

前立腺癌の分子標的治療 I

橋本 良博, 成山 泰道, 安藤 亮介

岡田 真介, 戸澤 啓一, 郡 健二郎

名古屋市立大学大学院医学研究科腎・泌尿器科学分野

MOLECULAR TARGETED THERAPY FOR PROSTATE CANCER

Yoshihiro HASHIMOTO, Hiromichi NARUYAMA, Ryousuke ANDO,

Shinsuke OKADA, Keiichi TOZAWA and Kenjiro KOHRI

The Department of Urology, Nagoya City University Medical Association

Androgen plays an important role in the growth of prostate cancer, but the molecular mechanism that underlies the development of resistance to anti-androgen therapy remains unknown. In this paper, we review the role of cell cycle regulators and steroid receptor co-activators for prostate cancer growth and survival. Cyclin E has been shown to increase the transactivation activity of the human androgen receptor and the proliferation of prostate cancer cells. On the other hand, p27 using an adenovirus vector was shown to reduce the size of tumors of human prostate cancer xenografts. Steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) is often over-expressed in prostate cancers. Our results indicate that over-expression of SRC-3 can modulate the AKT (protein kinase B) signaling pathway and stimulate cell growth in prostate cancer. In contrast, down-regulation of SRC-3 expression by small interfering RNA suppresses cell growth.

(Hinyokika Kiyo 54 : 57-61, 2008)

Key words : Molecular targeted therapy, Prostate carcinoma, Cell cycle regulator, Steroid receptor co-activator

緒 言

ホルモン療法により前立腺癌細胞の増殖は抑制されるが、多くの症例では数年以内にホルモン抵抗性となり再燃癌の状態に至る。ホルモン抵抗性獲得の原因は複雑で未だ不明であるが、一因となる可能性がある数種の遺伝子が増えられている。本論文では、アンドロゲン受容体 (AR) の転写を活性化させる種々の co-factor として細胞周期制御因子とステロイド受容体転写共役因子について基礎研究結果と分子標的治療への展望や課題について報告する。

1) 細胞周期制御因子

ARを取り巻く転写制御として cyclin, cyclin dependent kinase (Cdk) inhibitor; CKI に着目した。細胞周期は cyclin と Cdk との複合体により進行し、CKI で停止するように制御されている。LNCaP に cyclin A, D1, E の発現ベクターを導入し、AR の転写活性を調べた結果、cyclin E はアンドロゲンの有無に関わらず AR の転写活性を増強した。また、アンドロゲン非存在下で LNCaP の増殖は抑制され G1 期に停止し、p21 の発現低下と p27 の発現増加が認められた。ヌードマウスの移植腫瘍モデルを用いた実験では、アデノウイルスベクターに組み込んだ p27 遺伝

子導入による抗腫瘍効果が得られた。

2) ステロイド受容体転写共役因子

Steroid receptor co-activator (SRC) は AR を介した標的遺伝子に対する転写活性の橋渡しに必要であり、前立腺癌の増殖には不可欠と思われる。前立腺癌で SRC の発現を調べた結果、SRC-3 は前立腺癌の46%に高発現し、悪性度、再発に相関していた。LNCaP に SRC-3 を高発現させるとセリン・スレオニンキナーゼである AKT の活性化を介して細胞増殖を誘導し、SRC-3 の発現を抑制すると細胞増殖は抑制された。ヌードマウスの移植腫瘍モデルを用いた実験でも SRC-3 の発現を抑制すると *in vitro* 同様に抗腫瘍効果が得られた。

1) 細胞周期制御因子

細胞が増殖・分裂をする時には細胞周期 (cell cycle) と呼ばれる一定の規則正しいプロセスを経る。細胞周期は正の制御因子である cyclin と Cdk (cyclin dependent kinase) との複合体により進行し、負の制御因子である CKI (Cdk inhibitor) により停止するように制御されている (Fig. 1)。また、LNCaP をアンドロゲン非存在下で培養すると、細胞増殖は抑制され細胞周期の G1 期に停止する。これに関与する CKI として p21 の発現が低下していたのに対し、p27 は高発

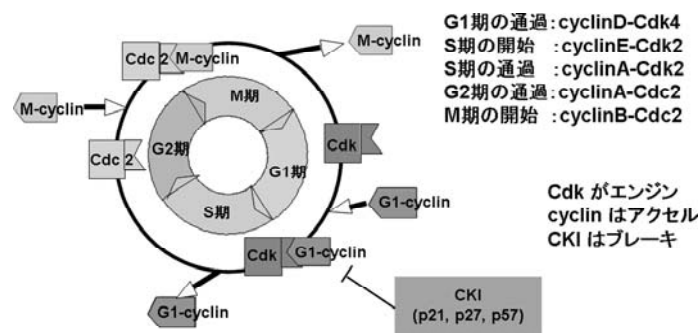


Fig. 1. Mechanism of cell cycle regulators.

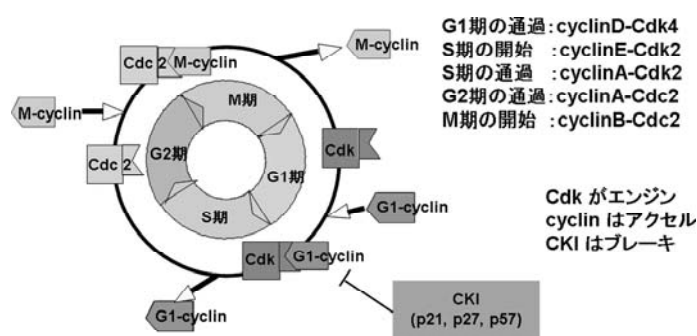


Fig. 2. Potentiation of the transactivation activity of the AR by cyclin E. ; MDAH041 cells were co-transfected with an expression vector for AR, GR, or PR, an ARE-CAT reporter plasmid, and an expression vector for cyclins E, A, or D1. Cells were incubated in the absence or presence of 1 nM DHT (T), 1 nM dexamethasone (D), 1 nM progesterone (P), or 10 μ M 5-OH-F for 18 h and then assayed for CAT activity.

現していた。p21 の発現の低下は p21 のプロモーター領域にアンドロゲン受容体応答配列 (ARE) が存在していることが原因と考えられる¹⁾。LNCaP に G1 cyclin である cyclin A, D1, E の各種発現ベクターをおのおの導入し, AR の転写活性を調べた結果, cyclin A, cyclin E がアンドロゲンの有無に関わらず AR の転写活性を増強した (Fig. 2)。これは, G1 cyclin である cyclin A, cyclin E が AR の co-activator として働き, 前立腺癌の転写活性を介した増殖進展に関与する可能性を示唆する²⁾。また, G2/M 期では cdc25B が co-activator として AR の転写活性を増強することが報告されている³⁾。一方, CKI を用いた遺伝子治療への応用として, LNCaP をヌードマウスに皮下注した xenograft 移植腫瘍モデルにアデノウイルスベクターに組み込んだ p27 遺伝子を導入することにより抗腫瘍効果が得られた (Fig. 3)。

以上から前立腺癌の増殖には cyclin, Cdk などの正

の細胞周期制御因子が働き, ホルモン療法による細胞増殖抑制, アポトーシス誘導には負の制御因子である p27 が主に働くと考えられる。前立腺癌組織内での p27 の発現と予後が相関することも報告されている⁴⁾。また, アンドロゲンを除去しても cyclin E によるアンドロゲン受容体の転写活性増強が認められることから, cyclin E がホルモン耐性獲得に関与する一因子である可能性を示唆する。

2) ステロイド受容体転写共役因子

AR に代表されるステロイド受容体は単独では標的遺伝子の活性化や抑制ができず補助因子が必要である。ステロイド受容体の転写を活性化する補助因子を co-activator, 抑制する補助因子を co-repressor と呼ぶ。Steroid receptor co-activator (SRC) は AR を介した標的遺伝子に対する転写活性の橋渡しに必要であり, ホルモン依存性癌である前立腺癌の増殖には不可欠と思われる。実際, SRC ファミリーである SRC-3

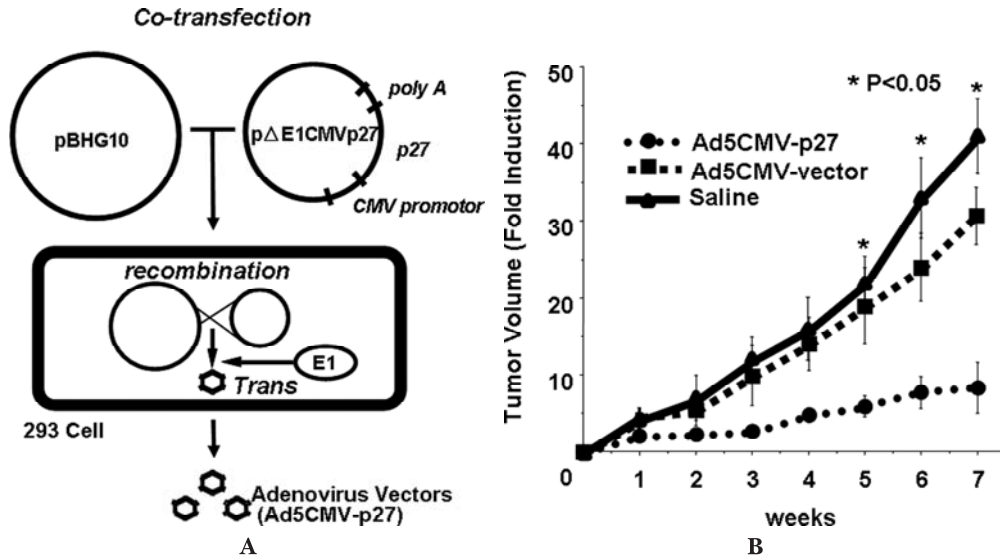


Fig. 3. Recombinant adenovirus preparation and xenograft growth assay. **A:** The target cDNA (p27, LacZ) was inserted into pΔE1sp1A to generate pΔE1CMV-X which were inserted into the E1 deletion region of modified Ad5. This plasmid was co-transfected with pBHG10 into 293 cells to generate AdCMV-X. **B:** To determine whether AdCMV-p27 could alter the growth of established tumors, human prostate cancer nodules (~0.5 cm) in BALB/c mice were injected intratumorally (0.05 cc; 1×10^{10} pfu) with PBS (n=10), AdCMV-vector, or AdCMV-p27 on 3–12 weeks once a week after tumor inoculation. Tumor diameter was measured in two perpendicular dimensions using calipers.

は前立腺癌、乳癌、胃癌などでの過剰発現が報告されており、その発現量は予後と再発に関連している⁵⁻⁶⁾。また、SRC-3はNF κ B、I κ Bを介したアポトーシス誘導系にも関与していると考えられている⁷⁾。

前立腺癌の増殖・進展におけるSRC-3のシグナル経路と基礎メカニズムを解析した。SRC-3発現誘導時にはSRC-3の発現量が少ないLNCaP、また発現抑

制時の解析には発現量の多いPC3をおおのうに用いた。SRC-3単純な発現ベクターを導入したstable cellでは十分なSRC-3の発現が得られず、合成ステロイドmifepristoneを添加した時にSRC-3を高発現させる発現制御システムを用いたLNCaPのstable cellを樹立した(Fig. 4)。SRC-3高発現時には、セリン・スレオニンキナーゼであるAKTの活性化を介して細胞増

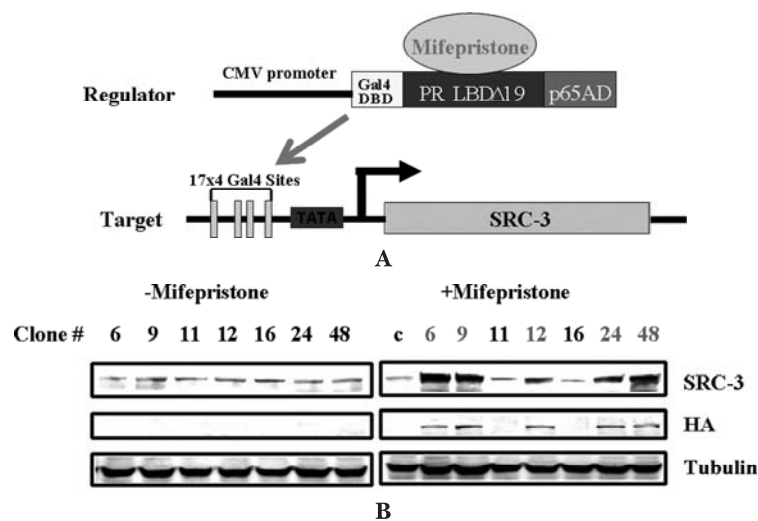


Fig. 4. Inducible expression of SRC-3 in LNCaP stable cell lines. **A:** Diagram of the mifepristone-inducible gene expression system. **B:** Western blot of different LNCaP stable clones in the presence and absence of mifepristone treatment. Note that SRC-3 expression was induced in clones 6, 9, 12, 24, and 48 after mifepristone treatment (10^{-8} M) for 24 h, while no induced SRC-3 expression was seen in clones 11, 16, and the control parental cell line. c, control. Similar induction was also shown with a HA antibody, since exogenously transfected SRC-3 is HA tagged.

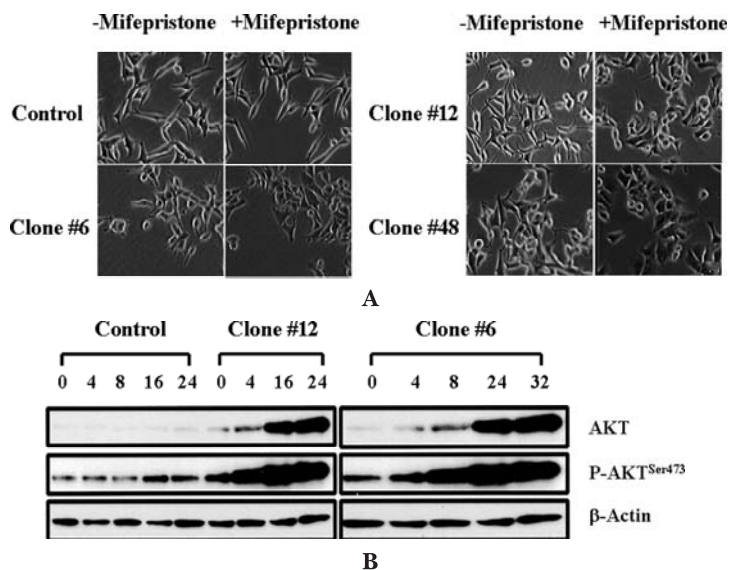


Fig. 5. Over-expression of SRC-3 enhances cell growth (size) and induces AKT activity. A: Morphology of LNCaP-SRC-3 stable cell lines and control parental cells after the treatment with mifepristone (10^{-8} M) for 24 h. Shown is phase contrast microscopy, indicating that mifepristone treatment promotes cell growth (size increase) in LNCaP-SRC-3 stable cell lines. B: Treatment with mifepristone (10^{-8} M) induces AKT activity in LNCaP-SRC-3 stable cell lines. Phosphorylation of AKT and total AKT are increased by mifepristone treatment in stable clones. Shown are the results from clone no 6 and 12, which are characteristic examples of the results seen for other stable clones.

殖を誘導した (Fig. 5). 次に, doxycyclin 添加時に small interfere RNA にて SRC-3 の発現を抑制する LNCaP を樹立した. SRC-3 の発現抑制時には細胞増殖は抑制され, ノードマウスに同細胞を皮下移植した実験でも doxycyclin 投与時に SRC-3 の発現は抑制さ

れ, 抗腫瘍効果が得られた (Fig. 6).

以上から, 前立腺癌の増殖には AR を介したステロイド受容体転写共役因子 SRC-3 による転写活性化が重要であり, ホルモン耐性獲得や予後に関与する可能性が考えられた.

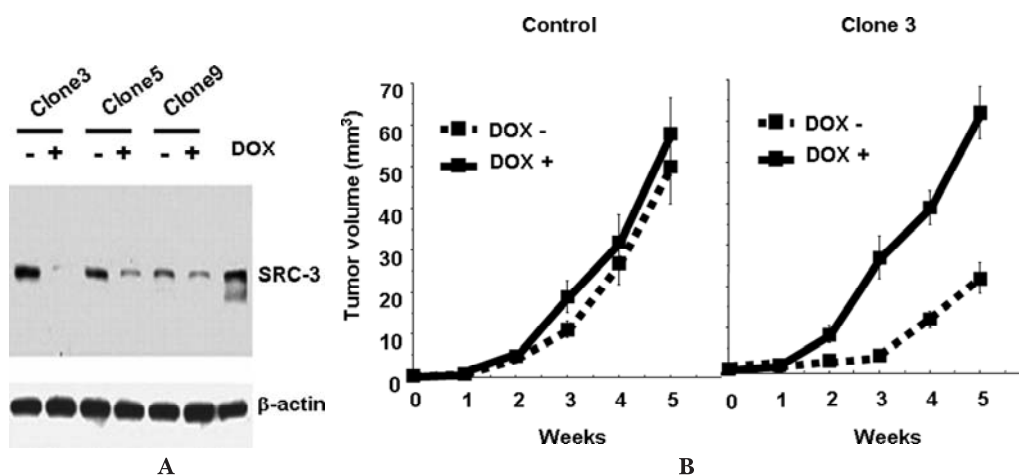


Fig. 6. Down-regulation of SRC-3 expression in stable PC-3 cell lines decreases prostate cancer cell proliferation and tumor growth in nude mice (short hairpin RNA; shRNA stable cell line selection and tumorigenesis assay). A: Cell extracts from cells treated with (+) or without (-) doxycyclin were separated by SDS-PAGE and blotted and probed with anti-SRC-3 and anti-actin antibody. Actin was used as a loading control. B: Doxycycline-regulated expression of SRC-3 inhibits the tumorigenesis of PC-3 prostate cancer cells in nude mice. PC-3 stably transfected with shRNA expression plasmids or parental PC-3 cells were harvested and injected s.c. into the flank region of male nude mice. The mice were fed with water with (+) or without (-) 200 μ g of doxycycline per ml. The change in tumor volume over a 35-day period is shown in the graph. **, $P < 0.01$, significant difference with t test.

結 語

アンドロゲン受容体の転写活性化因子として細胞周期制御因子の cyclin E とステロイド受容体転写共役因子の SRC-3 が前立腺癌の発生, 増殖, ホルモン耐性に影響を与える可能性が示唆された。また, cyclin dependent kinase inhibitor: p27 の発現誘導と SRC-3 の発現抑制は前立腺癌の増殖を抑制することから, これらの遺伝子を用いた分子標的治療への展望や課題について今後検討を要する。

文 献

- 1) Lu S, Liu M, Epner DE, et al.: Androgen regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene through an androgen response element in the proximal promoter. *Mol Endocrinol* **13**: 376-384, 1999
- 2) Hashimoto Y, YamamA, Kohri K, et al.: Cyclin E as a coactivator of the androgen receptor. *J Cell Biol* **150**: 873-880, 2000
- 3) Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, et al.: Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**: 1354-1357, 1995
- 4) Ngan E, Hashimoto Y, Ma ZQ, et al.: Overexpression of Cdc25B, an androgen receptor coactivator, in prostate cancer. *Oncogene* **22**: 734-739, 2003
- 5) Voegel JJ, Heine MJ, Zechel C, et al.: TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J* **15**: 3667-3675, 1996
- 6) Ghadimi BM, Schrock E, Walker RL, et al.: Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas. *Am J Pathol* **154**: 525-536, 1999
- 7) Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R, et al.: Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int J Cancer* **89**: 217-223, 2000
- 8) Wu RC, Qin J, Hashimoto Y, et al.: Regulation of SRC-3 coactivator activity by I kappa B kinase. *Mol Cell Biol* **10**: 3549-3561, 2002

(Received on July 30, 2007)
(Accepted on August 23, 2007)