

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592402

研究課題名(和文) ホルモン耐性前立腺癌に対する核内受容体転写共役機構の解析と新規分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Analysis of the nuclear receptor transcription conjugate mechanism for the hormone-resistant prostate cancer and development of the new molecular target treatment

研究代表者

橋本 良博(hashimoto, yoshihiro)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40244561

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)：核内受容体転写共役因子SRC-3によって制御される遺伝子として増強された遺伝子は細胞周期制御因子としてサイクリンD2、E2、M4、T2、CDC25A、AKTシグナル系としてIGF-<sup>1</sup>、IGF-<sup>2</sup>、IRS-1、IRS-2、PIK3CA、AKT1、NFκBシグナル系としてBIRC2、BIRC3、GADD45Bが各々認められた。

細胞周期制御因子であるサイクリンEとCDC25Aはアンドロゲン受容体、SRC-3、PI3K/AKT/mTOR経路関連遺伝子に対する結合能だけでなくプロモーター転写活性も認められ、前立腺癌のホルモン耐性機構獲得への関与と分子標的治療への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：As our analysis result, cyclin D2, E2, M4, T2 and CDC25A for cell cycle regulator and IGF-1, IGF-2, IRS-1, IRS-2, PIK3CA and AKT1 for AKT signal system and BIRC2, BIRC3 and GADD45B for NFκB signal system were recognized as genes controlled by nuclear receptor transcription conjugate factor SRC-3.

As for cyclin E and CDC25A of cell cycle regulator, not only the binding capacity but also the promoter transcription activity was recognized for androgen receptor, SRC-3 and PI3K/AKT/mTOR-related factor, and can expect participation in hormone-resistant mechanism acquisition of the prostate cancer and application to molecules target treatment.

研究分野：外科系臨床医学 泌尿器科学

キーワード：SRC-3 PI3K/AKT/mTOR 分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌はアンドロゲン存在下で発癌し、アンドロゲンの除去により癌細胞はアポトーシスを起こし制癌されるが、効果は長期間持続せずアンドロゲンの除去にもかかわらず再増殖し始める。この現象をホルモン耐性といい、一度ホルモン耐性となると長期間の効果期待できる治療法は少なく癌死する。このように前立腺癌は他領域の癌と異なりユニークな特徴があり、前立腺癌治療の最終目標はホルモン耐性機序の解明に尽きると考えられる。前立腺癌のホルモン耐性の一因子として影響を及ぼす可能性がある遺伝子は数多く報告されているが、その遺伝子を操作してもホルモン耐性機構は改善されず、そのメカニズムの解明にまで到っていないのが現状である。

核内受容体はステロイドホルモンや活性型ビタミンなどの脂溶性分子の標的分子であり、リガンド依存的な転写因子として細胞増殖、分化、代謝などを調節しているヒトゲノム解析の結果、ヒトには48種類の核内受容体が存在することが知られているが、いずれの核内受容体も癌を主体とする様々な難治性疾患の発症や治療と密接に関与する可能性があり、それらの治療薬開発の重要な分子標的と考えられている。核内受容体のリガンド依存的な活性化機構については、核内受容体リガンド結合領域の結晶構造解析や活性化発現に関与するコファクターの同定によりシグナル伝達系が明らかになりつつある。

## 2. 研究の目的

SRC (Steroid Receptor Co-activator) はリガンドが結合した核内受容体に会合し、ヒストンのアセチル化とクロマチン構造を修飾し、転写活性を調節する。私たちは、前立腺癌がホルモン耐性を獲得する一因子として、アンドロゲン受容体の転写活性化因子に着

目し、SRC-3 が最もホルモン耐性前立腺癌組織での発現率が高いことを報告した。私たちの予備実験では、SRC-3 高発現時に種々の growth factor によって活性化されるセリン・スレオニンキナーゼである AKT が誘導された。SRC-3 の発現に伴って発現の増強した PI3K/AKT/mTOR 経路を取り巻く各種転写調節遺伝子の関与についてマイクロアレイ解析し、前立腺癌の分子標的治療に応用することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) SRC-3 によって増強的、もしくは抑制的に制御される遺伝子を同定するために SRC-3/LNcaP stable cell を用いて、オリゴヌクレオチド・マイクロアレイで解析し定量する。
- (2) SRC-3 の発現量の高い 8 時間後と 24 時間後で RNA を抽出し、21000 のヒト遺伝子からなるマイクロアレイチップで反応させ、解析には AXON 4000A dual channel scanner と GenePix version 4.01 software を用いる。予備実験で確認した、増強された遺伝子は細胞周期制御因子としてサイクリン D2、E2、M4、T2、CDC25A、AKT シグナル系として IGF- $\alpha$ 、IGF- $\beta$ 、IRS-1、IRS-2、PIK3CA、AKT1、NF $\kappa$ B シグナル系として BIRC2、BIRC3、GADD45B が認められた。発現の増強された各種遺伝子に対して mRNA、タンパクレベルでの発現量を確認するために定量解析を行う。
- (3) 各種遺伝子のオリゴプライマーを作製し、Semiquantitative RT-PCR、各種抗体を用いて Western blotting を行う。
- (4) SRC-3 を発現しているアンドロゲン非依存性細胞株 PC-3、DU145 に 2 本鎖 RNA (double-stranded RNA; dsRNA) を導

入し、その配列特異的な mRNA の分解により SRC-3 の遺伝子発現を抑制する RNA interference を用い、SRC-3 の発現量を mRNA、タンパクレベルで確認し、増殖能、DNA 合成能、細胞サイズ、アンドロゲン感受性をコントロールと比較検討する。導入効率が悪く時間的により詳細に解析を要する場合やノックダウンした時に細胞が致死的になる場合は RNAi のスイッチが ON/OFF できる Cre-loxP システムを用いる。

- (5) SRC-3 発現抑制時の AKT シグナル系として IGF-1、IGF-2、IRS-1、IRS-2、PIK3CA、AKT1、細胞周期制御因子としてサイクリン D2、E2、M4、T2、CDC25A、NFkB シグナル系として BIRC2、BIRC3、GADD45B の発現量を測定する。
- (6) リポーター遺伝子 PSA-Luciferase を導入し、SRC-3 発現抑制時における転写活性を Luciferase assay にて測定する。
- (7) SRC-3 によって発現の増強した AKT シグナル系因子の結合能を mammalian two-hybrid assay にて確認する。
- (8) Regulator として GAL4-SRC-3 と Target としての各種プラスミドを 17M2-G-luciferase リポーター遺伝子と共に細胞に導入し、luciferase assay にて結合能を解析する。
- (9) 結合能を認めた因子について promoter assay に用いるベクタープラスミド pGL3 にサブクローニングする。
- (10) サブクローニングした pGL3-ベクターと SRC-3 発現ベクターを共に導入し、プロモーター 転写活性を luciferase assay にて解析する。

#### 4. 研究成果

(1)

SRC (Steroid Receptor Co-activator) は、p160 ファミリーに属する核内受容体の転写共役活性化因子であり、SRC-1/NCoA1、SRC-2/GRIP1/TIF2/NCoA2、SRC-3/pCIP/AIB1/ACTR/RAC3 からなる。SRC ファミリーはリガンドが結合した核内受容体に会合し、転写を活性化する。さらにヒストンのアセチル化活性を有し、積極的にクロマチン構造を修飾することで転写を調節する。SRC ファミリーは乳癌、前立腺癌をはじめ種々の癌で遺伝子増幅と高発現が報告されている。今回の解析で SRC-3 が最も前立腺癌組織での発現率が高く、ホルモン耐性になった検体での発現量も高い傾向にあり、前立腺癌の増殖や予後に関与していることを確認した。また、SRC-3 高発現時に種々の成長因子によって活性化されるセリン・スレオニンキナーゼである AKT が誘導された。SRC-3 の発現に伴って発現の増強した PI3K/AKT/mTOR 経路を取り巻く各種転写調節遺伝子の関与が示唆された。

(2)

前立腺癌のホルモン耐性機構には SRC-3 を介したアンドロゲン受容体転写を取り巻く様々な因子が関与すると考え、ホルモン依存性前立腺癌細胞 LNCaP を用いて SRC-3 発現調節可能な stable cell line を樹立した。私たちが開発した調節型ターゲット遺伝子発現は内因性リガンド mifepristone により目的遺伝子の発現が誘導されるシステムである。SRC-3 を高発現させると、FACS 解析により細胞数は増加し、FSC-H: forward scatter height 解析により細胞サイズは増大した。さらに、growth factor によって活性化されるセリン・スレオニンキナーゼである AKT が誘導された。AKT が誘導されたことにより、前立腺癌のホルモンインヒビター：LY294002、mTOR インヒビター：Rapamycin、MAPK インヒビター：PD98059 等を加え、AKT の発現量を解析すると、Rapamycin と PD98059 によって

AKT 発現量が抑制されたことから PI3K/AKT/mTOR シグナル経路が予想される。

(3)

近年、PI3K/AKT/mTOR 経路関連因子は分子標的薬のターゲットとしても開発されており、前立腺癌のホルモン耐性メカニズムへの関与が解明されれば、臨床応用に繋がると考える。SRC-3 によって増強的、抑制的に制御される遺伝子を同定するために SRC-3 発現調節可能な SRC-3/LNCaP stable cell を用いてマイクロアレイ解析を行った。SRC-3 高発現させた 8 時間後と 24 時間後では 1081、504 の遺伝子が増強され、719、379 の遺伝子がそれぞれ抑制された。核内受容体転写共役因子 SRC-3 によって制御される遺伝子として、増強された遺伝子は細胞周期制御因子としてサイクリン D2、E2、M4、T2、CDC25A、AKT シグナル系として IGF- $\alpha$ 、IGF- $\beta$ 、IRS-1、IRS-2、PIK3CA、AKT1、NF $\kappa$ B シグナル系として BIRC2、BIRC3、GADD45B が各々認められた。

(4)

SRC-3 を発現しているアンドロゲン非依存性細胞株 PC-3、DU145 に 2 本鎖 RNA (double-stranded RNA; dsRNA) を導入し、その配列特異的な mRNA の分解により SRC-3 の遺伝子発現を抑制する RNA interference を用い、SRC-3 の発現量を mRNA、タンパクレベル (Northern blotting、Western blotting) で確認し、増殖能 (FACS にて測定) DNA 合成能 ( $^3$ H-thymidine 取り込み率にて解析) 細胞サイズ (FSC-H: forward scatter height 解析) アンドロゲン感受性 (リポーター遺伝子 PSA-Luciferase を導入し、SRC-3 発現抑制時における転写活性を Luciferase assay にて測定) をコントロールと比較検討した結果、細胞周期制御因子であるサイクリン E と CDC25A はアンドロゲン受容体、SRC-3、PI3K/AKT/mTOR 経路関連遺伝子に対する結合能 (mammalian two-hybrid assay にて Regulator : GAL4-SRC-3 と Target :

17M2-G-luciferase リポーター遺伝子と共に細胞に導入し、Luciferase assay にて解析) だけでなくプロモーター転写活性能 (PSA プロモーターを 17M2-G-luciferase リポーター遺伝子に組み込んで、Luciferase assay にて解析) も認められ、前立腺癌のホルモン耐性機構獲得への関与と分子標的治療への応用が期待できる。

## 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 6 件)

1. Hamamoto Shuzo, Yasui Takahiro, Itoh Yasunori, Kawai Noriyasu, Hashimoto Yoshihiro, Kohri Kenjiro: Efficacy of endoscopic combined intrarenal surgery in the prone split-leg position for staghorn calculi. Journal of Endourology 査読 (有) 29(1), 19-24, 2015. DOI:10.1089/end.2014.0372
2. Kawai Noriyasu, Ando Ryosuke, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Laparoscopic single-site partial nephrectomy without hilar clamping using a microwave tissue coagulator. Journal of Endourology 査読 (有) 28, 184-190, 2014. DOI:10.1089/end.2013.0135
3. Naiki Taku, Kawai Noriyasu, Hashimoto Yoshihiro, Okamura Kakehiko, Ando Ryosuke, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Gemcitabine and docetaxel, an effective second-line chemotherapy for lung metastasis of urothelial carcinoma. Int J Clin Oncol. 査読 (有) 19(3), 516-522, 2014. DOI : 10.1007/s10147-013-0574-1
4. Isero Tetsuya, Hamamoto Shuzo, Koiwa Satoshi, Kamiya Hiroyuki, Hashimoto

- Yoshihiro, Iwase Yutaka, Kohri Kenjiro: Combined endoscopic surgery in the Prone-split leg position for successful single-session removal of an encrusted ureteral stent. *J Med Case Rep* 査読 (有) 8, 128, 2014. DOI: 10.1186/1752-1947-8-128
5. Okamura Takehiko, Ando Ryosuke, Akita Hidetoshi, Hashimoto Yoshihiro, Kohri Kenjiro: Are there time-period related differences in the prophylactic effects of BCG intravesical instillation therapy in Japan? *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 査読 (有) 13(9), 4357-4361, 2012. DOI: 10.7314/APJCP.2012.13.9.4357
6. Hamamoto Shuzo, Tozawa Keiichi, Nishio Hidenori, Kawai Noriyasu, Kohri Kenjiro: Successful treatment of primary malignant lymphoma of the penis by organ-preserving rituximab containing chemotherapy *Int. J Clin Oncol* 査読 (有) 17, 181-184, 2012. DOI:10.1007/s10147-011-0273-8

[学会発表](計9件)

1. 橋本 良博、奥田 奈央子、小岩 哲、濱 周造、神谷 浩行、岩瀬 豊: 当院における進行性腎細胞癌に対する Everolimus の治療成績 第103回日本泌尿器科学会総会 2015/4/20 石川県立音楽堂・ANA クラウンプラザホテル金沢・ホテル日航金沢・ホテル金沢・金沢都ホテル・金沢市アートホール・もてなしドーム (石川県・金沢市)
2. Hashimoto Yoshihiro, Okuda Naoko, Koiwa Satoshi, Hamamoto Shuzo, Kamiya Hiroyuki, Iwase Yutaka: Treatment effects of recombinant human thrombomodulin in patients with septic

- urinary tract infection-induced DIC. 34<sup>th</sup> Congress of the Societe Internationale d'Urologie 2014/10/13 Glasgow(England)
3. 橋本 良博、河合 憲康、戸澤 啓一、郡 健二郎: 前立腺癌の増殖における steroid receptor co-activator を介した PI3K/AKT/mTOR 経路の関与 第102回日本泌尿器科学会総会 2014/4/26 神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル (兵庫県・神戸市)
4. Hashimoto Yoshihiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Treatment effects of thrombomodulin in patients with septic urinary tract infection-induced DIC. 16<sup>th</sup> international congress of infectious diseases 2014/4/3 Cape Town(South Africa)
5. 橋本 良博、伊勢呂 哲也、濱本 周造、神谷 浩行、岩瀬 豊: 進行性尿路上皮癌に対する GC 療法による術前補助化学療法の検討 第65回西日本泌尿器科学会総会 2013/11/1 マリトピア・アバンセ (佐賀県・佐賀市)
6. Hamamoto Shuzo, Hashimoto Yoshihiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Successful results of endoscopic combined intrarenal surgery against large calculi; simultaneous use of flexible ureteroscopy and mini-percutaneous nephrolithotomy overcame the drawbacks of the monotherapy of percutaneous nephrolithotomy. 108<sup>th</sup> American Urological Association Annual Meeting 2013/4/6 San Diego(USA)
7. Hashimoto Yoshihiro, Noriyasu Kawai, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Treatment effects of human soluble thrombomodulin in patients with septic

urinary tract infection induced disseminated intravascular coagulation. 108<sup>th</sup> American Urological Association Annual Meeting 2013/4/5 San Diego(USA)

8. Hashimoto Yoshihiro, Koiwa Satoshi, Hamamoto Shuzo, Kamiya Hiroyuki, Iwase Yutaka: Overexpression of Cdc25C, an androgen receptor coactivator, in human prostate cancer. 24<sup>th</sup> international congress on anti-cancer treatment 2013/2/7 Paris(France)
9. 橋本 良博、伊勢呂 哲也、神谷 浩行、岩瀬 豊：ホルモン抵抗性前立腺癌に対するステロイド併用ドセタキセル療法の検討 第 100 回日本泌尿器科学会総会 2012/4/22 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 良博 (Hashimoto Yoshihiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：40244561

### (2) 研究分担者

河合 憲康 (Kawai Noriyasu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20254279

郡 健二郎 (Kohri Kenjiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30122047

中西 真 (Nakanishi Makoto)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40217774

林 祐太郎 (Hayashi Yutaro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40238134

戸澤 啓一 (Tozawa Keiichi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40264733