

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 21 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590474

研究課題名(和文) 内因性アンドロゲンによる去勢抵抗性前立腺がんの発症機序

研究課題名(英文) Mechanism of castration-resistance in prostate cancer via intratumoral steroidogenesis

研究代表者

右田 敏郎 (Migita, Toshiro)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・研究員

研究者番号：20462236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脂質代謝酵素群の一つであるACSL3は脂肪滴の産生以外にも様々な役割を持つ。ACSL3を前立腺がん細胞に過剰発現、または発現抑制させると、内因性アンドロゲンを合成する酵素群の発現が有意に変動した。ACSL3は去勢抵抗性前立腺がん細胞株において発現が高く、副腎性アンドロゲンで細胞を刺激すると精巣性アンドロゲンの有意な上昇とともに増殖能の亢進が見られた。以上から、ACSL3は副腎性アンドロゲンから精巣性アンドロゲンを合成する酵素群の発現を促進し、腫瘍内のアンドロゲン濃度を維持することにより、去勢抵抗性を獲得していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Long-chain acyl-coenzyme A (CoA) synthetase 3 (ACSL3) is one of de novo lipogenic enzymes, and is involved in diverse cellular processes as well as lipid droplet formation. ACSL3 overexpression or suppression modulated the expression of enzymes that stimulates the testosterone synthesis from adrenal androgen. Castration-resistant prostate cancer (LTAD) cells had high levels of both ACSL3 and the steroidogenic enzymes. Stimulation by exogenous adrenal androgen increased levels of intracellular testosterone and dihydrotestosterone (DHT) in LTAD cells, associated with a significant increase in cell growth. These findings suggest that ACSL3 contributes to castration-resistant growth of prostate cancer through maintaining intratumoral androgen levels by stimulating androgen synthesis from adrenal androgen.

研究分野：腫瘍学

キーワード：ACSL3 去勢抵抗性前立腺がん 脂質代謝酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) 外因性の脂質に依存せずに脂肪酸合成を行う代謝を de novo 脂肪酸合成という。がん細胞はグルコースをエネルギー源とする解糖系が亢進している。我々は、がん細胞が旺盛な解糖系を利用して de novo 脂肪酸合成を活性化させており、de novo 脂肪酸合成は様々ながん種の治療標的となることを報告してきた。

(2) 前立腺がんは精巣由来のアンドロゲンを生体から除去すると細胞死を来すことが知られているが、いずれアンドロゲン非依存性に再増殖するようになる(去勢抵抗性)。最近、アンドロゲン除去後においても腫瘍内のアンドロゲン濃度は維持されていることやアンドロゲンレセプターも活性化されていることがわかってきた。しかし、この腫瘍内のアンドロゲン濃度の維持メカニズムは不明のままである。

(3) 今回、de novo 脂質代謝酵素の一つで、脂肪酸からアシル CoA を合成する酵素、Acyl-CoA synthetase 3(ACSL3)に注目し、前立腺がんにおける生物学的役割、特にアンドロゲン非依存性増殖への関与について調べた。

2. 研究の目的

前立腺がんにおける ACSL3 の脂質代謝、アンドロゲン代謝への影響を調べ、前立腺がんにおける役割、特にアンドロゲン非依存性増殖への関与について調べる。

3. 研究の方法

(1) ACSL3 の過剰発現細胞の作製。ACSL3 をクローニングし発現ベクターを作製。アンドロゲン依存性前立腺がん細胞株 LNCaP に過剰発現させ、安定発現株を得た。

(2) ACSL3 の RNAi による発現抑制。ACSL3 に対する 3 種類のオリゴを化学的に細胞内

に導入し、mRNA 発現を抑制した。

(3) 遺伝子発現プロファイルの作製。過剰発現細胞と発現抑制細胞から RNA を抽出し、cDNA 合成後にマイクロアレイで網羅的遺伝子発現解析を行った。

(4) Real-time PCR とウェスタンブロットによる遺伝子やタンパク発現レベルの解析。細胞から RNA とタンパクを抽出し、それぞれの発現レベルを Real-PCR とウェスタンブロットで調べた。

(5) 液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) によるテストステロン(T)、ジヒドロテストステロン(DHT)の測定。細胞とその培地を回収した後、エチル酢酸などにてステロイドを抽出し、液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) にて T, DHT を定量した。

(6) ミトコンドリア活性の測定による細胞増殖能の測定。様々な条件下で細胞を培養した時の増殖能をマイクロプレートリーダーで比較した。

4. 研究成果

(1) ACSL3 はアンドロゲン応答性のある前立腺がんで過剰発現している。前立腺がん細胞株である LNCaP (アンドロゲン感受性), PC3, DU145(ともにアンドロゲン非感受性) について、ACSL のアイソザイム ACSL1, ACSL3, ACSL4, ACSL5, ACSL6 の内因性発現量をリアルタイム PCR 法で調べた。LNCaP では ACSL3 の発現が一番多く、次いで ACSL1 が多かった。PC3, と DU145 では ACSL3 と ACSL4 の量が多かった。次に、ACSL のアンドロゲン応答性を調べると LNCaP においてのみ ACSL3 のアンドロゲン応答性がみられた。公共のデータベースで前立腺がんにおける ACSL3 の発現量を調べると正常組織よりも有意に発現が高かった。

(2) ACSL3 の過剰発現により細胞内の脂肪滴が増加する。 ACSL3 を前立腺がん細胞株に過剰発現させると細胞質内に多量の脂肪滴が出現していた。ACSL3 の局在を共焦点顕微鏡で確認すると、小胞体膜、ミトコンドリア膜、脂肪滴の膜に存在することがわかった。

(3) ACSL3 はアンドロゲン受容体の下流遺伝子の発現を制御する。 ACSL3 の過剰発現細胞株とノックダウン細胞を作製し、それぞれから RNA を抽出し、遺伝子発現レベルをマイクロアレイにて網羅的に解析した。その結果、有意に発現が変動していた遺伝子群にはアンドロゲン受容体によって制御される遺伝

子が多く含まれていて (左

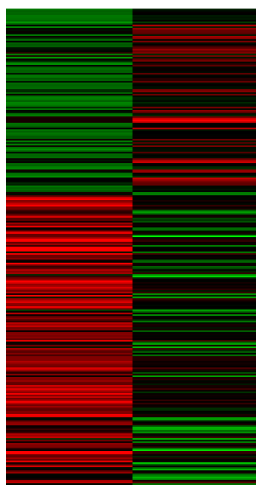


図) リアルタイム PCR で調べると TMPRSS2、KLK3 の発現量はコントロール株に比べて ACSL3 の過剰発現株では有意に上昇していた。

(4) ACSL3 の過剰発現はステロイド合成に関わる遺伝子の発現を上げる。 上記のマイクロアレイの結果では、ステロイド代謝、特にアンドロゲン合成に関わる遺伝子の発現の有意な上昇とアンドロゲンの不活化に関わる酵素群の低下が見られた。よって、ACSL3 は外来性アンドロゲンの欠乏下でも細胞内のアンドロゲン量を維持していることが示唆された。

(5) 前立腺がん組織では ACSL3 の発現はステロイド合成酵素の発現と正の相関を示し、

アンドロゲン不活化酵素と逆相関する。 前立腺がん組織の同一部位の連続切片にて ACSL3 と上記の酵素の発現量を免疫組織化学にて解析した。ACSL3 の発現とステロイド合成酵素の発現は共発現していたが、アンドロゲン不活化酵素とは相反していた。発現量を半定量するとそれぞれ有意な正の相関と負の相関が見られた。

(6) ACSL3 を過剰発現させた細胞は副腎性アンドロゲン刺激によりアンドロゲン産生量と細胞増殖が促進される。 ACSL3 は内因性のアンドロゲン合成を促進していたため、副腎由来のアンドロゲンに対する前立腺がん細胞の内因性アンドロゲン産生量と細胞増殖への影響を調べた。その結果、ACSL3 を過剰発現した細胞はコントロール細胞に比べて、副腎性アンドロゲン刺激にてテストステロンとジヒドロテストステロンの産生量が促進された。これに伴い、TMPRSS2 の発現も有意に上昇した。さらに、細胞増殖能も ACSL3 を過剰発現した細胞はコントロール細胞に比べて、有意に促進された。

(7) ACSL3 とステロイド合成に関わる分子は去勢抵抗性前立腺がん細胞株で高発現している。 アンドロゲン依存性のある前立腺がん細胞株からアンドロゲン除去培地で長期培養して得たアンドロゲン非依存性細胞株(去勢抵抗性前立腺がん細胞株)を用いて、ACSL3 の発現レベルを調べた。その結果、ACSL3 の発現はコントロール細胞株よりも非依存性細胞株の方が有意に高かった。ACSL3 の発現は公共データベースでは前立腺がんのホルモン感受性例よりホルモン耐性例の方が高く、また、化学的がん非再発例よりも再発例の方が高かった。次にアンドロゲン合成系酵素群の発現に関しては、ACSL3 過剰発現細胞と同様、アンドロゲン非依存性細胞株もアンドロゲン合成系酵素群の有意な上昇とアン

ドロゲン不活化酵素の有意な低下を認めた。最後に、アンドロゲン非依存性細胞株は副腎由来のアンドロゲン刺激により有意に細胞増殖能が促進された。

(8) ACSL3 の過剰発現はアシル CoA の産生を促進し、代謝に関わる転写因子の発現を上昇させる。 ACSL3 がどのような脂肪酸をアシル化しているのかを調べるために、質量分析を用いて細胞内の脂質分析を行った。ACSL3 の過剰発現細胞はコントロール細胞に比べて、炭素数 12 から 20 個を持つアシル CoA が有意に増加していた。

そこで、アシル CoA により活性が調節される一つの転写因子に注目した。この転写因子は特にステロイド合成に関連する酵素群の発現を調節する。そこで、この転写因子を LNCaP に過剰発現、ノックダウンした時の上記のステロイド合成と不活化に関わる酵素の発現量の変化を調べた。その結果、この転写因子の過剰発現は ACSL3 過剰発現細胞で見られた結果と同様に、ステロイド合成酵素の発現上昇と不活化酵素の発現抑制が見られた。また、ノックダウンではこれと逆の発現量の変化を確認できた。

以上、今回の結果をまとめると、ACSL3 はアンドロゲン応答性の脂質合成酵素であり、前立腺がんが発現が亢進していた。また、ACSL3 はアンドロゲン非依存性前立腺がんにおいても過剰発現していた。ACSL3 を強制発現するとステロイド合成系酵素の発現上昇とアンドロゲン不活化酵素群の発現低下が見られた。副腎性アンドロゲンを投与すると、ACSL3 過剰発現細胞ではアンドロゲン産生量が増加し、ACSL3 過剰発現細胞とアンドロゲン非依存性細胞はそれぞれのコントロール細胞よりも細胞増殖が促進された。ACSL3 が合成するアシル CoA は、ある転写因子の活性化に関わるが、この転写因子がステ

ロイド合成系酵素とアンドロゲン不活化酵素群の発現を調節することで前立腺がんの去勢抵抗性、アンドロゲン非依存性増殖に関わっていることが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 73 回日本癌学会、2014 年、右田敏郎、高山賢一、大日方大介、池田和貴、浦野友彦、高橋悟、曾我朋義、井上聡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

右田 敏郎 (MIGITA, Toshiro)
がん研究会・がん化学療法センター・分子生物治療研究部・客員研究員
研究者番号：20462236

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：