

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659761

研究課題名（和文） ホルモン療法抵抗性前立腺癌の分子基盤の解明

研究課題名（英文） Androgen receptor mutation in androgen-independent prostate cancer

研究代表者

松本 高広 (MATSUMOTO TAKAHIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：70447374

研究成果の概要（和文）：ホルモン療法に抵抗性を示す前立腺癌に高頻度で見られるアンドロゲン受容体（AR）点変異体（T877A）をマウス前立腺上皮細胞に導入したノックインマウスを作成し、前立腺腫瘍の発癌と増悪に対する影響を検討した。その結果、AR点変異は癌増悪に強く関与していることが明らかとなった。次に、各種遺伝子欠損ヘテロマウスとの遺伝学的相互作用を検討した結果、新たな前立腺癌増悪因子として Wnt-5a を同定した。ヒト前立腺癌検体を用いた解析により、Wnt-5a は多くの前立腺癌で発現が上昇していることが明らかとなり、ホルモン療法耐性前立腺癌においてAR点変異体はWnt-5aシグナルとのクロストークにより、癌増悪を促進している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Prostate cancer development is associated with hyperactive androgen signaling. However, the molecular link between androgen receptor (AR) function and humoral factors remains elusive. A prostate cancer mouse model was generated by selectively mutating the AR threonine 877 into alanine in prostatic epithelial cells through Cre-ERT2-mediated targeted somatic mutagenesis. Such AR point mutant mice (AR<sup>pe-T877A/Y</sup>) developed hypertrophic prostates with responses to both an androgen antagonist and estrogen, although no prostatic tumor was seen. In prostate cancer model transgenic mice, the onset of prostatic tumorigenesis as well as tumor growth was significantly potentiated by introduction of the AR T877A mutation into the prostate. Genetic screening of mice identified Wnt-5a as an activator. Enhanced Wnt-5a expression was detected in the malignant prostate cancers of patients, whereas in benign prostatic hyperplasia such aberrant up-regulation was not obvious. These findings suggest that a noncanonical Wnt signal stimulates development of prostatic tumors with AR hyperfunction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：アンドロロジー

0%を占める頻度の高い癌であり、日本においても食生活の欧米化に伴い、その発症頻度は急激に上昇している。前立腺癌の多くはアンドロゲン感受性癌であり、その発症及び進展にアンドロゲン作用が深く関わっている。前立腺癌の病態は段階的に進行し、当初アンドロゲン依存性に増殖するため、抗アンドロゲン剤やLH-RHアナログを用いたホルモン療法が有効である。しかしながら、こうしたホルモン療法は初期の段階では有効であるが、やがてアンドロゲン依存性の消失に至る例が大多数を占める。

## 2. 研究の目的

アンドロゲン非依存性癌病変部位において現在までに多くのアンドロゲン受容体(AR)変異が報告されており、その変異はARリガンド結合領域(LBD)に集中している。中でも特にホルモン抵抗性を示す前立腺癌では、LBDに位置するThr877がAlaに点変異することが多く見られ、アンドロゲン非依存性癌の発症・進展への関与が推測される。X線結晶構造解析により、AR点変異(T877A)は、LBDのHelix11に位置し、点変異体のLBDは、野生型と比較して疎水性ポケットが広がっていることが報告されている。また、ART877A点変異体を用いたin vitro解析から、リガンドの特異的結合にはコドン877のThr残基が必要であり、この点置換変異によるLBDの構造変化がリガンド認識特異性を低下させ、抗アンドロゲン剤や他種ステロイドホルモンへの応答性を獲得することが示唆されている。しかしながら、実際の生体内においてART877A点変異体によるリガンド認識性の低下が癌化の原因であるか結果であるかは全く不明である。また、点変異によるAR機能亢進に加え、前立腺上皮細胞及び間質細胞から分泌される液性因

子も前立腺癌の進行を促進することがin vitro解析により明らかにされているが、実際の生体内における液性シグナルと前立腺癌の進展との機能的関連は不明である。そのため、アンドロゲン非依存性前立腺癌の発症機序と腫瘍形成に寄与するシグナル伝達相互作用因子の解明には、このAR点変異体の機能解明は格好のモデルと考えられる。本研究では、ヒト型AR点変異体導入マウスを確立し、前立腺癌の進行に関与するシグナル伝達相互作用因子の取得をめざした。

## 3. 研究の方法

ヒト型AR遺伝子点変異導入floxedマウスの作出のため、マウスAR遺伝子座に、ヒト型AR点変異体LBD cDNAを導入した以下のターゲティングベクターを作製した。ヒトAR LBD(WT)をコードするエクソン6~8のcDNAの3'下流にヒトAR点変異体をコードするエクソン6~8の変異体cDNAを接続し、さらにヒト型AR LBD cDNA断片の前後にloxP配列を二カ所導入した。定法によりヒト型AR遺伝子点変異ノックインfloxedマウスを作出し、時期誘導性(tamoxifen誘導性)の前立腺上皮細胞特異的Cre(PSA-Cre-ERT2)トランスジェニックマウスとの交配により前立腺上皮特異的AR点変異導入(AR<sup>pe-T877A/Y</sup>)マウスを作出した。前立腺の形成および前立腺癌の発症に対する抗アンドロゲン剤や他種ステロイドホルモン投与の効果を検討した。これらAR点変異導入マウスをSV40-T antigenを前立腺に過剰発現させることにより前立腺癌を自然発症するTRAMPマウスと交配することにより、前立腺癌増悪に対するAR点変異の役割を検証した。

## 4. 研究成果

前立腺の腺管構造は経時的に増大し、16週齢には前立腺過形成に至ることが判明した。次に各種ステロイド剤に対する前立腺応答を検討した結果、AR<sup>pe-T877A/Y</sup> 前立腺はエストロゲンのみならず抗アンドロゲン剤である hydroxyflutamide に対しても応答性を示し、前立腺発達が亢進することが明らかとなった。このように、AR<sup>pe-T877A/Y</sup> マウスにおいて抗アンドロゲン並びに他種ステロイドホルモンのアンドロゲン様作用が確認されたことから、AR 点変異体のリガンド認識特異性低下に起因した生体内での AR 点変異体の機能亢進が証明された。一方、AR<sup>pe-T877A/Y</sup> マウスは前立腺過形成を呈するものの、1年齢になっても腫瘍形成には至らなかったことから、AR 点変異体は発癌には必須ではないことが示唆された。

AR<sup>pe-T877A/Y</sup> マウス単独では前立腺癌発症を示さないことから、次に AR 点変異体の癌進行・増悪への寄与を検討した。SV 40-T antigen を前立腺に過剰発現させることにより前立腺癌を発症する TRAMP マウスと AR<sup>pe-T877A/Y</sup> マウスの交配により得られた TRAMP -AR<sup>pe-T877A/Y</sup> マウスでは TRAMP マウスに比べ、より早期に前立腺癌を発症することが判明した。また、TRAMP -AR<sup>pe-T877A/Y</sup> マウスでは、癌増悪の進行度も速く、36週齢前後にはすべてのマウスが死に至ることが明らかとなった。この AR<sup>pe-T877A/Y</sup> マウスで観察される癌増殖が自律的に進行するか否かを明確にするため、TRAMP -AR<sup>pe-T877A/Y</sup> マウスの前立腺中葉をヌードマウスへ移植したところ、ヌードマウス移植化においても AR 点変異体により前立腺癌進行が加速し、移植後8週で約3倍の腫瘍重量に達することが明らかとなった。

AR 点変異導入前立腺癌において、局所的に分泌される成長因子またはサイトカイン

とのクロストークによって腫瘍進行が助長される可能性が予測された。そこで、前立腺に対し成長作用を有することが知られている候補因子群 (Fgf10、Stat3、Tab2、Wnt-5a) と TRAMP -AR<sup>pe-T877A/Y</sup> マウスとの遺伝学的相互作用を検討した。その結果、Wnt-5a ヘテロ欠損をバックグラウンドにもつ Wnt-5a<sup>+/-</sup> TRAMP -AR<sup>pe-T877A/Y</sup> マウスでは TRAMP -AR<sup>pe-T877A/Y</sup> マウスで観察される腫瘍増殖が抑制されることが判明した。

Wnt-5a は  $\beta$ -catenin/TCF を介さない non-canonical Wnt シグナル経路に分類され、PKC、CamK II、JNK 等のシグナル分子を活性化する。実際のヒト前立腺癌組織を用いて Wnt-5a の発現パターンを解析したところ、多くの前立腺癌サンプルにおいて Wnt-5a の高発現が確認された。こうした Wnt-5a 発現の亢進は前立腺肥大組織では認められなかったことより、Wnt-5a は AR 点変異誘導腫瘍増殖の活性化因子である可能性が示された。

## 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4件)

① Matsumoto T., Sakari M., Okada M., Yokoyama A., Takahashi S., Kouzmenko A., Kato S.. The androgen receptor in health and disease. *Annu Rev Physiol* 査読有, 75, 201-224 (2013)

DOI:10.1146

② Takahashi S., Watanabe T., Okada M., Inoue K., Ueda T., Takada I., Watabe T., Yamamoto Y., Fukuda T., Nakamura T., Akimoto C., Fujimura T., Hoshino M., Imai Y., Metzger D., Miyazono K., Minami Y., Chambon P., Kitamura T., Matsumoto T., Kato S. Noncanonical Wnt signaling mediates androgen-dependent tumor growth in a mouse model of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 査読有, 108, 4938-4943 (2011)

DOI:10.1073

③ **Matsumoto T**, Inoue K and Kato S. Genetic impact of both sex hormones in male-typical behaviors. *Adv Exp Med Biol* 査読有,707, 125-126 (2011)  
DOI:10.1007/978

④ Murashima A, Miyagawa S, Ogino Y, Nishida-Fukuda H, Araki K, **Matsumoto T**, Kaneko T, Yoshinaga K, Yamamura K, Kurita T, Kato S, Moon AM and Yamada G. Essential roles of androgen signaling in wolffian duct stabilization and epididymal cell differentiation. *Endocrinology* 査読有, 152, 1640-1651 (2011)  
DOI:10.121

〔学会発表〕(計5件)

① (招待講演) **Matsumoto T** Non-canonical Wnt signaling links to AR mutation to prostate cancer. 15<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer 2012.11.17 Ishikawa Ongakudo, (石川県)

② (招待講演) **Matsumoto T** Androgen receptor function in male and female physiology & behavior. 6<sup>th</sup> JAPAN-ASEAN Conference on Men's Health & Aging 2011 2011.7.2 Kenchoji and Kamakur Ponce Hotel, (神奈川県)

③ (招待講演) **松本高広** 「更年期疾患に寄与するアンドロゲン中枢作用」、第99回日本泌尿器科学会総会メンズヘルスセミナー 2011年4月23日、名古屋国際会議場(愛知県)

④ (招待講演) **松本高広** 「ステロイド受容体群を介した性ホルモンの抗不安作用」、第19回日本ステロイドホルモン学会学術集会 2011年11月26日、福岡大学(福岡県)

⑤ (招待講演) **松本高広** 「ステロイド受容体群を介した性ホルモンの抗不安作用」、第84回日本内分泌学会学術総会 2011年4月21日、神戸国際会議場(兵庫県)

〔図書〕(計2件)

① **松本高広**、加藤茂明 「ホルモン療法耐性前立腺がんモデルマウスを用いた前立腺がんの増殖亢進の分子メカニズムの解明および創薬研究」 遺伝子医学 MOOK、メディカル ドウ社 p242-248 (2012)

② 加藤茂明、**松本高広** 「卵胞形成と核内アンドロゲンレセプター」 卵子学、京都大学学術出版会、p155-164 (2011)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 高広 (MATSUMOTO TAKAHIRO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授  
研究者番号：70447374

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：