

機関番号：13301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591852  
 研究課題名（和文）：再燃前立腺癌におけるエストロゲン受容体を介したシグナル伝達機構の包括的解明  
 研究課題名（英文）：Comprehensive elucidation of estrogen receptor mediated signal pathways in hormone refractory prostate cancer  
 研究代表者  
 小中 弘之 (KONAKA HIROYUKI)  
 金沢大学・附属病院・講師  
 研究者番号：40334768

研究成果の概要（和文）：再燃前立腺癌におけるエストロゲン療法の意義を再考すると共に、2種のエストロゲン受容体（ER $\alpha$ と ER $\beta$ ）を介したシグナル伝達機構について分子生物学的手法を用いて包括的に解析した。その結果、前立腺癌の増殖・進展においては、ER $\alpha$ が促進的にER $\beta$ が抑制的に働く可能性が明らかになったと共に、ER $\beta$ を標的とした分子標的治療の可能性とER $\beta$ 発現ベクターとそのリガンド Estradiol を用いた遺伝子治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To reconsider a significance of Estrogen-based therapy in hormone refractory prostate cancer and elucidate a comprehensive mechanisms through which two type of Estrogen receptor, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , can differently mediate signal transduction pathways. Consequently, our study made it clear that ER $\alpha$  might act as a pedal but ER $\beta$  as a brake in progression of prostate cancer, and also suggested the possibility of molecular targeting therapy for ER $\beta$  and gene therapy using ER $\beta$  expression vector and its ligand Estradiol.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌，エストロゲン受容体，シグナル伝達，遺伝子治療，SCID マウス

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌はその大部分がアンドロゲン依存性にアンドロゲン受容体（AR）を介して増殖・進展するため、アンドロゲン除去によるホルモン療法が有効である。転移を有する進行性前立腺癌でも初期にはホルモン治療が約80%以上の症例で有効であるが、その半数以上はアンドロゲン非依存性となり5年以内

に再発する。このような再燃前立腺癌の予後は極めて不良であり、あらゆる治療を施行しても再燃後、ほとんどの症例が数年以内に死亡する。現在までの前立腺癌の基礎的研究、新薬の開発、投与方法および各種併用療法にもかかわらず、再燃前立腺癌の予後は改善されることはなく、新たな治療法が開発が待望されているのが現状である。

アンドロゲン非依存性前立腺癌に対する

新たな治療法を開発していく上で、再燃メカニズムの解明は必須である。現在まで、アンドロゲン依存性からアンドロゲン非依存性へのシフトには、AR の構造異常（増幅、変異など）をはじめとして、癌遺伝子・癌抑制遺伝子の異常、増殖因子の変化、カベオリンの発現増大、接着因子の変化やアポトーシス関連の異常等の関与が報告されてきた。しかしながら、エストロゲン受容体（ER）を介したシグナル伝達に着目し、再燃メカニズムの解明を試みた報告は皆無に等しい。

乳癌の増殖・進展における ER（特に $\alpha$ ）の役割はほぼ解明され、それをターゲットとした分子標的治療の開発が着々と進んでおり、臨床的には ER を標的とした selective ER modulators（SERMs）やアロマターゼ阻害剤が広く普及している。一方、前立腺癌の増殖・進展における ER と、そのリガンドの1つであるエストロゲンの役割については様々な争論、異論の存在によって混沌としており、明確なエビデンスの創出はないのが現状である。特に前立腺癌における ER の役割については、それが増殖・進展に対してアクセラ（促進的）なのかブレーキ（抑制的）なのかも含めて未解決な点が多く、ER にはアルファとベータの二つのサブタイプ（ER $\alpha$ とER $\beta$ ）が存在することもそのメカニズムの解明をさらに難解にしている。

エストロゲンについては、その投与によって前立腺癌の増殖・進展が抑制されることは臨床上周知の事実であり、CAB 療法出現以前において、エストロゲン療法は前立腺癌に対するホルモン治療の中心的な役割を担ってきた。現在でも 3rd-line 以降の救済ホルモン療法の一選択肢としてその意義はかるうじて残存している。その前立腺癌の増殖・進展を抑制する主なメカニズムは、従来から視床下部に対する負のフィードバック作用（LH-RH の分泌が抑制される結果、脳下垂体からの LH の分泌が低下して精巣からのテストステロン分泌が抑制されることによる）とされてきた。しかし、以下の実験的事実により、近年エストロゲンの前立腺癌に対する直接的な増殖抑制作用の存在も考えられている。すなわち、1) diethylstilbestrol (DES) が、前立腺癌細胞株 LNCaP, DU145, PC-3 の細胞周期停止とアポトーシスを誘導する。2) DES は DU145 の細胞微小管の形成を阻害し、metaphase arrest を喚起させる。3) DES は前立腺癌細胞のシグナル伝達系を阻害する。4) Estradiol (E2) は TGF- $\beta$ 1 を介して PC-3 の増殖を抑制する。さらには、エストロゲン投与によって、ヒト、あるいはマウス、ラット前立腺に増殖性変化や squamous metaplasia が観察され、エストロゲンが細胞増殖や異型化に関与するという一見矛盾した報告も散見される。このようにエストロゲンの前立腺に対

する作用メカニズムは難解であり、その詳細は未だに明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

アンドロゲン非依存性前立腺癌に対する新たな治療法を開発していく上で、再燃メカニズムの解明は必須である。しかし、これまでエストロゲン受容体（ER）を介したシグナル伝達に着目し、再燃メカニズムの解明を試みた報告はない。従来から前立腺癌におけるエストロゲンと ER の役割に関しては、多くの争論、異論で混沌としており、その詳細は依然として不明である。また、ER には ER $\alpha$ とER $\beta$ の二つのサブタイプが存在することも、そのメカニズムの解明を難解にしている。

そこで、“故きを温ねて新しきを知る”という視点から再燃前立腺癌におけるエストロゲン療法の意義について分子生物学的手法を駆使して再考する。また、前立腺癌の増殖・伸展においては、ER $\alpha$ が促進にER $\beta$ が抑制に関与する”という我々の仮説に基づいて、それを検証すると共に、ER を介したシグナル伝達系につき分子生物学的手法を用いて包括的解明を試みる。さらには ER を標的とした分子標的治療あるいは遺伝子治療の可能性を探索する。

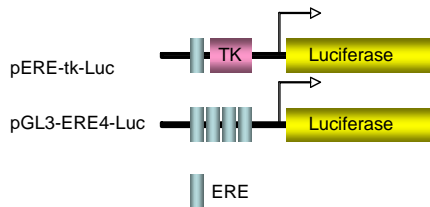
## 3. 研究の方法

① 前立腺癌細胞株における ER $\alpha$ , ER $\beta$ の発現プロファイル: アンドロゲン依存性前立腺癌株 LNCaP, アンドロゲン非依存性前立腺癌株 PC-3, DU145, 正常前立腺上皮細胞 PrEC, 正常前立腺間質細胞 PrSC, 乳癌細胞株(コントロール)を用いて、ER $\alpha$ および ER $\beta$ の発現プロファイルにつき、RT-PCR 法と Western-blot 法によって、mRNA とタンパク質レベルで調べる。さらに、ER $\alpha$ あるいはER $\beta$ の発現が認められた細胞においては、転写因子としてのERの機能を検討するために、免疫染色を用いてリガンドの有無によるER発現部の細胞内局在を同定する。

② Estradiol (E2), DES, SERMs による in vitro 増殖抑制: 前立腺癌細胞株 (LNCaP, PC-3, DU145) における estradiol-17 $\beta$ , DES, さらには Tamoxifen, Raloxifene 等の SERMs, pure antiestrogen (ICI 182,780) 投与時の細胞増殖を WST-1 assay にて解析し, dose-dependent manner に細胞増殖が抑制されるか否かを比較検討する。

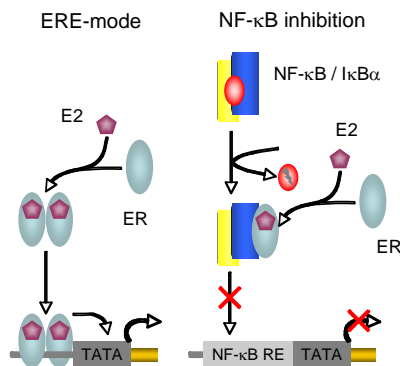
③ E2, DES, SERMs 投与によるリガンド依存性 ER 転写活性の誘導: 以前構築した, レポータープラスミド: pERE-tk-Luc あるいは pGL3-ERE4-Luc (プロモーター領域に ERE を人工的に作製することで ER を介した luciferase 活

性が誘導される 下図)を FuGENE6 にて各細胞株にトランスフェクション後, E2, DES, SERMs 投与によって誘導される ER を介する転写活性をルシフェラーゼアッセイにて評価する. さらに, LNCaP 細胞における E2 投与による PSA プロモーター活性を解析し, E2 による AR を介する転写活性が抑制されるか否かを検討する. E2, DES, SERMs 投与による転写活性を細胞間で比較検討する.



④ ER 転写活性と MAPK および PI3K/Akt シグナル伝達系とのクロストーク: 前立腺癌において, MAPK および PI3K/Akt の賦活化を検討し, ER 転写活性を誘導しうるシグナル伝達系となりうるか検討する. ヒトリン酸化 MAP キナーゼ抗体アレイ(R&D systems 社)を用いて, 特に 3 ファミリー, すなわち ERK1/2, JNK1-3, p38  $\alpha/\beta/\sigma/\gamma$  と Akt のリン酸化状態を網羅的に解析する. さらに, 特異的にリン酸化が亢進した系については, リン酸化抗体を用いた Western-blot 法にて評価し, その系の阻害剤を用いたシグナル抑制実験も予定する. また, PI3K/Akt 系を抑制する PTEN の発現についても RT-PCR 法, Western-blot 法にて評価する.

⑤ ER と NF- $\kappa$ B との転写活性における競合: E2 によって誘導される ER 転写活性によって, NF- $\kappa$ B プロモーター活性, Western-blot 法, 免疫染色にて NF- $\kappa$ B 転写活性が抑制されているか調べる. 逆に, NF- $\kappa$ B 活性を誘導することによって ER 転写活性が抑制されるかについても検討する. ER と NF- $\kappa$ B の転写活性間にクロストークが認められた場合, ER $\alpha$  と ER $\beta$  でその程度に差異があるかも併せて比較検討する. (下図)



⑥ siRNA を用いた ER 発現の抑制による in vitro 抗腫瘍効果: ER $\alpha$  に対する siRNA を作製し, PC-3 細胞における ER $\alpha$  の発現をノックアウトする

ことによる細胞増殖能を WST-1 assay にて検討する. また, ER $\beta$  に対する siRNA も同様に作製し, LNCaP, PC-3, DU145 における ER $\beta$  発現をノックアウトすることによる細胞増殖能を WST-1 assay にて検討する.

⑦ ER $\beta$  の強制発現による ER $\alpha$  を介する転写活性の抑制: CMV プロモーターによって ER $\beta$  がドライブされる発現ベクター (pCMV-ER $\beta$ ) を構築する. 構築したプラスミドが機能するか調べるため, LNCaP, PC-3, DU145 細胞に FuGENE6 を用いてプラスミドを一過性に導入後, ER $\beta$  の mRNA, タンパクの発現をそれぞれ RT-PCR 法, Western-blot 法にて確認する. PC-3 細胞に pCMV-ER $\beta$  を導入し, ER $\beta$  を過剰発現させた場合の ER $\alpha$  の発現自体が, あるいは ER $\alpha$  を介する転写活性が, 抑制されるか否かを in vitro で検討する.

⑧ ER $\beta$  の強制発現と E2 投与による遺伝子治療の可能性: 前立腺癌細胞 LNCaP, PC-3, DU145 に pCMV-ER $\beta$  を導入することによって ER $\beta$  を過剰発現させた細胞と pCMV-null (コントロール) を導入した細胞間で, E2 投与による抗腫瘍効果を WST-1 assay にて比較検討する.

⑨ SCID マウスを用いた担癌モデルの作成: LNCaP 細胞をマトリジェルと共に SCID マウスの背部皮下に移植し, 皮下腫瘍の形成を確認後, castration を施行して腫瘍が再形成されたものをアンドロゲン非依存性前立腺癌のモデルとして以下の実験に使用する. さらに, PC-3 細胞を SCID マウスの背部皮下に移植してアンドロゲン不応性前立腺癌のモデルを確立する.

⑩ E2, DES, SERMs 投与による in vivo 抗腫瘍効果: 前立腺癌マウスの背部皮下モデルに対して, E2, DES, SERMs の腹腔内投与と局所投与による in vivo における抗腫瘍効果を検討する. 抗腫瘍効果は腫瘍のサイズを経時的に計測し, コントロールと比較検討することによって評価する.

#### 4. 研究成果

平成 20 年度は, アンドロゲン依存性前立腺癌株 LNCaP, アンドロゲン非依存性前立腺癌株 PC-3, DU145, 正常前立腺上皮細胞 PrEC, 正常前立腺間質細胞 PrSC, 乳癌細胞株 (コントロール) における ER 発現プロファイルは, ER $\alpha$  の発現は全ての細胞で認められたのみ対し, ER $\beta$  の PC-3 のみであった. ER の発現が認められた細胞については, リガンドの有無による ER の細胞内局在を免疫染色にて評価し, 核内移行が確認された. また, 前立腺癌細胞株におけるリガンド投与後の細胞増殖も解析した. 次に, プロモーター領域にエス

トロゲン応答配列 (ERE) を人工的に挿入したルシフェラーゼ発現ベクター (pERE-tk-Luc) あるいは pGL3-ERE4-Luc) を各細胞株にトランスフェクションすると、リガンド依存的に ER 転写活性が認められた。さらに、前立腺癌細胞株における ER 転写活性と MAPK および PI3K/Akt シグナル伝達系とのクロストークを検討するため、ヒトリン酸化 MAP キナーゼ抗体アレイを用いて網羅的な解析をすすめた。

平成 21 年度は、前立腺癌における ER を介したシグナル伝達機構の包括的解明として、20 年度から引き続いて主として *in vitro* での実験を計画し、ER $\alpha$  と ER $\beta$  の機能解析と NF- $\kappa$ B と競合を中心に検討した。

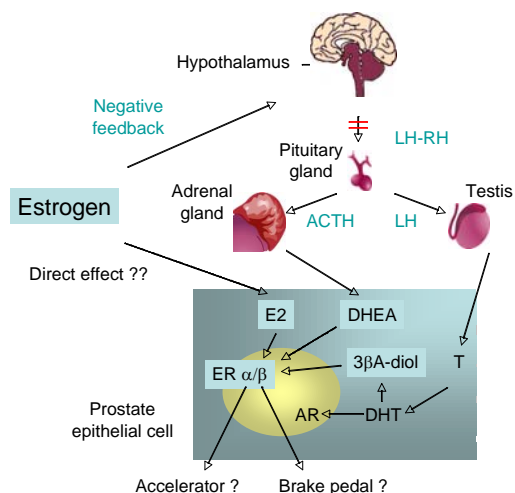
その結果、エストロゲンによって誘導される ER 転写活性によって NF- $\kappa$ B 転写活性が一部抑制されており、逆に NF- $\kappa$ B 転写活性を誘導することによって ER 転写活性が抑制された。よって ER と NF- $\kappa$ B の転写活性間に何らかのクロストークが存在することが示唆された。さらに、新たに構築した ER $\beta$  発現ベクターを FuGENE6 にて LNCaP, PC-3, DU145 細胞に導入し、ER $\beta$  の発現を mRNA および蛋白レベルで確認された。PC-3 細胞に対して ER $\beta$  を過剰発現させた場合、ER $\alpha$  の発現が逆に抑制された。これは、ER $\alpha$  は前立腺癌の進展に促進的と仮定すると、ER $\beta$  を強制発現させること自体が治療ストラテジーの 1 つとなりうる可能性が示唆された。

平成 22 年度は、前立腺癌における ER を介したシグナル伝達機構の包括的解明として、20 年度からの最終年として、以前からの *in vitro* 実験に加えて、1) ER $\beta$  の強制発現と E2 投与による遺伝子治療の可能性、2) SCID マウスを用いた担癌モデルの作成、3) E2, DES, SERMs 投与による *in vivo* 抗腫瘍効果の実験を計画して ER $\beta$  をターゲットにした遺伝子治療の検討に取り組んだ。

その結果、ER を標的とした遺伝子治療実験については、SCID マウスを用いた前立腺癌モデル、ER $\beta$  発現プラスミドを作製し、ER $\beta$  過剰発現させた系と E2 投与の有用性が明らかにした。

以上より、再燃前立腺癌における ER の役割並びに臨床的意義について、ER を介したシグナル伝達機構を解明し、エストロゲンによる前立腺癌治療の可能性を再考すると共に、ER を標的とした SERMs あるいは抗エストロゲン剤を用いた分子標的治療あるいは遺伝子治療の可能性が示唆された。また、“前立腺癌の増殖においては、ER $\alpha$  が促進的に ER $\beta$  が抑制的に関与する”という我々の仮説は、エストロゲンの前立腺癌に対する(直接的あるいは間接的)抗腫瘍効果を検討することを通じて、その仮説を検証することができた。従って、“エストロゲン療法を再考する”ことによって“故きを温ねて新しきを知る”という大

局観はほぼ達成されたと考えられた。



今後の課題として、アデノウイルスベクターを用いて遺伝子治療の検討が残されており、ER $\beta$  発現アデノウイルスベクター作製し、そのベクターと E2 投与を投与することによる実験を予定したい。

#### 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 1 件)

- ① Izumi K, Kadono Y, Shima T, Konaka H, Mizokami A, Koh E, Namiki M., Ethinylestradiol improves prostate-specific antigen levels in pretreated castration-resistant prostate cancer patients., *Anticancer Res.* 30 (2010), 5201-5, 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

- ① 角野佳史, 泉 浩二, 藤田 博, 北川育秀, 小中弘之, 溝上 敦, 高 栄哲, 並木幹夫, 去勢抵抗性前立腺癌患者に対するエチニルエストラジオールの有効性, 第 26 回前立腺シンポジウム, 2010 年 12 月 12 日, 東京コンファレンスセンター (東京都)
- ② 溝上 敦, 熊木美紗子, 島 崇, 成木一隆, 小中弘之, 角野佳史, 北川育秀, 高栄哲, 並木幹夫, 前立腺癌の再燃に対する副腎性アンドロゲンと前立腺癌間質細胞の役割, 第 18 回日本ステロイドホルモン学会, 2010 年 11 月 27 日, 愛知県産業労働センター (愛知県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小中 弘之 (KONAKA HIROYUKI)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：40334768

(2)研究分担者

溝上 敦 (MIZOKAMI ATSUSHI)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：50248580

京 哲 (KYO SATORU)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：50272969