

泌尿器科腫瘍学における分子研究の展望： 前立腺癌における細胞周期関連タンパク (G1 サイクリン) とアンドロゲン レセプターの制御機構

名古屋市立大学医学部泌尿器科学教室 (主任：郡 健二郎教授)

秋田 英俊, 橋本 良博, 日比野満伸

飯塚 敦彦, 郡 健二郎

CRITICAL ROLE FOR CELL CYCLE REGULATORS IN ANDROGEN RECEPTOR FUNCTION

Hidetoshi AKITA, Yoshihiro HASHIMOTO, Mitsunobu HIBINO,
Atsuhiko IIZUKA and Kenjiro KOHRI

From the Department of Urology, Nagoya City University Medical School

Androgen plays an important role in the growth of prostate cancer, but the molecular mechanism that underlies development of resistance to antiandrogen therapy remains unknown. Cyclin E has now been shown to increase the transactivation activity of the human androgen receptor (AR) in the presence of its ligand dihydrotestosterone. The enhancement of AR activity by cyclin E was resistant to inhibition by the antiandrogen 5-hydroxyflutamide. Cyclin E was shown to bind directly to the AB domain of the AR, and to enhance its AF-1 transactivation function. These results suggest that cyclin E functions as a coactivator of the AR, and that aberrant expression of cyclin E in tumors may contribute persistent activation of AR function, even during androgen ablation therapy.

(Acta Urol. Jpn. 47: 819-823, 2001)

Key words: Cyclin E, Androgen receptor, Prostate cancer, Hormone therapy, Androgen

緒 言

前立腺癌の進行に、アンドロゲンは重要な働きを担っていると考えられている。前立腺癌は、アンドロゲンに依存して増殖し、大部分の症例で、アンチアンドロゲン、LH-RH アゴニストを含めたアンドロゲン除去療法によく反応するが、数年以内にアンドロゲン非依存的な増殖能を獲得し、再燃することが問題となっている。

アンドロゲンは、核内レセプターであるアンドロゲンレセプター (AR) を通して、前立腺の増殖をつかさどっている。アンドロゲンは AR と結合すると、2量体を形成し、アンドロゲン リスポンシブル エレメント (ARE) と結合し、種々のタンパク質を合成し前立腺の増殖に寄与していると考えられている (Fig. 1)。

AR gene の DNA 結合領域のそれぞれN末, C末に AF1 領域, AF2 領域が存在し, リガンドは AF2 領域に結合することが分かっている (Fig. 2)。ホルモン抵抗性癌における, アンドロゲンレセプターにおいて, AR gene の増幅, 高発現¹⁾, AR gene muta-

tion²⁾ や AR gene co-activator による活性化³⁾などにより AR signal が活性化していると考えられている。

細胞周期を担う因子の1つに、サイクリン/サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) と呼ばれる一群のタンパクキナーゼ複合体が存在し、高等動物細胞の場合、10種類を超えるサイクリンと8種類の Cdk が現在までに同定されている。G1-S 期の移行期には、Cdk の活性化がおり、サイクリンは正に、Cdk inhibitor は負に調節している。また、サイクリン/Cdk 複合体、CKI (Cdk inhibitor) は、増殖シグナルの標的とし

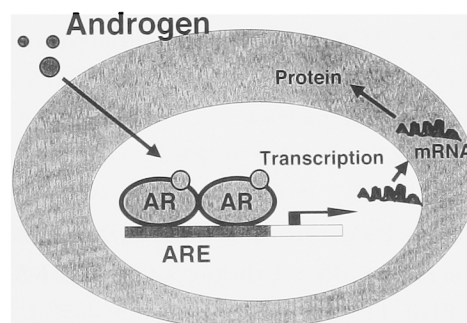


Fig. 1. Mechanism of Androgen receptor (AR).

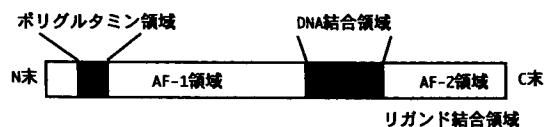


Fig. 2. Structure of (AR) gene. The AR exhibits two transactivation functions that are mediated by ligand-independent (AF-1) and ligand-dependent (AF2) activation domain located in the NH2-terminal AB region and in the COOH-terminal ligand-binding EF region.

て、細胞の G1 期進行, S 期 (DNA 複製期) への移行に、重要な役割を果たすだけでなく、細胞分化の制御、細胞老化や細胞死の調節に関与し、さらには、細胞癌化と深くかかわっていると考えられている。

アンドロゲン依存性細胞において、アンドロゲンは、サイクリンや Cdk inhibitor の発現を変化させることにより、Cdk の活性化を制御し、G1-S 期の移行を刺激すると考えられている。

われわれは、アンドロゲンレセプターに直接結合し、アンドロゲンレセプターの転写活性を増強する共役因子と考えられる G1 サイクリンを同定した。本稿では、アンドロゲンレセプターと細胞周期の関連を中心に概説する。

方 法

1. Cell culture, CAT assay

Hela, MDAH041 細胞は 10% FBS の DME で、LNCap は RPMI1640 で維持した。Transfection の 24 時間前にチャコール処理をした 5% FBS を加えた DME に交換した。Transfection は、リン酸カルシウム法にて行い、ARE CAT reporter plasmid 8 μ g, β -galactosidase expression vector 3 μ g (transfection 効率の内因性コントロールのため)、AR expression vector 1 μ g, cyclin E expression vector を 2 μ g にて行った。2 μ g の GAL4 AR (AB), GAL4 AR (EF), 4 μ g VP16 cyclin E vector, 8 μ g 17M2-G-CAT reporter plasmid を mammalian two hybrid analysis で用いた。Transfection の 18 時間後に PBS にて洗浄し、ligand を含む DME でさらに 18 時間培養し、ハーベストし、CAT および β -galactosidase activity を測定した。

2. Northern blot analysis

抽出した RNA を 1% アガロースフォルムアルデヒドゲルに展開し、ナイロンメンブレンにトランスファーした。PSA, AR, β -actin の cDNA probe を Random Primer DNA Labeling kit (TAKARA) にて α [32 P] dCTP で標識し、50% ホルムアミドで 42°C, 24 時間でハイブリダイゼーションを施行した。

3. Immunoprecipitation and immunoblot analysis

MDAH041 細胞に cyclin E と full length の AR または AR の AB, EF domain の expression vector を transfection し、DHT の存在下、非存在下で培養した。IP buffer にて洗浄後 cell lysate を 4°C で抗 cyclin E 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), protein A-agarose beads (Boehringer) と共に incubate した。Beads と結合した蛋白を 10% SDS-PAGE にて分離し、ニトロセルロースメンブレンに transfer し、抗 AR 抗体 (AN1-15; Affinity Bioreagents, C-19; Santa Cruz Biotechnology) で immunoblot analysis を行った。

結果・考察

1. 各種 G1 cyclin と AR の転写活性

ジヒドロテストステロン (DHT) の存在下、非存在下において CAT assay を行った。Cyclin A, D1 では、ほとんど変化がなかったが (D1 では軽度の低下)、cyclin E で AR の転写活性の増強を認めた (Fig. 3A)。また、この cyclin E による転写活性の増強は DHT 非存在下においても認めた (Fig. 3A)。Dose による検討において、cyclin E の dose dependent に AR の転写活性の増強を認めた (Fig. 3B)。

この、cyclin E による転写活性の増強が、AR に特異的かどうかを検討するため、グルココルチコイドレセプター (GR)、プロゲステロンレセプター (PR)、エストロゲンレセプター (ER) における検討を加えた。GR, PR は AR と同じ DNA element を通し、働くことが分かっているが⁴⁾、GR, PR と

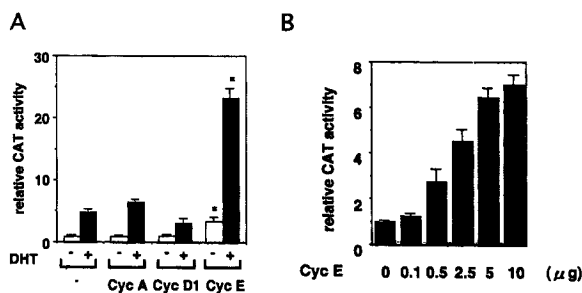


Fig. 3. Potentiation of the transactivation activity of the AR by cyclin E. A, MDAH041 cells were co-transfected with an AR expression vector, an ARE-CAT reporter plasmid, and an expression vector for cyclins E, A, or D1. Cells were incubated in the absence or presence of 1 nM DHT for 18 h and then assayed for CAT activity. B, MDAH041 cells were co-transfected with an AR expression vector, an ARE-CAT reporter plasmid, and the indicated amounts of a cyclins E expression vector. Cells were incubated in the presence of 1 nM DHT for 18 h and then assayed for CAT activity.

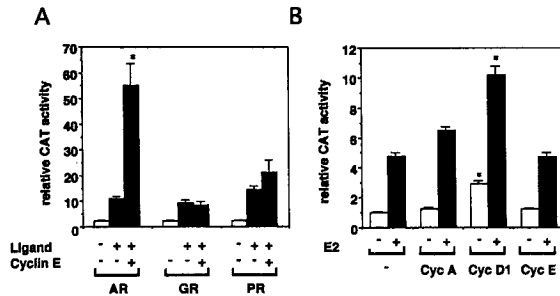


Fig. 4. A, MDAH041 cells were co-transfected with an expression vector for AR, GR, or PR, an ARE-CAT reporter plasmid, and an expression vector for cyclins E, A, or D1. Cells were incubated in the absence or presence of 1 nM DHT, 1 nM dexamethasone, or 1 nM progesterone for 18 h and then assayed for CAT activity. B, MDAH041 cells were co-transfected with an ER α expression vector and an ERE-CAT reporter plasmid in the absence or presence of an expression vector for cyclin A, D1, or E. Cells were incubated for 18 h in the absence or presence of 10 nM 17 β -estradiol (E2) and then assayed for CAT activity.

cyclin E による転写活性の増強を認めなかった (Fig. 4A). エストロゲン レセプター/ER α では, 先の報告と同様に^{5,6)}, cyclin D1 において著明な転写活性の増強を認め, これは, エストラジオール非存在下においても認められたが, cyclin E に関しては, 転写活性の増強を認めず (Fig. 4B), cyclin E による転写活性の増強は, AR 特異的であると考えられた.

アンチアンドロゲン剤である, 5-ヒドロキシフルタミド存在下においても cyclin E による転写活性の増強を完全に block することはできなかった (Fig. 5).

2. 細胞周期における検討

ハイドロキシウレアによる G1/S 期 block, ノコダ

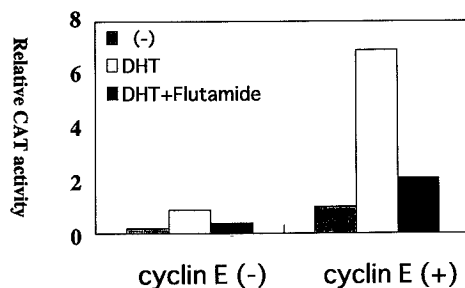


Fig. 5. MDAH041 cells were co-transfected with an AR expression vector, an ARE-CAT reporter plasmid in the absence or presence of the cyclin E expression vector. Cells were incubated for 18 h in the absence or presence of 1 nM DHT and 5-hydroxyflutamide, and then assayed for CAT activity.

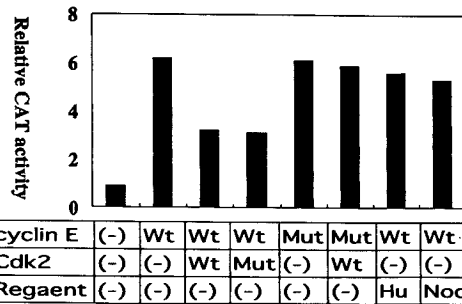


Fig. 6. MDAH041 cells were co-transfected with an AR expression vector, an ARE-CAT reporter plasmid in the absence or presence of an expression vector (3 μ g) for wild type (WT) or the R130A mutant of (Mut) cyclin E, or of an expression vector (5 μ g) for wild type (WT) or a kinase-inactive mutant (Mut) Cdk2. Cells were incubated for 18 h in the presence of 1 nM DHT in the absence or presence of 1 mM hydroxyurea (HU) or nocodazole (Noc; 0.1 μ g/ml, only added during the final 8 h of incubation). Flow cytometry revealed that >70% of cells were arrested at G1-S or M phases by hydroxyurea and nocodazole, respectively (data not shown).

ゾールによる S 期 block とも, cyclin E による AR の転写活性の増強を同様に認めたが, Cdk 2 の wild type および kinase inactive である mutant Cdk 2 を overexpression することにより cyclin E による転写活性の増強が抑制された (Fig. 6). Cdk2 との結合能をなくした mutant cyclin E (R130A)⁷⁾ では変化がなかった (Fig. 6). これらの結果より cyclin E による AR の転写活性の増強は, cell cycle に依存せず, cyclin E/Cdk 2 complex によるものではなく, 非結合型の cyclin E による影響であると考えられた.

3. 前立腺癌細胞における検討

次に, AR positive でホルモン依存性増殖を示す前立腺癌細胞株である LNCap を用い, 検討した. LNCap における PSA の発現に対する影響を Northern Blot により検討したところ, cyclin E の overexpression により PSA mRNA の発現増強を認め, また, AR の発現には影響を与えなかった (Fig. 7). このことより cyclin E が AR の Co-activator として作用していることが示唆された.

4. Cyclin E と AR との結合

MDAH041 細胞に AR (AR full-length, AB 領域, EF 領域), cyclin E を co-transfection し IP-Western を施行した. AR full-length, AB 領域において cyclin E による免疫沈降により AR のバンドが detect され (Fig. 8A, B), cyclin E は AR の AB 領域

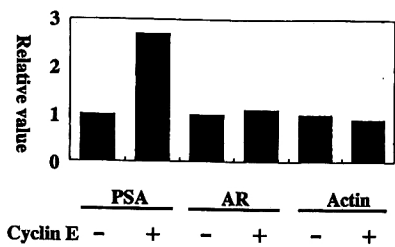


Fig. 7. LNCap cells were transfected with a cyclin E expression vector or with empty vector, and subsequently incubated for 18 h in the presence of 10 nM DHT. Data revealed the relative abundance of PSA, AR, and β -actin mRNA by densitometric scanning.

と結合すると考えられた。また, cyclin A, D1 の免疫沈降では, AR を detect できず (data not shown), cyclin E は AR に特異的に結合すると考えられた。

5. Cyclin E と AR の相互作用

Mammalian two hybrid assay において, DHT の非存在下で, GAL4 AR/AB と cyclin E を, 共に発現させたとき, CAT 活性の著明な上昇を認め (Fig.

9A), GAL4 cyclin E では, GAL4 cyclin E のみで, CAT 活性の上昇があり, GAL4 cyclin E と VP16 AR/AB の両者でさらに CAT 活性の著明な上昇を認めた (Fig. 9B)。これらより, cyclin E は AR の AB

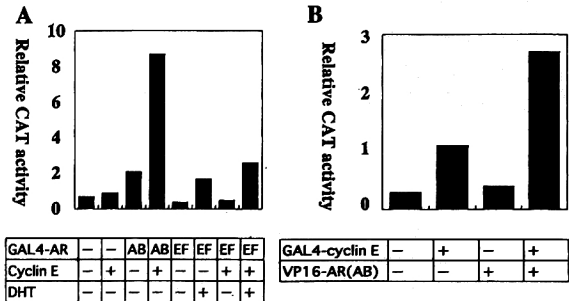


Fig. 9. Functional interaction of cyclin E with the AB domain of the AR. A, HeLa cells were cotransfected with 17M2-G-CAT, GAL4-AR (AB), or AR (EF), and an expression vector for cyclin E. Cells were incubated for 18 h in the absence or presence of 1 nM DHT and then assayed for CAT activity. B, The interaction between GAL4-cyclin E and VP16-AR (AB) was examined in a similar manner.

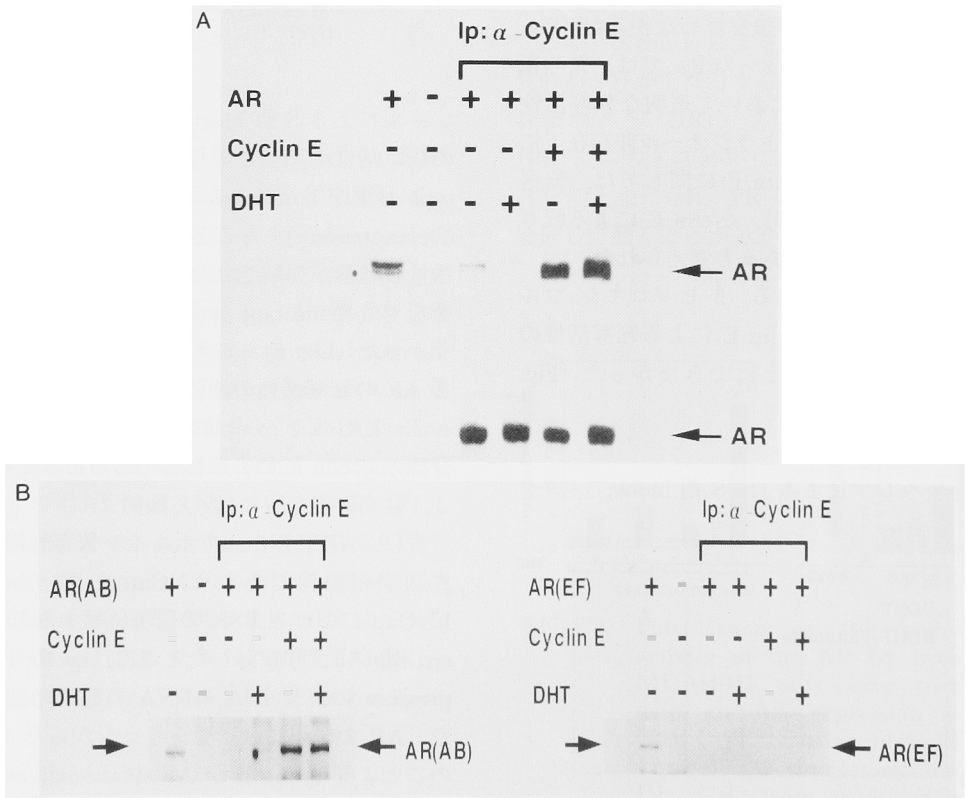


Fig. 8. Physical association of cyclin E with AB domain of AR *in vivo*. MDAH041 cells were co-transfected with expression vector for cyclin E and for either full-length AR, the AB, or EF regions of AR. Cells were incubated for 18 h in the absence or presence of 1 nM DHT, lysed, and subjected to immunoprecipitation (IP) with antibodies to cyclin E or with normal rabbit serum (NRS) as a control. The resulting immunoprecipitates were then subjected to immunoblot analysis with anti-AR (N-20) or anti-AR (C-19). The first two lanes of each represent direct immunoblot analysis of cell lysates.

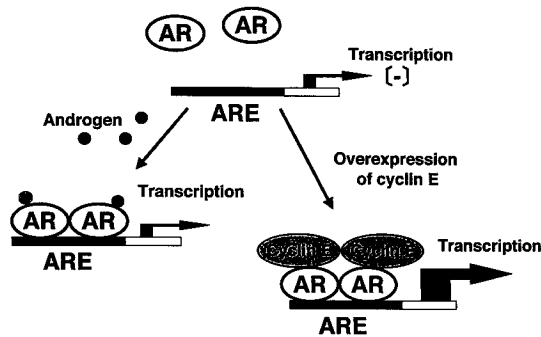


Fig. 10. Functional and physical interaction between cyclin E and the AR.

領域に結合し, Co-activator として作用していることが考えられた。

Cyclin E はテストステロン非存在下においても, AR の AB 領域に結合し AF-1 function を増強していると考えられた (Fig. 10)。これらのことより, 今後, この結合を阻害するような化合物がホルモン抵抗性前立腺癌の治療に有効であるかもしれない。

結 語

核内レセプターとしての AR は, 転写共役因子, クロマチン構造変換因子や転写基本装置を含む巨大な蛋白複合体の中で機能しており⁸⁾, 一方, 細胞周期の

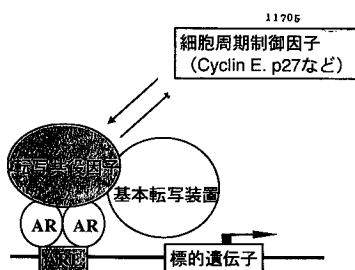


Fig. 11. A functional and physical interaction between nuclear hormone receptors and components of the cell cycle machinery may represent a general mechanism by which the transactivation function of these receptors is regulated through recruitment of coactivators.

制御因子として, いわば, アクセルとブレーキにあたる, サイクリン/Cdk 複合体と Cdk インヒビターは, 細胞周期のチェックポイント機構や DNA の複製, 修飾, 組換え, 分裂などの蛋白複合体と密接な関係にある (Fig. 11)。これらのことを考えあわせると予想もしない相互作用が核内で起っており, 前立腺癌ホルモン療法に大きな障壁となってくる可能性がある。今後のさらなる研究が待たれるところであります。

文 献

- 1) Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, et al.: *In vivo* amplification of androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* **9**: 401-406, 1995
- 2) Kallioniemi O-P and Visakorpi T: Genetic basis and clonal evolution of human prostate cancer. *Adv Cancer Res* **68**: 225-255, 1996
- 3) Miyamoto H, Yeh S, Wilding G, et al.: Promotion of agonist activity of anti-androgens by the androgen receptor co-activator, ARA70, in human prostate cancer DU145 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7379-7384, 1998
- 4) Cato ACB, Skroch P, Weinman J, et al.: DNA sequences outside the receptor-binding sites differently modulate the responsiveness of the mouse mammary tumor virus promoter to various steroid hormones. *EMBO J* **7**: 1403-1410, 1998
- 5) Neuman E, Ladha MH, Lin N, et al.: Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol Cell Biol* **17**: 5337-5347, 1997
- 6) Zwijsen RML, Wientjens E, Klompmaaker R, et al.: CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* **88**: 405-415, 1997
- 7) Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, et al.: Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E. *EMBO J* **19**: 2069-2081, 2000
- 8) 加藤茂明: 核内レセプターと転写共役因子. *Mol Med* **37**: 1170-1176, 2000

(Received on September 3, 2001)
(Accepted on September 6, 2001)