

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	三谷 墨一
学位授与の日付	平成25年3月31日	
論文名	Regulatory Mechanisms of Androgen Receptor Signaling in Castration-Resistant Prostate Cancer (去勢抵抗性前立腺がんにおけるアンドロゲン受容体シグナルの調節機構について)	
論文審査委員	主査	山地 亮一
	副査	乾 隆
	副査	杉本 憲治
	副査	乾 博

論文要旨

前立腺がんは高齢者で発症することから、高齢化が進む日本を含む先進国で罹患率が増加しており、米国では男性の部位別がん罹患率において第2位である。本疾患は日本在住の日本人よりも、ハワイや米国本土在住の日系人で罹患率が高いことから、人種というよりも地域の生活習慣、特に食習慣によって発症リスクが増加すると考えられている。前立腺がんの増殖や進行には男性ホルモンであるアンドロゲンとその受容体であり、転写因子として機能するアンドロゲン受容体（AR）が重要な役割を果たす。リガンドであるアンドロゲンが結合したARは核内へ移行後、アンドロゲン応答遺伝子のプロモーター領域に存在するアンドロゲン応答配列に結合することで前立腺がんの進行に関与する遺伝子の発現を亢進する。ARによる遺伝子の発現調節の際にコアクチベーターといった転写共役因子が動員され、転写活性を亢進する。前立腺がんの増殖、進行がARの支配下にあることから、治療法として去勢によるアンドロゲン除去療法が広く行われている。しかし、去勢後2~3年の内にほとんどの患者が去勢後の低アンドロゲン濃度下でも増殖する去勢抵抗性前立腺がん（castration-resistant prostate cancer; CRPC）を発症する。従って、前立腺がんの死亡率増加はCRPCの発症増加に起因すると言われており、発症を予防することが最良の対策法である。しかし、CRPCが発症する分子機構は不明な点が多く、CRPC発症に対する効果的な予防法は見つかっていない。そこで本研究では去勢後の前立腺がんの生育環境がARシグナルに及ぼす影響に着目し、CRPCの発症の分子機構に関与するタンパク質を同定す

ることを目指した。さらに、「日常的な食習慣の改善による **CRPC** の発症の予防・遅延」をコンセプトとして、**CRPC** の発症に関与するタンパク質を分子標的として **CRPC** の発症を抑制する食品機能性成分を探索し、食によって **CRPC** の発症を予防・遅延することを最終目的とした。

1. 低アンドロゲン濃度下で低酸素は低酸素誘導因子-1 α を介して **AR** シグナルを促進する

去勢による血流の遮断は前立腺がんの生育環境を低酸素状態にする。そこで **CRPC** の発症に去勢後の低酸素状態が関与しているのではないかと仮説を立て、低酸素が **AR** の転写活性に及ぼす影響を解析し、さらに低酸素下で発現するタンパク質が **AR** シグナルの活性化に関与するかについて検討した。ヒト前立腺がん細胞株 (**LNCaP**) を低酸素下 (1% O_2) で培養した結果、低酸素は去勢によって生じる低アンドロゲン濃度下でのみ **AR** の転写活性を促進した。低酸素下の細胞は血管内皮増殖因子や解糖系酵素の発現を増加することで低酸素環境に適応する。これら低酸素応答遺伝子の発現を調節する主要な転写因子である低酸素誘導因子 (**HIF**) -1 α は低酸素下でのみ発現が誘導される。低酸素による **AR** の転写活性化に **HIF-1 α** が関与するかについて **siRNA** を用いて検討した結果、**HIF-1 α** の発現をノックダウンすることで低酸素による **AR** の転写活性化は解除された。本来 **HIF-1 α** は β -サブユニットである **ARNT** とヘテロ二量体を形成し、**DNA** と結合することで転写因子として機能する。**DNA** 結合能を欠損させた **HIF-1 α** を低酸素下の **LNCaP** 細胞で高発現させることで **AR** の転写活性は亢進した。しかし、常酸素下の細胞で **HIF-1 α** を高発現させても **AR** の転写活性に影響はなかった。また組換え体 **AR** と **HIF-1 α** タンパク質を精製し、**HIF-1 α** と **AR** との相互作用部位を検討したところ、**HIF-1 α** の **C** 末端部分が **AR** の **N** 末端ドメイン (**NTD**) に直接結合した。さらに **HIF-1** の β -サブユニットである **ARNT** をノックダウンしても低酸素による **AR** の転写活性の亢進に影響を及ぼさなかった。以上の結果から、低酸素は **HIF-1 α** を介して **AR** の転写活性を亢進し、さらに **HIF-1 α** は **ARNT** とヘテロ二量体形成を必要せずに **AR** の転写活性に関与することが判明した。

2. 低酸素下において **HIF-1 α** と β -catenin は協調的に **AR** シグナルを活性化する

上記の研究結果から低酸素は低アンドロゲン濃度下の **AR** の転写活性を亢進することが示され、**HIF-1 α** は **AR** のコアクチベーターとして機能することが示唆された。しかし、常酸素下で **HIF-1 α** を細胞内で高発現させても **AR** の転写活性化に影響はなかった。これらの結果から、**HIF-1 α** による **AR** の転写活性化には、低酸素下で **HIF-1 α** と相互作用する他のタンパク質が必要であるとの仮説を立てた。そこで、低酸素下で **HIF-1 α** と複合体を形成するタンパク質のうち、前立腺がん細胞で過剰に発現し、既知の **AR** コアクチベーターとして機能する β -cateninに着目した。低アンドロゲン濃度下で **LNCaP** 細胞の β -catenin をノックダウンすることで低酸素による **AR** の転写活性の亢進は解除された。**LNCaP** 細胞で **HIF-1 α** を単独で高発現させても **AR** の転写活性に影響はなかったのに対して、**HIF-1 α** と

β -catenin を共発現させると、HIF-1 α は β -catenin による AR の転写活性化をさらに亢進した。リガンドが結合した AR は N 末端側の NTD と C 末端側のリガンド結合ドメインが相互作用する N-C 相互作用を惹起することで強い転写活性を發揮する。N-C 相互作用は低酸素によって亢進したが、HIF-1 α または β -catenin をノックダウンすることでその亢進は解除された。去勢したヌードマウス (BALB/cSlc-*nu/nu*) に LNCaP 細胞を移植した CRPC 発症モデルマウスを作成し、腫瘍内での β -catenin の細胞内局在を観察した結果、HIF-1 α が発現している低酸素領域の細胞では β -catenin の核内蓄積が増加し、一方 HIF-1 α を発現していない酸素供給が十分な領域の細胞では、 β -catenin の核内蓄積は観察されなかった。また LNCaP 細胞を低酸素下で培養した結果、低酸素により核内の β -catenin 量は増加し、HIF-1 α をノックダウンすると低酸素による β -catenin の核内蓄積は認められなくなった。さらにリガンド存在時の低酸素下でのみ前立腺がん腫瘍において AR と HIF-1 α 、 β -catenin が同一の複合体を形成してアンドロゲン応答配列に結合していることを見出した。つまり、低酸素下で HIF-1 α は β -catenin の核内移行に関与し、核内 DNA 上に存在する AR と β -catenin 量が HIF-1 α の存在下で増加することが示された。以上の結果から、HIF-1 α が β -catenin と協調的に AR シグナルを活性化することを見出し、HIF-1 α は CRPC の発症に関与する鍵因子であることが示された。

3. レスベラトロールは HIF-1 α の発現を抑制することで CRPC の増殖を抑制する

上記の研究結果から HIF-1 α が CRPC 発症の鍵因子であることが判明した。HIF-1 α は食品由来の機能性成分によって発現が調節される。ブドウ果皮に含まれるレスベラトロールは植物由来のポリフェノールのひとつであり、扁平上皮がん細胞において HIF-1 α の発現量を減少する。そこでレスベラトロールが HIF-1 α の発現を抑制することによって CRPC の発症を予防・遅延するのかを *in vitro* と *in vivo* で評価した。低酸素下において LNCaP 細胞をレスベラトロール存在下で培養したところ、レスベラトロールは HIF-1 α の mRNA レベルに影響を及ぼさずに HIF-1 α のタンパク質レベルを減少し、低酸素によって亢進した AR の転写活性を常酸素レベルまで抑制した。レスベラトロールをアフィニティー担体に結合させたレスベラトロール結合担体を作製し、*in vitro* でレスベラトロールと HIF-1 α の相互作用をプルダウンアッセイにて検討した結果、レスベラトロールは低酸素下で発現した HIF-1 α と相互作用することが示された。さらに組換え体 HIF-1 α とレスベラトロール結合担体を混合し、プルダウンアッセイを行ったところ、レスベラトロールは HIF-1 α に直接結合することが明らかとなった。CRPC 発症モデルマウスにレスベラトロール (4 g/kg diet) を 40 日間摂食させ、レスベラトロールによる腫瘍の増殖抑制・遅延効果を経時的に評価した。レスベラトロールの摂食により摂食開始 32 日目からコントロール群と比較して有意に腫瘍の増殖が抑制された。腫瘍における HIF-1 α と前立腺がんのマーカータンパク質である PSA の発現量はレスベラトロールの摂食により減少した。レスベラトロールは腫瘍における β -catenin 発現量に影響を及ぼさなかったが、核内の β -catenin 量を減少した。以上の結

果から、レスベラトロールは **HIF-1 α** の発現量を減少することで核内 **β -catenin** 量の低下を引き起こし、**AR** シグナルを抑制することが判明した。さらにレスベラトロールは低酸素下の **AR** シグナルを抑制することで **CRPC** の増殖を抑制・遅延することが示された。

本研究をまとめると、去勢により惹起された低酸素状態は **AR** シグナルを亢進し、その分子機構は低酸素下で発現が誘導された **HIF-1 α** が **β -catenin** と協調的に **AR** の転写活性を亢進することに起因することが明らかとなった。つまり **HIF-1 α** は **CRPC** における **AR** シグナル活性化の鍵因子であることが判明した。さらに食品成分を用いて **HIF-1 α** の発現を抑制することで **CRPC** の発症を予防、遅延できることが示された。

審査結果の要旨

男性ホルモンのアンドロゲンは、転写因子であるアンドロゲン受容体 (**AR**) に結合し、前立腺がんの進行に関わる遺伝子の発現を調節するので、前立腺がんの治療法としてアンドロゲン除去療法のひとつである去勢が行われている。しかし去勢してから数年のうちに、ほとんどの患者が去勢抵抗性前立腺がん (castration-resistant prostate cancer, **CRPC**) と呼ばれる去勢による低アンドロゲン濃度下でも増殖する前立腺がんを発症する。つまり去勢により一時的に **AR** シグナルは抑制されるが、**CRPC** では再度 **AR** シグナルが活性化する。しかし、その詳細な分子機構は不明であるため、**CRPC** 発症を予防する効果的な方法が見つかっていない。したがって、**CRPC** で **AR** シグナルを活性化する因子が同定できれば、**CRPC** の予防や治療に有用な機能性食品成分の探索や医薬品開発での標的分子になりうると考えられる。本研究は、このような観点から、**CRPC** で **AR** シグナルを活性化するタンパク質を同定し、その分子機構を解析するとともに、同定したタンパク質を標的分子として機能性食品成分によって **CRPC** 発症を抑制・遅延することを目的として行われた。

第1章では、去勢後の前立腺がんの生育環境である低酸素に着目し、**AR** シグナルに及ぼす低酸素の影響を解析した。前立腺がん細胞において、低酸素が去勢後の低アンドロゲン濃度下で **AR** の転写活性を亢進することを見いだした。低酸素下において発現が誘導される低酸素誘導因子 (**HIF**) -1 α は、 β サブユニットである **ARNT** と二量体を形成し、転写因子として低酸素下の細胞応答に関与する遺伝子の発現を調節する。低酸素による **AR** の転写活性の亢進には **HIF-1 α** が関与しているが、**ARNT** は関与していないことを明らかにした。また **HIF-1 α** の C 末端部分が **AR** の N 末端ドメインと直接結合することを明らかとした。以上の結果から、低酸素下において **HIF-1 α** は **AR** と直接結合することで低アンドロゲン濃度下の **AR** シグナルを調節し、さらに **HIF-1 α** は **ARNT** との二量体形成を必要とせずに **AR** の転写活性に関与するという、これまでに報告のない新

規なメカニズムを提唱した。

第2章では、HIF-1 α によるARシグナル活性化の詳細な分子機構を解明した。HIF-1 α と相互作用し、ARの既知の転写共役因子である β -cateninに着目し、低酸素下でのARシグナルにおける β -cateninの機能を解析した。 β -cateninをロックダウンすることで低酸素によるARの転写活性の亢進が解除されること、またHIF-1 α 単独ではARの転写活性に影響はなかったが、 β -cateninによるARの転写活性をHIF-1 α がさらに亢進することを明らかにした。またHIF-1 α が β -cateninの核内移行を促進し、DNA上でARと、HIF-1 α 、 β -cateninが同一複合体を形成していることを見出した。さらに去勢したヌードマウスに前立腺がんを移植して作製したCRPC発症モデルマウスでのCRPCにおけるHIF-1 α と β -cateninの細胞内局在を調べたところ、HIF-1 α の発現している低酸素領域で β -cateninはARが機能する核内に局在し、HIF-1 α が発現していない常酸素領域では β -cateninは細胞質ゾルに局在した。したがって、低酸素下のARシグナルの亢進にHIF-1 α と β -cateninが関与しており、HIF-1 α が β -cateninの機能を調節することから、HIF-1 α がCRPCの発症の抑制・遅延を調節する標的分子となることを示した。

第3章では、HIF-1 α を標的分子として機能性食品成分によりCRPCの発症が抑制・遅延できるかを検証した。ブドウの果皮に多量に含まれるレスベラトロールが、低酸素下の前立腺がんではHIF-1 α の発現量をタンパク質レベルで減少させ、低酸素によって亢進したARの転写活性を抑制することを見いだした。さらにCRPC発症モデルマウスにレスベラトロールを摂食させたところ、コントロール群と比較してCRPCの増殖が有意に抑制されることとレスベラトロール摂食群のCRPCでHIF-1 α と核内 β -cateninのレベルが減少することを見いだした。以上の結果から、レスベラトロールがHIF-1 α の発現量を低下させることで β -cateninの核内移行を抑制し、その結果ARシグナルが阻害されることによってCRPCの発症が抑制されることを示した。

以上、本研究は、去勢により惹起される低酸素状態においてHIF-1 α が β -cateninと協調的にARシグナルを活性化することを解明した。さらにHIF-1 α がCRPCにおけるARシグナル活性化の鍵因子であり、HIF-1 α を標的分子とすることで機能性食品成分によってCRPCの発症を抑制・遅延できることを明らかにした。これらの成果は、生化学、細胞生物学、食品栄養学の分野に大きく貢献するものであり、最終試験の結果と併せて博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。