現の増加が認められた。細胞遊走能ならびに細胞増殖能への影響について、同遺伝子を抑制させる siRNA を用いて現在解析中である。

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)

1. Obinata D, Takayama KI, 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. International journal of cancer. Int J Cancer, 130:2240-8, 2012. 査読あり
2. 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 and its targeted gene CYP3A4 in human prostate cancer. Cancer Sci, 103:176-80, 2012. 査読あり
3. Murata T, Takayama K, Urano T, Fujimura T, Ashikari D, Obinata D, Horie-Inoue K, Takahashi S, Ouchi Y, Homma Y, Inoue S. 14-3-3zeta, a novel androgen-responsive gene, is upregulated in prostate cancer and promotes prostate cancer cell

proliferation and survival. Clin Cancer Res, 18:5617-27, 2012. 査読あり

[学会発表](計6件)

1. 大日方大亮, 高山賢一, 藤原恭子, 伊藤 亜希子, 芦荻大作, 村田保貴, 浦野友彦, 福田 昇, 井上聡, 高橋悟: 転写協調因子を抑制することにより脂質代謝遺伝子を標的とする前立腺癌新規治療薬の開発. 第 23 回泌尿器科分子・細胞研究会, 山形, 2014 年 3 月 15 日
2. Daisuke Obinata, Kyoko Fujiwara, Kenichi Takayama, Tomohiko Urano, Hiroki Nagase, Noboru Fukuda, Masayoshi Soma, Satoshi Inoue, Satoru Takahashi: The efficacy of Pyrrole-imidazole (PI) polyamide targeted to TMPRSS2 and ERG gene fusion for prostate cancer. The 18th Korea-Japan Cancer Research Workshop, Gifu, 2013.11.30
3. 大日方大亮, 藤原 恭子, 伊藤 亜希子, 村田 保貴, 芦荻大作, 山口 健哉, 高山 賢一, 浦野 友彦, 藤村 哲也, 福田 昇, 永瀬 浩喜, 相馬 正義, 井上 聡, 高橋 悟: ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドを用いた、前立腺癌新規遺伝子治療薬の開発. 第 14 回ホルモンと癌研究会, 東京, 2013 年 7 月 12 日
4. Satoru Takahashi: Androgen receptor signaling pathways in prostate cancer. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, 金沢, 2012 年 11 月 17 日
5. Obinata D, Takayama K, Urano T, Takahashi S, Inoue S: Oct1 positively regulates the androgen-upregulated gene AX3, a 5'-translocation partner of ETV1, with androgen receptor in human prostate cancer. 第 70 回日本癌学会学術総会, 愛知, 2011 年 10 月 3 日
6. Daisuke Obinata, Ken-ichi Takayama, Tomohiko Urano, Taro Murata, Jinpei Kumagai, Tetsuya Fujimura, Kazuhiro Ikeda, Kuniko Horie-Inoue, Satoru Takahashi, Satoshi Inoue: OCT1 COORDINATELY REGULATES ANDROGEN RECEPTOR AND IS A PROGNOSTIC FACTOR FOR PROSTATE CANCER. Moderated Poster Session. AUA, Washington DC, USA, May 15, 2011

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：新規 P I ポリアミド
発明者：大日方大亮，高橋悟，藤原恭子，井上聡，高山賢一
権利者：日本大学
種類：特許
番号：特願 2013-48126
出願年月日：2013 年 3 月 11 日
国内外の別： 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 悟(TAKAHASHI SATORU)
日本大学・医学部・教授
研究者番号：50197141

(2)研究分担者

山口 健哉(YAMAGUCHI KENYA)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号：00297813

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

咲間 隆裕 (SAKUMA TAKAHIRO)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：90570739