

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460426

研究課題名(和文) 前立腺癌ホルモン療法抵抗性におけるグルココルチコイド受容体の関与

研究課題名(英文) Contribution of glucocorticoid receptor in the mechanism of castration resistancy of prostate cancers

研究代表者

桑田 健 (Kuwata, Takeshi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・科長

研究者番号：00327321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：グルココルチコイド受容体(GR)がアンドロゲン応答遺伝子の発現を誘導することが、アンドロゲン依存性前立腺癌に対するホルモン療法の耐性機構となることを示した。ヒト前立腺癌細胞株LNCapにおけるGR発現をウェスタンブロットで示した。続いて、恒常的GR発現とデキサメサゾン(DEX)刺激によりアンドロゲン応答配列が活性化されることをレポーターアッセイにて示した。また同時にこの刺激はアンドロゲン標的分子であるPSA発現を上昇させた。GRを恒常的に発現させたLNCap-GRは低濃度DEXで増殖が亢進した。またLNCap-GRは精巣除去によるアンドロゲン欠乏マウスの皮下に生着可能であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, the role of glucocorticoid receptor (GR) in castration resistancy of androgen-receptor(AR)-positive prostate cancer. In a human prostate cancer cell line, LNCap, expresses GR in addition to AR. Dexamethasone could activate androgen-receptor-respose-element and induces PSA in LNCap-GR, constitutively expressing GR. LNCap-GR could also subcutaneous-transplantable in SICD mice, while parental LNCap could not.

研究分野：病理学

キーワード：前立腺癌 抗アンドロゲン療法 アンドロゲン受容体 グルココルチコイド受容体

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は米国男性におけるがん罹患率および死亡率の第一位を占めている。国立がん研究センターがん情報対策センターによる統計調査では、日本においても前立腺癌の罹患率および死亡者数はいずれも近年増加しており、2020年には前立腺癌が肺癌に次いで日本人男性のがん罹患率第二位になると予想されている。

前立腺癌の増殖は精巣から分泌されるアンドロゲンに依存的である。アンドロゲンの作用は転写因子であるアンドロゲン受容体(AR)の活性化であり、その結果としてARが認識する遺伝子配列(AR_E:GGA/TACAnnTGTCT)をプロモーター領域に有するアンドロゲン応答遺伝子の発現が誘導される。前立腺癌に対する腫瘍マーカーである前立腺特異的抗原(PSA)もARにより発現誘導されるアンドロゲン応答遺伝子である。前立腺癌に対するホルモン療法では、AR機能の抑制によりアンドロゲン応答遺伝子の発現を低下させることで前立腺癌の増殖抑制やアポトーシスが誘導される。臨床的に、90%以上の前立腺癌症例においてホルモン療法施行後の一定期間は腫瘍の縮小・消失が期待できる。しかしながらその効果は一過性であり、ほぼすべての症例において前立腺癌は治療抵抗性を獲得し再発する。

臨床的にホルモン療法後再発の指標は血清PSA値の上昇である。アンドロゲンにより発現誘導されるPSAの発現が見られることから、ホルモン療法に対し治療抵抗性となった前立腺癌細胞においてはアンドロゲン応答遺伝子の発現が誘導されていることを示している。すなわち、ホルモン療法に対する治療抵抗性にはがんの悪性度の増大によりアンドロゲン非依

存性になったのではなく、転写因子であるARの機能抑制を目的とした薬剤の存在下において、AR応答遺伝子を発現できるような新たな機構が生じていると考えられる。この分子機構としては、これまでAR遺伝子のアンドロゲンとの結合に関わる領域における遺伝子変異などによる説明がされてきた(Clin Cancer Res 15:4792)。しかしながら、AR遺伝子に変異をもたずに治療抵抗性となる症例も多く、未だその分子機構の全容の解明には至っていない。

2. 研究の目的

アンドロゲン受容体(AR)は転写因子であり、アンドロゲンの存在下でアンドロゲン応答遺伝子の発現を誘導する。前立腺癌の進展・増殖にはアンドロゲン応答遺伝子の機能が必要であり、前立腺癌に対するホルモン療法の分子薬理作用はARによる転写活性の抑制である。ホルモン療法に対する治療抵抗性の分子機構として遺伝子変異等によるARの再活性化が関与するとされているが、AR遺伝子に変異をもたない治療抵抗性症例も多くホルモン療法に対する治療抵抗性の分子機構の全容は未だ解明されていない。本研究では、ARと同じステロイドホルモン受容体群に属するグルココルチコイド受容体がARに代わりアンドロゲン応答遺伝子の発現を誘導することで、前立腺癌ホルモン療法に対する治療抵抗性に関与することを示す。

3. 研究の方法

1) アンドロゲン感受性ヒト由来前立腺癌細胞株(LNCap)における核内ホルモン受容体発現状況をウエスタンブロット法により確認する。あわせて、それぞれに対応するステロイドホルモン投与によるアンドロゲン受容体(AR)標的分子誘導について検討する。

2) GRによるアンドロゲン応答遺伝子の発現

誘導

i) アンドロゲン感受性ヒト由来前立腺癌細胞株 (LNCap) に GR 遺伝子を遺伝子導入し、恒常的に発現させる。ステロイドホルモンの除去された 10%デキストラン・チャコール処理胎児牛血清(DCS-FCS)での培養条件下において、グルココルチコイド(デキサメサゾン)で刺激し、アンドロゲン応答遺伝子である PSA の発現が上昇することを示す。

ii) アンドロゲン応答配列(ARE)に対するレポーターアッセイ法により、GR の発現とグルココルチコイドによる刺激が、ARE を有するプロモーターを活性化できることを示す。

3) GR によるアンドロゲン非存在下での前立腺癌増殖

i) GR を恒常的に発現させたアンドロゲン感受性前立腺癌細胞株は、グルココルチコイド添加により DCS-FCS 培養条件下においても増殖可能となることを示す。

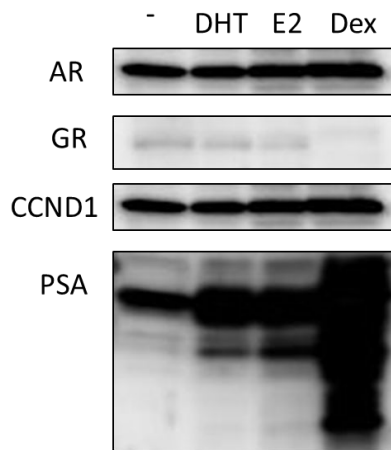
ii) 精巣除去によりアンドロゲン欠乏状態にしたヌードマウス(除睾マウス)への皮下移植モデルを用い、GR を恒常的に発現させたアンドロゲン感受性前立腺癌細胞の生着・増殖が可能となることを示す。

4) ヒト前立腺癌組織における GR 発現の有無を免疫組織学的検討する。あわせて、手術全の抗アンドロゲン療法の有無により GR 発現頻度の差を検討する。

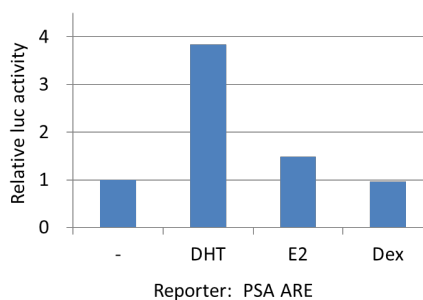
4. 研究成果

1) アンドロゲン感受性ヒト由来前立腺癌細胞株 LNCap における核内ホルモン受容体発現状況をウエスタンブロット法により確認した。LNCap では AR のほか、GR の発現が確認された。アンドロゲンおよびグルココルチコイド投与により AR 標的遺伝子 PSA の発現亢進が認められ、その程度はグルココルチコイドによるものももっとも顕著であっ

た。なお、LNCap においてエストロゲン受容体(ER)の発現は同定できなかったが、エストロゲン(E2)投与により同様に PSA の発現誘導が認められた。これは弱いながら ER の発現が存在する、あるいはエストロゲンが他のホルモン受容体を介して PSA の発現を誘導している可能性が考えられた。



一方、LNCap を用いたアンドロゲン受容体応答領域に対するレポーターアッセイではグルココルチコイド刺激により PSA におけるアンドロゲン応答配列に対する活性化は確認できなかった。このことは、グルココルチコイドによる PSA 誘導にはアンドロゲン/AR とは別の応答配列を利用している可能性がある。



2) LNCap に GR 遺伝子を遺伝子導入し、恒常的に発現させた LNCap-GR を作製した。

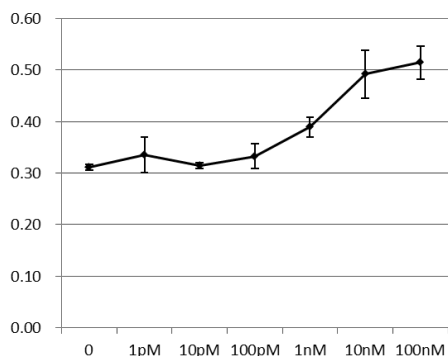


LNCap-GR をステロイドホルモンの除去され

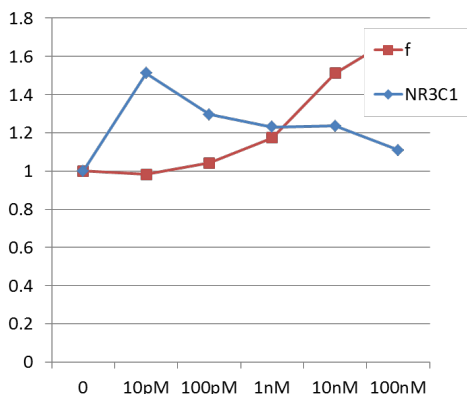
た 10%デキストラン・チャコール処理胎児牛血清(DCS-FCS)での培養条件下において、グルココルチコイド(デキサメサゾン)で刺激すると、アンドロゲン応答遺伝子である PSA の発現が誘導された。

3) GR によるアンドロゲン非存在下での前立腺癌増殖

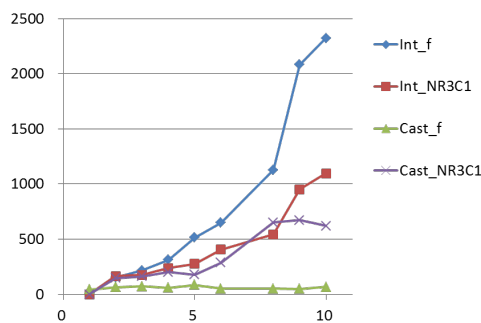
i) LNCap は DCS-FCS 培養条件下においてグルココルチコイド添加により増殖が亢進した。



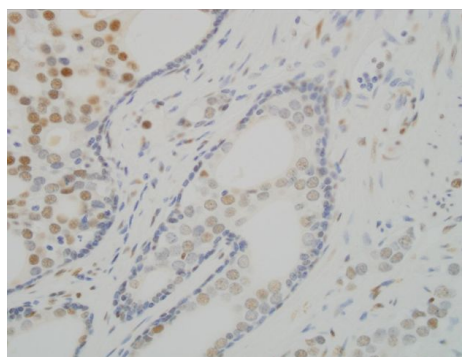
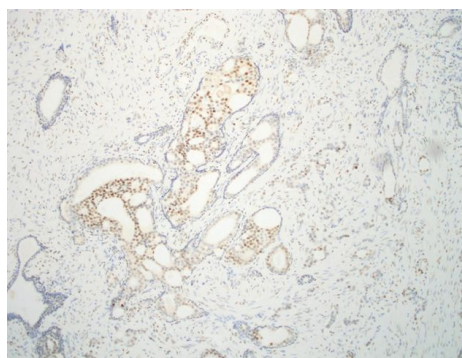
一方、GR を恒常的に発現させた LNCap-GR ではより低濃度のグルココルチコイドで増殖の亢進を示した。一方、高濃度のグルココルチコイド存在下では逆に増殖が抑制された。



ii) GR を恒常的に発現させたア LNCap-GR は除睾マウスへの皮下移植計において、生着・増殖が可能となった。一方、精巣を除去しないマウスにおいても生着・増殖は可能であったが、その増殖は GR を発現させていない親株よりも緩徐であった。LNCap-GR の増殖は精巣除去を行っていないマウスに親株を移植した場合に比べ緩徐であり、また移植後 10 週をピークに腫瘍は縮小に転じた。



4) ヒト前立腺癌組織における GR 発現の有無を免疫組織学的検討した。手術症例 8 例中 4 例で GR の発現が確認できた。



一方、術前に抗アンドロゲン療法が施行されていた 7 例の検討では陽性は 3 例であり、術前抗アンドロゲン療法による GR 発現誘導は観察されなかった。

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 3 件)

分子標的治療のための病理スクリーニングシステム、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 26 日、広島

From IHC to NGS、日本癌学会総会、2014 年 9 月 25 日、横浜

コンパニオン診断を支える国内インフラ整備、第 61 回日本病理学会秋季特別総会、2015 年 11 月 6 日、東京

〔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

桑田 健 (KUWATA, Takeshi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・

東病院・科長

研究者番号：00327321

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：