

新規アンドロゲン応答遺伝子 ABHD2 の同定と
前立腺癌細胞内における機能解析

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系泌尿器科学専攻

高田 将吾

修了年 2016 年

指導教員 高橋 悟

新規アンドロゲン応答遺伝子 ABHD2 の同定と
前立腺癌細胞内における機能解析

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系泌尿器科学専攻

高田 将吾

修了年 2016 年

指導教員 高橋 悟

【目次】

【概要】	1
【緒言】	2
I 前立腺癌と疫学	2
II 治療法	3
III 前立腺癌進行及び去勢抵抗性獲得におけるアンドロゲン受容体の重要性	14
IV 次世代シーケンサーを用いたアンドロゲン応答遺伝子の包括的解析	16
V ABHD ファミリーについての報告	17
【目的】	21
【対象と方法】	21
I 細胞と細胞培地、材料	21
II 組織標本、患者背景	22
III 免疫組織染色	22
IV Small interfering RNA (siRNA) の効果の検討	23
V Methyl Thio Sulfonate (MTS) assay	24
VI Migration assay	24
VII Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(qRT-PCR)	25
VIII Western blot analysis	26
IX Apoptosis assay	27
X Xenograft モデルを用いた腫瘍増殖能の解析	28
XI 統計学的分析	29
【結果】	30
I アンドロゲン応答遺伝子 ABHD2 の同定及びアンドロゲン応答性の検討	30
II 前立腺癌検体における ABHD2 の発現と臨床的意義	31
III ABHD2 発現抑制の前立腺癌細胞への影響	32
IV Xenograft モデルにおける ABHD2 を抑制する siRNA の治療効果	33
【考察】	35
I ABHD2 のアンドロゲンによる発現制御	35
II ABHD2 を介した前立腺癌進展の機序	36
III PI3K/AKT シグナル経路における ABHD2 の関与	37
IV 今後の研究の展望	39
【まとめ】	41
【謝辞】	42
【表・図・図説】	43
【引用文献】	58
【研究業績】	71

【概要】

アンドロゲン受容体 (androgen receptor ; AR) は、前立腺癌の発生に重要な役割を果たしており、AR シグナル伝達は、アンドロゲン応答遺伝子の発現を介して、前立腺癌の進行に深く関わっている。我々は、ChIP-sequence 法を用いて、ヒト前立腺癌組織において過剰発現する新規アンドロゲン応答遺伝子を見出し、今回その中から ABHD2 (α/β -hydrolase domain-containing protein 2) に着目し、機能解析を行った。まず、LNCaP 細胞において、ジヒドロテストステロン投与によって mRNA および蛋白質レベルで ABHD2 の発現量が増加することを確認した。前立腺癌の臨床検体を用いた解析では、ABHD2 の発現強度は Gleason score と相関し、独立した進行予測因子であることが判明した。ABHD2 の発現を特異的に抑制する small interfering RNA (siRNA) を用いて、Methyl Thio Sulfonate (MTS) assay、migration assay、apoptosis assay を実施したところ、ABHD2 の発現を抑制することによって細胞増殖および遊走能が抑制され、アポトーシスは促進された。また、興味深いことに、LNCaP 細胞に docetaxel 投与することによって ABHD2 の発現量の増加を認めた。さらに、ABHD2 を発現抑制することによって docetaxel 投与下での LNCaP 細胞のアポトーシスがより促進される傾向にあったことから、

ABHD2 の発現が docetaxel 治療抵抗性に関与している可能性が示唆された。*in vivo* においては、ヌードマウスに LNCaP 細胞を移植し、siRNA 投与にて ABHD2 の発現を抑制させると有意な腫瘍増殖抑制作用を示した。

本研究の結果より、ABHD2 が前立腺癌進行および docetaxel 治療抵抗性において重要な役割を果たしていることが考えられ、ABHD2 を標的とした新たな治療法の開発や新たな診断マーカーとしての応用へと繋がる可能性が示唆された。

【緒言】

I 前立腺癌と疫学

前立腺は腎臓、膀胱、尿道といった泌尿器の中の一つであり、男性のみに存在する臓器である。膀胱の下方で尿道を取り囲むように存在し、前立腺液を分泌することによって、精子の栄養と保護をする役割を担い、排尿にも大きく関与すると考えられている。前立腺癌（Prostate Cancer ; PCa）は、主に前立腺辺縁領域に発生し、そのほとんどが腺癌である。

前立腺癌の 2011 年度の全国推定年齢調整罹患率（基準人口；昭和 60 年モデル人口、人口 10 万対）は 66.8 であり、胃癌、大腸癌に次いで第 3 位となつて

いる。これは男性における全部位悪性腫瘍のうち 14.8%を占め、近年急激な増加傾向を示している⁽¹⁾。予測されている前立腺癌の年間推定罹患数の今後の推移は、2010～2014 年では 78,728 人であるが、2015～2019 年には 86,800 人と胃癌に次いで第 2 位となり、2020～2024 年では胃癌を超えて第 1 位となり 105,800 人に到達すると言われている⁽²⁾。

また、2011 年度の全国推定年齢調整癌死亡率は 7.8 であり、肺癌、胃癌、大腸癌、肝臓癌、膵臓癌、食道癌に次いで 7 番目である⁽¹⁾。死亡者数においても近年増加傾向であり、1970 年代では全年齢前立腺癌死亡者数は約 1,000 人であったのに対し、2011 年には 10,800 人と 10 倍以上に膨れ上がり、罹患者数と共に今後も増加していくと予測されている⁽²⁾。

II 治療法

前立腺癌の治療法は、手術療法、放射線療法、内分泌療法、化学療法がある。前立腺癌は治療の選択肢が多いので、病期や癌の悪性度だけでなく、患者の期待余命や治療による侵襲性および合併症などを考慮し、その患者に合った治療法を選択することが可能である。特に低リスクの限局性前立腺癌には、進行が遅く、無治療であっても生命に影響を及ぼさない可能性のものがあると考えられており、前立腺癌マーカーである **prostate specific antigen (PSA)** の血中濃

度値を定期的に測定し経過観察を行う PSA 監視療法という方法を選択する場合もある。

1. PSA 監視療法

限局性前立腺癌と診断された場合でも、Gleason score や悪性度の低い癌がごく少量のみ認められた場合は、治療を開始しなくても余命に影響がないような臨床的に意義のない癌であると判断し、PSA 値の経過をみながら積極的な治療介入のタイミングを見計らっていく PSA 監視療法を選択する場合がある。特に高齢者の場合は、なるべく体に負担の少ない治療法を選択していくことが大切であるため、非常に重要な治療方法であると考えられている⁽³⁾。Gleason score とは前立腺癌の組織学的悪性度の指標であり、癌組織の腺構造と増殖パターンを基盤とした 5 段階分類法にて判定し、優勢な組織型と随伴する組織型の和を 2 から 10 までの 9 段階に分類し、現在国際的に最も広く使用されている。

2. 手術療法

前立腺癌が前立腺内にとどまっている限局性前立腺癌の場合では、根治的治療法として、手術療法が第一にその選択肢として挙げられる。骨盤内リンパ節

郭清を実施し、精嚢や精管の一部と共に前立腺を摘出することによって、癌細胞の完全切除が可能のため、現在最も根治性の高い治療法として位置付けられている⁽⁴⁾。また、完全切除できなくとも術後に放射線療法あるいは内分泌療法を追加することができ、予後が良好になることが最も期待できる可能性を有する治療法と考えられている^(5,6)。しかし、当然ながら侵襲の高い治療法であり、一般的に前立腺全摘除術の適応と考えられるのは、完全切除可能な病態であることに加え、10年以上の期待余命があり、健康状態や合併症に問題がない症例とされている⁽⁷⁾。手術方法としては、開腹手術、ミニマム創内視鏡下手術、腹腔鏡手術、ロボット支援下手術などがあるが、近年は器具や技術の進歩により、腹腔鏡や手術支援ロボットを使用した方法が主流となってきている。また、最近ではロボット支援下手術が世界的に急速に普及されてきており、現在米国の前立腺癌手術の多くはロボット支援下手術であり、本邦でも2012年に前立腺癌に対し保険適用となったことから、積極的に導入し施行されている。さらに勃起機能を司る神経を温存する神経血管束温存手術も実施可能であり、症例によっては癌の根治性に問題がある場合を除き、勃起機能や尿失禁などの機能回復についても配慮された治療法が選択可能となっている。

3. 放射線療法（外照射、密封小線源療法）

前立腺癌に対する放射線療法は、近年著しく発達しており、限局性前立腺癌に対する根治的治療法の選択肢として注目されている。体への負担が少ないことが大きな利点であり、高齢で合併症を有するような患者でもほとんどの場合で問題なく実施でき、幅広い症例で適応可能な治療法である。さらに、放射線療法の治療成績は前述した手術療法とほぼ同等と言われており⁽⁸⁾、治療後のQOLが高いことから早期前立腺癌の治療法として選択される割合が増えてきている。Gleason score や PSA 値が高いハイリスクな限局性前立腺癌症例においては、内分泌療法と組み合わせて放射線療法を実施することによって良好な成績が報告されており、中～高リスク症例に対しても有用な治療であると考えられている^(9, 10)。また、近年のコンピューター技術の進歩とあいまって放射線療法は革新的な進歩を遂げており、CT 画像とコンピューターを用いた三次元原体照射法（three-dimensional conformal radiation therapy ; 3D-CRT）や、さらに進歩した強度変調放射線治療（intensity modulated radiation therapy ; IMRT）という新たな放射線治療法が開発され、日本でも積極的に導入されている。これらにより、周囲の正常組織への照射を減らし、より選択的に腫瘍に放射線が照射可能となったことから、高い放射線量を用いた治療が実施可能となり⁽¹¹⁾、今後もさらに発展していく治療方法であると期待されている。

外照射治療とは別の選択肢として密封小線源永久挿入療法 (brachytherapy) があり、本邦では 2003 年 9 月から開始されている。ヨウ素 125 が密封された約 4.5mm のチタンカプセルを、前立腺内に約 50~100 個埋め込み、癌細胞へ直接放射線を照射する方法である。低リスク症例が良い適応とされているが⁽¹²⁾、中リスクおよび高リスク症例に対しても外照射や内分泌療法と組み合わせて実施することが可能である。現在、ヨウ素 125 シード線源による密封小線源永久挿入療法は限局性前立腺癌の標準的治療法の一つとして定着しており、その有効性は多くの報告にて確認されており、生化学的非再発率は手術に匹敵するとされている⁽¹³⁾。

4. 内分泌療法 (ホルモン療法)

手術療法や放射線療法は早期癌にのみ適応があり、転移を有する進行性前立腺癌においては内分泌療法を実施する。前立腺癌は、精巣や副腎皮質から産生されるアンドロゲン (男性ホルモン) の刺激によって増殖・進行するという性質を持っており⁽¹⁴⁾、内分泌治療によりアンドロゲンを抑制することによって前立腺癌の進行を防ぐことができるのである。

前立腺癌におけるアンドロゲンシグナル経路はリガンドであるアンドロゲンから始まり、標的遺伝子を活性化することにより癌の進行及び悪性を引き起

こすことが知られている。アンドロゲンは、ステロイドホルモンに分類され、テストステロン、ジヒドロテストステロン (**dihydrotestosterone ; DHT**)、ジヒドロエピアンドステロンの3種類が存在する。血液中ではテストステロンが最も高濃度であり、約95%が精巣から分泌され、精巣や副腎皮質から分泌されたテストステロンが前立腺細胞に作用することでアンドロゲンシグナル経路の活性化が開始される。テストステロンは、前立腺細胞内に取り込まれると、まず5 α 還元酵素によって更に活性の高いDHTに変換され、アンドロゲン受容体 (**androgen receptor ; AR**) と結合する。DHTは、テストステロンに比べARのリガンド結合領域 (**LBD**) 内の結合力が高く、前立腺細胞において主要なリガンドであり、ARと結合して、共役因子群と複合体を形成し核内へ移行する。そして、この複合体を形成したARは、ARのDNA結合領域 (**DBD**) を介して標的となる遺伝子 (アンドロゲン応答遺伝子) のDNAの上流にあるプロモーター及びエンハンサー領域内に存在するアンドロゲン受容体結合配列 (**androgen response element ; ARE**) に結合し、転写因子として働き、mRNAと蛋白の発現を調節しアンドロゲン作用を現す⁽¹⁵⁾ (図1)。アンドロゲン応答遺伝子の中には、前立腺癌の細胞増殖や抗アポトーシスに対し促進的に働き、前立腺癌の発生および悪性を促すものが存在し⁽¹⁶⁻¹⁸⁾、このアンドロゲンシグナル経路が前立腺癌発生・進行のメカニズムの主体である。したがって、アン

ドロゲンを阻害することで AR を介したアンドロゲンシグナル経路を抑制する抗アンドロゲン療法は、進行性前立腺癌において確立された治療法となっている。

内分泌療法は、アンドロゲンの分泌を抑制・除去することによってアンドロゲンシグナル経路を不活性化し、前立腺癌の勢いを抑える治療法であり、主に転移を有する進行性前立腺癌に対して行われる。歴史的には、1941 年に Huggins 博士らが進行性前立腺癌患者に対し両側精巣除去術を実施し、癌の進行抑制を認めたことから、「精巣から分泌されるアンドロゲンによって前立腺癌が進行する」という事実を発見し⁽¹⁹⁾、ノーベル医学生理学賞を受賞したことから始まっている。以来 70 年以上にわたり、内分泌療法の基本的な概念は変わっておらず、前立腺癌に対する標準的治療法の一つとなっている⁽²⁰⁾。現在は両側精巣摘除による外科的去勢術のみではなく、黄体化ホルモン刺激ホルモン (luteinizing hormone-releasing hormone ; LHRH) 製剤による薬物的去勢が開発され、アンドロゲン除去療法として実施されている。さらに、前立腺癌細胞内で DHT と AR の結合を阻害する抗アンドロゲン剤という薬剤を投与することによって、精巣以外から分泌されたアンドロゲンの作用をブロックすることができ、アンドロゲン除去療法と抗アンドロゲン剤を組み合わせた治療法を複合アンドロゲン阻害療法 (combined androgen blockade ; CAB) もしくは最

大アンドロゲン阻害療法（maximum androgen blockade ; MAB）と呼び、世界的な標準的治療法となっている^(21, 22)。

内分泌療法はほとんどの進行性前立腺癌患者に対して効果を発揮し有効であるが、副作用として、投与直後から起こりうるホットフラッシュ（ほてり）、性功能障害、女性化乳房、乳房腫脹や圧痛、長期投与により骨塩量の低下などが出現する。また、内分泌療法の治療効果の持続期間は個人差があり、多くの場合は治療開始から数ヶ月から数年で治療効果がなくなってしまう。そこで、内分泌療法の奏功期間を可能な限り長く保つために、抗アンドロゲン剤交替療法と呼ばれる治療法が実施されている。初回に使用した非ステロイド性の抗アンドロゲン剤を別の抗アンドロゲン剤へ変更することによって、再度治療効果を発揮し⁽²³⁾、さらに不応となった場合は、ステロイド性抗アンドロゲン製剤やエストロゲン製剤に変更していく方法である。また、抗アンドロゲン剤を中止することで一定期間 PSA 値の低下や病状の改善を認める場合があり、抗アンドロゲン除去症候群（anti-androgen withdrawal syndrome ; AWS）と呼ばれ、AWSを確認することは CAB 療法の奏功期間を長くするために有効であると考えられている⁽²⁴⁾。

5. 抗癌化学療法

内分泌療法の大きな問題点は、抗アンドロゲン剤交替療法を行ったとしても治療効果の持続期間には限りがあり、多くの症例が数年以内に内分泌療法抵抗性となり、去勢抵抗性前立腺癌 (castration resistant prostate cancer ; CRPC) となる点である。現在、CRPC に対する有効な治療法は限られているが、タキサン系の抗癌剤であるドセタキセル (docetaxel ; DTX) がその第一の治療法として行われている。ドセタキセルは微小管脱重合阻害薬と呼ばれる種類の薬剤であり、細胞の β -チューブリン・サブユニットに結合し、微小管の脱重合を阻害することによって細胞周期停止およびアポトーシスを誘導する作用を持つ。2004 年に欧米で行われたドセタキセルを使用した大規模ランダム化試験の結果が発表され、CRPC に対するドセタキセルの生存期間延長が実証されて以来、現在まで広く使用されてきた抗癌剤である^(25, 26)。しかしながら、ドセタキセルによる治療を実施したとしても、CRPC はドセタキセルに対する耐性を獲得し、いずれは治療抵抗性となってしまうことが問題となっており、現在も CRPC に関する研究によって、次なる治療法として様々な新規治療薬が開発されている。

6. 新規治療薬

(1) LHRH アンタゴニスト

アンドロゲン除去療法として使用している LHRH 製剤は、従来のものは LHRH アゴニストであり、フレアアップと呼ばれる投与後の一時的なテストステロンの上昇がみられ、尿路閉塞や転移巣に由来する骨痛、脊髄圧迫などの臨床症状を呈することがある。これに対してテストステロンの上昇を伴わない LHRH アンタゴニストが開発・承認され、現在日本でも使用開始されており、フレアアップを起こさず内科的去勢が可能となっている。

(2) 第二世代抗アンドロゲン剤 (エンザルタミド ; enzalutamide)

エンザルタミドは、AR のシグナル伝達を複数の段階で阻害する第二世代の経口アンドロゲン剤として開発され、AR に対する親和性が従来の抗アンドロゲン剤であるビカルタミドの約 10 倍であり、高い AR への結合阻害能を有する他に、核内への AR の移動を阻害する作用も示されている⁽²⁷⁾。海外で実施された大規模第三相臨床試験の結果より、エンザルタミドの有効性が示され^(28, 29)、日本でも承認となり 2014 年 5 月からドセタキセル投与後の CRPC 患者に対し使用が開始され、現在ではドセタキセル投与前の CRPC 患者に対しても使用可能である。

(3) CYP17 阻害剤 (アピラテロン ; abiraterone)

CYP17 (cytochrome P450 17 α -hydroxylase / 17,20 lyase) はコレステロールからアンドロゲン合成を行う合成酵素の一つある。CRPC では CYP17 の

発現亢進を認め、この経路の活性化によって去勢下でも微量のテストステロンが合成され、前立腺癌細胞内にアンドロゲン供給がなされていると報告されている⁽³⁰⁾。アピラテロンは、アンドロゲン生合成に必要な酵素である CYP17 を選択的に阻害する薬剤であるが、精巣のみならず、副腎や前立腺癌組織内など全てのアンドロゲン産生臓器に作用することで、より強くアンドロゲン産生を抑制可能である。従来の LH-RH 製剤などによる去勢の定義は血清テストステロン値 50 ng/dl 以下とされるが、この薬剤を使用すると 2 ng/dl 以下にテストステロンが制御される。大規模第三相臨床試験を経て、日本では 2014 年 9 月から CRPC 患者に対し使用可能となっている⁽³¹⁾。

(4) タキサン系新規抗癌剤（カバジタキセル； cabazitaxel）

カバジタキセルは、ドセタキセルと同じタキサン系の抗癌剤であるが、MDR-1 遺伝子によりコードされる多剤耐性因子である p 糖蛋白の親和性が低く、細胞外へ排泄されにくいことから⁽³²⁾、ドセタキセル耐性となった CRPC に対して有効性を示す可能性のある薬剤として注目されている。ドセタキセル治療後の CRPC に対して 2010 年米国で、2011 年欧州で承認を受け、日本でも 2014 年 9 月から使用開始が認められている⁽³³⁾。

Ⅲ 前立腺癌進行及び去勢抵抗性獲得におけるアンドロゲン受容体の重要性

進行性前立腺癌の治療の最大の問題点は、内分泌治療抵抗性となった CRPC に対して、前述した抗癌化学療法や新規前立腺癌治療薬による治療を行ったとしても、一定の生存期間延長効果は見込めるものの、最終的には全ての薬物治療に対して抵抗性を獲得してしまうことである。したがって、現在は CRPC に対する治療法として未だ十分なものは確立しておらず、新たな治療法の開発を模索している状況である。一方で、近年の前立腺癌に関する研究において、去勢抵抗性獲得のメカニズムなどについて解析されつつあり、近年報告されたことの一つとして、アンドロゲン濃度は CRPC の細胞内においても依然として上昇がみられ、その増殖・進行において AR は重要であるということが判明している^(34, 35)。

AR はステロイドホルモン受容体ファミリーに属し、N 末端に転写活性化領域 (NTD)、中央に DBD、C 末端に LBD と大きく 3 つのドメイン構造を持つ⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾。NTD は、AR の転写活性を司り、様々な転写補助因子が結合することで AR の活性を調整している。DBD は AR の核内移行および ARE への結合能を有している部位であり、アンドロゲンと複合体を形成することで、その機能を高めている。C 末端の LBD はアンドロゲンが結合する部位であるが、前立腺癌細胞にてみられる AR の構造変異体は、LBD における点突然変異が多く⁽³⁸⁾、

このことは去勢抵抗性獲得の一因として知られている。

近年 CRPC に関する研究が進む中で、去勢抵抗性獲得の機序として解明されたものが幾つか存在するが、主要なものは以下に述べる 3 つであり、いずれも AR およびアンドロゲンシグナル経路に関連している。

① AR の活性増強 (Hypersensitivity)

酸化ストレスなどによる AR の過剰発現⁽³⁹⁾もしくは転写協調因子の活性変化によるアンドロゲンに対する感受性亢進や転写能の活性化^(40, 41)である。

② AR の突然変異によるリガンド結合特異性の変化 (Promiscuous)

突然変異した AR 構造変異体は、アンドロゲン以外の分子をリガンドとして認識し結合するように性質が変化し、前立腺癌のさらなる進行に関与していると言われている⁽⁴²⁾。内分泌療法を継続中に、抗アンドロゲン剤自体が前立腺癌細胞のリガンドとして作用するようになり、癌が進行するようになる抗アンドロゲン除去症候群と関係している^(43, 44)。

③ アンドロゲン非依存性の AR シグナル経路の活性化 (Outlaw)

AR の構造変化により、種々の成長因子やサイトカインなどによりアンドロゲン非依存下でも AR が活性化され、一部 AR を介さないで直接アンドロゲン応答遺伝子の発現亢進が起こることが報告されている⁽⁴⁵⁾。神経内分泌性分化などの形質転換により AR を介さない経路が活性化され、アンドロゲン非依存性

を獲得する機序も判明している⁽⁴⁶⁾。

これらにより、前立腺癌の進行や去勢抵抗性を獲得する過程において AR を介したアンドロゲンシグナル経路の刺激が維持されており、アンドロゲンシグナル経路の終点であるアンドロゲン応答遺伝子の過剰発現が前立腺癌の進行および悪性化に大きく関与している可能性が示唆されている。したがって、我々は、新たにアンドロゲン応答遺伝子を同定しその機能を解析することは、前立腺癌進行及び去勢抵抗性獲得のメカニズムや新規治療法の解明につながる可能性があると考え、今回、ヒトゲノムにおける AR 結合領域の網羅的な解析と新規アンドロゲン応答遺伝子に関する研究に着手するに至った。

IV 次世代シーケンサーを用いたアンドロゲン応答遺伝子の包括的解析

東京大学大学院医学系研究科抗加齢医学講座では、より直接的なアンドロゲン応答遺伝子を同定するため、AR 陽性前立腺癌細胞株 (LNCaP 細胞) にアンドロゲンを付加し AR 特異抗体にてクロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation ; ChIP assay) を実施し、さらにゲノムタイリングアレイを組み合わせた ChIP-chip 法や、次世代シーケンサーによるシーケンシングを行う ChIP-sequence 法を用いて、ヒトゲノムにおける AR 結合領域を網羅的に解析してきた⁽⁴⁷⁾。これらにより、ChIP-chip 法で 2,872 箇所、

ChIP-sequence 法で 10,392 箇所の ARBS (AR binding site) を同定し、約 500 個の AR 結合アンドロゲン応答遺伝子群を見出している⁽⁴⁸⁾(図 2)。さらに ARBS の最近傍に位置する遺伝子群について、マイクロアレイ法を用いてアンドロゲン刺激による遺伝子発現解析を行い、アンドロゲンで応答する遺伝子群を同定した⁽⁴⁸⁾。それらの遺伝子群について機能解析を行ったところ、前立腺癌の進行に関与するアンドロゲン応答遺伝子やその発現調節をしている転写協調因子を同定された^(16-18, 49-52)。このような網羅的なアンドロゲンシグナルの解析により得られたアンドロゲン応答遺伝子の候補遺伝子群のなかから、本研究では今まで前立腺癌での役割が明らかではない ABHD2 (α/β -hydrolase domain-containing protein 2) について着目し、その機能解析を行うこととした。

V ABHD ファミリーについての報告

ABHD ファミリーは、生体内において非常に幅広く機能する触媒酵素である α/β 加水分解酵素を有する 19 の蛋白質より構成される。また ABHD ファミリーは α/β 加水分解酵素活性ドメイン (α/β -hydrolase fold) を保有するスーパーファミリーの一部である⁽⁵³⁾。このスーパーファミリーには、ABHD ファミリーの他に蛋白分解酵素、脂質分解酵素、エステル分解酵素、脱ハロゲン酵

素、過酸化酵素、およびエポキシド加水分解酵素などの様々な代謝酵素が含まれる⁽⁵⁴⁾。

α/β 加水分解酵素活性ドメインとは、8本の並列した β シートに6つの α ヘリックスが囲むように配置された構造をしており、加水分解酵素活性はループ領域に位置しているヒスチジン残基、酸残基（アスパラギン酸またはグルタミン酸）、求核残基（Nucleophile motif: G (glutamate) X (any residue) S (serine) XG の配列を持つのが ABHD ファミリーの特徴である）によって生じる⁽⁵⁵⁾。また ABHD ファミリーには、アシル基転移酵素活性と関連している構造を持つため、加水分解酵素とアシル基転移酵素活性を有することが知られている⁽⁵⁶⁾。

近年の報告より、ABHD ファミリーの変異は、脂質代謝の先天異常に関与しており⁽⁵⁷⁾、さらに、細胞および動物モデルでの研究では、脂質代謝、脂質シグナル伝達、および代謝性疾患に関与していることが明らかとなった⁽⁵⁸⁾。これらのことから、ABHD ファミリーは脂質代謝およびシグナル伝達に関与する小分子の加水分解または合成に関与していることが示唆されており、ABHD ファミリーと脂質代謝および疾患における生理学的重要性の認識が近年高まっている。例えば ABHD5 は、脂肪分解酵素である ATGL (adipose triglyceride lipase) を活性化することにより、トリグリセリド加水分解酵素活性を最大 20 倍まで

刺激すると言われている⁽⁵⁹⁾。また、ABHD3、ABHD4、ABHD6、ABHD12 においても、脂質代謝経路に関与する酵素の合成及び分解に直接的に作用することが報告されている⁽⁵⁵⁾。さらに、ABHD ファミリーは、癌発症との関連についても報告があり、例えば ABHD3 は卵巣癌や乳癌、骨肉腫細胞株において発現の上昇がみられることが知られている⁽⁶⁰⁻⁶²⁾。また、ABHD7 は、結腸および直腸癌において低メチル化されることが見出されており⁽⁶³⁾、癌遺伝子 ZNF217 の直接的な標的遺伝子であると判明している⁽⁶⁴⁾。ABHD9 は過剰メチル化されることで胃癌、大腸癌、悪性黒色腫などの発症に関与しており⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾、同様に ABHD9 の過剰メチル化は前立腺癌再発にも関連していると報告されている⁽⁶⁸⁾。これらのことから、詳細な機序は不明ながら、ABHD ファミリーが癌発症に関与していることが近年明らかにされつつある。一方、ABHD2 は染色体 15q26.1 上に位置し、11 個のエクソンによってコードされる 425 残基のタンパク質であり、他の ABHD ファミリーと同様に加水分解活性（202 残基に **necleophile motif**, 117 残基にアシル基転移酵素活性モチーフを持つ）カルボキシル末端が細胞の外側に位置する II 型膜貫通タンパク質である可能性が示唆されているが確認はされていない⁽⁵⁵⁾。また酵素として働く基質や生理学的な化学反応も未だ不明である。ABHD2 が関与する病態としては、肺気腫の発症に関与していると報告されている⁽⁶⁹⁾。ABHD2 の発現低下した肺胞上皮細胞において、フォ

スファチジルコリンの分泌低下によりマクロファージが浸潤し、炎症が惹起され、肺胞上皮細胞のアポトーシスが引き起こされることによって肺気腫が発症すると考えられている。また、ABHD2 は血管の平滑筋細胞においても発現がみられ、血管平滑筋の遊走能や血管内膜新生を亢進し、アテローム硬化症の発症にも関与しているとされている⁽⁷⁰⁾。その他には、HIV 治療薬であるラミブジンにより ABHD2 の発現が抑制され、B 型肝炎ウイルスの伝播を阻止することが報告されている⁽⁷¹⁾。癌との関連については、肝細胞癌や胃癌、結腸癌などの癌遺伝子である Sp5 の発現により ABHD2 の発現上昇がみられることから⁽⁷²⁾、癌治療に対する標的遺伝子として注目されつつあるが、現在その機能については明らかでない。

【目的】

本研究では、前立腺癌進行に関わる分子作用機序の解明および新たな前立腺癌の診断マーカーや治療標的としての可能性を見出すため、新規アンドロゲン応答遺伝子として同定された ABHD2 のアンドロゲンによる発現制御機構および前立腺癌細胞における機能について解析を行った。

【対象と方法】

I 細胞と細胞培地、材料

ヒト前立腺癌細胞株として、AR 陽性前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞と、AR 陰性前立腺癌細胞株である PC3 細胞を American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) から購入した。細胞培養は、全て 37°C、5% CO₂ 条件下で、LNCaP 細胞は 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum ; FBS, JPH Biosciene) を添加した RPMI 1640 培地 (Sigma, St Louis, MO, USA) にて行い、PC3 細胞培養には 10% FBS を補充した dulbecco's modified eagle's medium (DMEM ; Sigma, St Louis, MO, USA) 培地を使用した。ホルモン除去として、活性炭 (charcoal) 処理済みの 5% FBS (SIGMA, St. Louis, MO)

を混合した培地にて、DHT 刺激前に 72 時間培養を実施した。DHT と docetaxel および dimethyl sulfoxide (DMSO) は和光純薬工業社から購入した。

II 組織標本、患者背景

前立腺癌の臨床検体は、1985 年から 1998 年の間に日本大学医学部附属板橋病院にて根治的前立腺全摘除術を施行した 102 例を用いた。なお、本研究は、臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省）に従って実施している。平均年齢は 68.1 歳 (50 - 85 歳) であり、術前の PSA 中央値は 26.6 ng/ml (1.5 - 218.5 ng/ml) であった。次に示す通り免疫組織染色を実施した。

III 免疫組織染色

免疫組織化学染色は streptavidin-biotin amplification 法にて実施した。5 μ m の組織切片を脱パラフィン化し、マイクロウェーブ法を用いた加熱による抗原賦活処理を行った。0.3% 過酸化水素メタノール溶液にて内因性ペルオキシターゼのブロッキングを行い、30 分間室温にて 3% スキムミルクに浸した。1 : 100 希釈で anti-ABHD2 抗体 (Abcam, Cambridge, MA, USA) を 24 時間処理したのち、二次抗体は Histofine simple stain MAX-PO (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いて 60 分室温下で反応させ、3,30-diaminobenzidine (DAB) にて

可視化した。抗 AR 抗体で染色した組織を陽性コントロール、抗 AR 抗体の一次抗体を使用せず染色した組織を陰性コントロールとした。

200 倍視野下で免疫染色陽性細胞を評価し、全細胞中の陽性細胞の割合で score 化して分類 (score 0 : なし、score 1 : 1/100 以下、score 2, 1/100 から 1/10、score 3 : 1/10 から 1/3、score 4 : 1/3 から 2/3、score 5 : 2/3 以上) し、染色強度を score 0 : なし、score 1 : 弱、score 2 : 中、score 3 : 強と分類し、合計を immunoreactivity (IR) score とし 0-8 段階で評価した。

IV Small interfering RNA (siRNA) の効果の検討

コントロール siRNA (siControl, 標的配列 :

5'-GUACCGCACGUCAUUCGUAUC-3')⁽⁷³⁾と、今回新たに開発した siRNA

(siABHD2#A, 標的配列 : 5'-GAGTTCGTGTCCTAATGGTCTCT-3' 及び

siABHD2#B, 標的配列 : 5'-CTCGCCACGCATGTTACCTATG-3') を使用し

た。トランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies,

Carlsbad, CA, USA) を用いて、LNCaP 細胞にて実施した。トランスフェクシ

ョンした LNCaP 細胞を以下の V~X の実験にて使用した。

V Methyl Thio Sulfonate (MTS) assay

細胞増殖能を MTS assay にて評価した。96 ウェルディッシュの各ウェルに LNCaP 細胞 (5,000 細胞/ウェル) を入れ、siRNA (siControl、siABHD2 #A、siABHD2 #B) をそれぞれトランスフェクションした後、37°Cにて 24, 48, 72 時間培養後に 10 μ l ずつ Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA) を付加し、Microplate reader (ARVO, PerkinElmer, Waltham, MA) の absorbance 490 nm にて測定した。各条件は 4 ウェルずつ行い、少なくとも 3 回の実験を施行した。

VI Migration assay

細胞遊走能は cell-migration assay にて評価した。まず Matrigel-coated invasion chambers (Becton Dickinson, Biosciences) に、10%FBS を付加した RPMI 1640 培地 300 μ l と各 siRNA (siControl、siABHD2 #A、siABHD2 #B) をトランスフェクションした LNCaP 細胞を 50,000 細胞ずつ入れ、5% CO₂ 下、37°C で 24 時間インキュベートした。その後、30 分間のメタノール固定と、30 秒間のギムザ溶液 (Muto pure chemicals, Tokyo, Japan) で染色し、フィルター下面に存在する細胞数を顕微鏡下 200 倍視野にてランダムに 5 視野観察し計測した。

VII Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

ABHD2 のアンドロゲン応答性を確認するために LNCaP 細胞、PC3 細胞を用いて検討した。ホルモン除去として、各細胞株を 72 時間 charcoal 処理された 5%FBS 混合培地でインキュベートした後、DHT (100 nM) 刺激を 48 時間実施した。TRIZOL (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) にて細胞よりトータル RNA を抽出し、cDNA 合成は iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて mRNA より逆転写合成した。同様に、siRNA による ABHD2 の抑制効果を評価するために、各 siRNA (siControl、siABHD2 #A、siABHD2 #B) をトランスフェクションした LNCaP 細胞からトータル RNA を抽出し、cDNA を合成した。qRT-PCR は ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (TAKARA, Kyoto, Japan) と、試薬は Power SYBR® Green Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を使用し、ABHD2 の遺伝子発現量をそれぞれ定量化し測定した。ローディングコントロールとして GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を用いた。

今回用いたプライマー配列は以下の通りである。

ABHD2

Forward: 5'- CGTATTTGCAGTGGGAAGAATAAGT -3'

Reverse: 5'- GAGTTCGGGAGTCTCCAGCAT -3'

GAPDH

Forward: 5'- GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA -3'

Reverse: 5'- GTGGTCGTTGAGGGCAATG -3'

VIII Western blot analysis

ABHD2 の蛋白レベルにおいてのアンドロゲン応答性を確認するために LNCaP 細胞を使用し実施した。ホルモン除去として、72 時間 charcoal 処理の 5%FBS を混合した RPMI 培地で培養した後、DHT (100 nM) 刺激を 24、48 時間それぞれ実施した。細胞蛋白の回収は whole cell lysates を lysis buffer (NP40 buffer ; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40) にて溶解して行い、蛋白濃度測定は Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて実施した。また、同様の方法で、各 siRNA (siControl、siABHD2 #A、siABHD2 #B) をトランスフェクションした LNCaP 細胞も、細胞蛋白を回収し、蛋白濃度を測定した。それぞれの蛋白 40 µg を NuPAGE Novex 10% Bis-Tris Protein Gels, 1.5 mm, 15 well (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) に入れ電気泳動し、メンブレンは Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) を使用し

転写させた。メンブレンを一次抗体にて 24 時間インキュベートした後、二次抗体に 1 時間反応させ、発色試薬は Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を用いた。各検体で 3 回繰り返し実験した。

今回使用した抗体は以下の通りである。

Rabbit polyclonal Anti-ABHD2 antibody (Abcam Inc., Cambridge, MA)

Rabbit polyclonal Anti-AKT, phosphorylation-AKT (p-AKT) ,

PI3K, phosphorylation-PI3K (p-PI3K) , phosphorylation-mTOR (p-mTOR)

antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

Mouse monoclonal anti- β -actin antibody (Sigma, St Louis, MO, USA)

Anti-rabbit, mouse IgG antibody (Sigma, St Louis, MO, USA)

IX Apoptosis assay

siRNA 投与にて前立腺癌細胞のアポトーシスが誘導されるかどうかを Cell Meter™ Apoptotic and Necrotic Detection Kit (AAT Bioquest, Inc., Sunnyvale, CA) を使用し検討した。まず、12 ウェルディッシュにおいて LNCaP 細胞をそれぞれ合計 9 ウェルに入れ、DMSO 投与群(コントロール群)、TNF α (Tumor Necrosis Factor α) 投与群、docetaxel 投与群として 3 ウェ

ルずつ 3 群に分けた。それぞれ 10%FBS 入りの RPMI 1640 培地にて 48 時間インキュベートし、各 siRNA (siControl、siABHD2 #A、siABHD2 #B) を各群にトランスフェクションした。24 時間インキュベート後に、DMSO と docetaxel 10 nM を投与し、さらに 24 時間インキュベートした。TNF α 投与群には、TNF α 25 ng/ml を apoptosis assay 開始 1 時間前に投与した。Cell Meter™ Apoptotic and Necrotic Detection Kit の試薬をプロトコールに沿って使用し apoptosis assay を実施した。Apopxin がホスファチジルセリンと結合によってグリーンに染色された細胞を、レーザー走査顕微鏡 (VH-8000: Keyence) 200 倍視野にてランダムに 5 視野でカウントし、3 回以上繰り返し実験した。

X Xenograft モデルを用いた腫瘍増殖能の解析

LNCaP 細胞 (3×10^6 個) を 7 週齢の雄ヌードマウス ($n = 20$) の右背側に皮下注射し、移植された腫瘍のサイズを 3 日毎に測定した。腫瘍のサイズが約 100 mm³ に達したら、ランダムに siControl 処理群もしくは siABHD2 処理群に振り分けた。siControl 5 μ g もしくは siABHD2 #B 5 μ g と RNaimax の混合溶液の腫瘍内注入を開始し、4 週間にわたって週 2 回実施し腫瘍のサイズをそれぞれ比較した。本実験計画は東京大学動物実験委員会により承認され生命科学実

験棟において東京大学大学院医学系研究科・研究ガイドライン（実験系）に基づき施行された（承認番号 p08-096）。

XI 統計学的分析

siABHD2 投与群とコントロール群との結果を比較する MTS assay、migration assay、apoptosis assay 及び *in vivo* 実験は、Student's t 検定、one-way ANOVA を用いて評価した。臨床検体を用いた実験では、臨床病理学的な特徴と IR score との相関関係を評価するために、t 検定もしくは χ^2 検定を用いた。また、Kaplan-Meiyer 法を用いて癌特異的生存率曲線を作成し、log-rank 検定 (Mantel-Cox 検定) にて解析した。統計ソフトは Graphpad prism for mac 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) および JMP 9.0 software (SAS Institute Japan, Inc., Tokyo, Japan) を使用し、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

【結果】

I アンドロゲン応答遺伝子 ABHD2 の同定及びアンドロゲン応答性の検討

本研究を行うにあたって、ChIP-sequence 法により、AR 陽性前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞における AR 結合部位をマッピングしたデータを用いて、ABHD2 領域の AR 結合部位を検索した⁽⁴⁷⁾。その結果、イントロン領域に強い AR が結合する領域を 2 ヶ所認めた (図 3A)。さらに同一遺伝子内で、リガンド刺激によって転写活性化マーカーのヒストンメチル化 (K4me1 ; histone H3 monomethylation) 及びアセチル化 (AcH ; histone H3 acetylation) も認められた (図 3A)。また、前立腺癌細胞における ABHD2 の発現レベルを明らかにするために、Oncomine (www.oncomine.org) を使用し検討した。Oncomine とは、各種癌組織でマイクロアレイにより解析した遺伝子発現情報をデータベース化したものである⁽⁷⁴⁾。これにより、ABHD2 は正常前立腺組織と比較し前立腺癌組織において明らかに発現が上昇していることが判明した^(75, 76) (図 3B)。さらに、mRNA や蛋白レベルでアンドロゲン応答性が認められるかを qRT-PCR と western blot analysis を実施し確認した。qRT-PCR では、48 時間の DHT 100nM 処理により LNCaP 細胞において ABHD2 の発現量の増加が認められ、AR 陰性前立腺癌細胞株である PC3 細胞では ABHD2 の発現量の変

化は認められなかった(図 4A)。また、同様に DHT 100nM 刺激を行った LNCaP 細胞を用いて western blot analysis を実施したところ、DHT 依存性に刺激後 24 時間及び 48 時間において同程度に ABHD2 の発現量の増加を認めた(図 4B)。

II 前立腺癌検体における ABHD2 の発現と臨床的意義

今回、前立腺癌の診断のもと根治的前立腺全摘除術を実施された臨床検体 102 例を用いて免疫組織染色を実施し、実際の前立腺癌における ABHD2 の意義を解析した。IR score 6 以下を低発現、7 以上を高発現と定義し、低発現は 66 例、高発現は 36 例であった。Gleason score 及び pathological N stage は ABHD2 の発現と統計学的に有意に相関関係にあり、年齢と serum PSA と pathological T stage に関しては有意な相関を認めなかった(図 5A、表 1)。また、ABHD2 低発現と高発現の群の癌特異的生存率曲線を Kaplan-Meiyer 法を用いて描出したところ、ABHD2 高発現群は有意に癌特異的生存率が低かった ($p < 0.0001$, log-rank 検定, 図 5B)。Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量解析および多変量解析にて、前立腺癌の腫瘍マーカーである PSA と、予後予測因子といわれている Gleason score 及び pathological stage を合わせて解析を行ったところ、Gleason score、ABHD2 immunoreactivity が独立した予後不良因子であることがわかった(表 2)。

III ABHD2 発現抑制の前立腺癌細胞への影響

次に ABHD2 の細胞内での機能を解析するため、ABHD2 の発現を特異的に抑制する siRNA を用い実験を行った。まず、作成した siABHD2 #A、#B を LNCaP 細胞にトランスフェクションし、qRT-PCR および western blot analysis にて ABHD2 発現抑制効果について検討した。結果は、図 6A、B に示すとおり、いずれの siABHD2 をトランスフェクションした場合も、コントロールと比較し ABHD2 の mRNA および蛋白レベルでの発現量は有意に抑制されていた。次にこの siABHD2 #A、#B を用いて細胞増殖能を評価する MTS assay と細胞遊走能を評価する migration assay を実施したところ、ABHD2 をノックダウンすることで細胞増殖能および細胞遊走能がともに有意に抑制された (図 7, 図 8)。さらに ABHD2 とアポトーシスへの関係について apoptosis assay にて解析した。non treat 群、TNF α を投与した群、docetaxel を投与した群の 3 群に分け、全ての群の LNCaP 細胞に siControl、siABHD2 #A、siABHD2 #B をそれぞれトランスフェクションし比較検討した。いずれの群においても siABHD2 を投与した LNCaP 細胞は、siControl を投与した LNCaP 細胞と比較しアポトーシスを起こした細胞数が有意に増加していた (図 9)。また、LNCaP 細胞に docetaxel 投与することによって ABHD2 の発現量がどのように変化するかを qRT-PCR および western blot analysis により検討したと

ころ、docetaxel を投与した LNCaP 細胞において ABHD2 の発現量の増加を認めた (図 10)。

次にアポトーシスを制御する機序について解析するため、抗アポトーシス作用を有する PI3K 経路への ABHD2 の関与があるかを検討した。そのため siABHD2 #A、#B もしくは siControl を LNCaP 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞蛋白を回収し、抗 AKT 抗体、抗 p-AKT 抗体、抗 PI3K 抗体、抗 p-PI3K 抗体、抗 p-mTOR 抗体を用いて蛋白の発現量、リン酸化の有無を western blot analysis により解析した。siABHD2 を投与することによって、p-AKT は明らかに蛋白発現量が低下していたが、p-PI3K と p-mTOR では明らかな変化は認めなかった。また、AKT、PI3K の全体としての蛋白発現量については明らかな変化は認めなかった (図 11)。

IV Xenograft モデルにおける ABHD2 を抑制する siRNA の治療効果

in vivo において、ABHD2 ノックダウン下での腫瘍増殖への影響を検討するために、雄のヌードマウスの皮下に LNCaP 細胞を移植し、発生した腫瘍に対して siABHD2 #B もしくは siControl を注入した。注入開始から 4 週間、経時的に腫瘍のサイズを測定したところ、siABHD2 #B を注入したマウスでは、siControl に比較し、有意に腫瘍増殖が抑制されていた (図 12A、12B)。また、

western blot analysis にて腫瘍内の ABHD2 の発現量を測定し、siABHD2 #B を注入したマウスでは確かに ABHD2 の発現量の低下が確認された(図 12C)。

【考察】

I ABHD2 のアンドロゲンによる発現制御

本研究においては、まず ChIP-sequence 法を用いて同定されていた新規アンドロゲン応答遺伝子 ABHD2 について、そのアンドロゲンによる制御を解析した。ChIP-seq のデータを参照することにより ABHD2 のイントロン領域に強いリガンド依存的な AR の結合を認め、ARBS 周囲には転写活性化におけるヒストン修飾 (K4me1, AcH) が認められ、アンドロゲンによる AR の結合が転写活性化を引き起こしていることが示唆された。次に定量的 RT-PCR ならびに western blot analysis によりアンドロゲンによる ABHD2 の発現変化について解析し、AR 陽性前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞において mRNA レベル、蛋白レベルの両方においてアンドロゲン応答性に発現が強く上昇することを確認された。一方で AR の発現が陰性の PC3 細胞において発現誘導は観察されなかったことは AR の発現誘導への関与が考えられる。以上の結果より、AR によるエピゲノム変化を介する転写活性化が LNCaP 細胞における ABHD2 の発現上昇に結び付いていると思われる。AR 結合による転写活性化を検証するためにはレポーターアッセイにて検討する必要性があり、今後の課題である。

II ABHD2 を介した前立腺癌進展の機序

次に前立腺癌の臨床検体の免疫組織染色を実施し、Gleason score 8 以上もしくはは病理学的にリンパ節転移陽性の High grade の前立腺癌において ABHD2 は有意に高発現しており、ABHD2 が前立腺癌患者の独立した予後予測因子であることが判明した。さらにデータベースによる前立腺癌における ABHD2 の発現解析においても腫瘍において発現が上昇することが見出された。また、ABHD2 を発現抑制させることにより、前立腺癌細胞の増殖能および遊走能低下が認められ、ヌードマウスの皮下に移植した LNCaP 細胞由来の腫瘍増殖についても ABHD2 の発現低下は腫瘍増殖を抑制する効果が認められた。以上より ABHD2 のアンドロゲンによる発現誘導は前立腺癌の腫瘍増殖を促進させることで、癌の進行に関与している可能性が示唆された。

さらに本研究において抗癌剤によるアポトーシスへの ABHD2 の関与を検討した。本実験によりアポトーシスを誘導する抗癌剤として docetaxel を使用した。Docetaxel はタキサン系の抗癌剤であり、前立腺癌の治療に広く使用される薬剤である。微小管を阻害し、有糸核分裂やエンドソーム取り込み、分泌、輸送などの機能を障害することでアポトーシスを誘導する作用を持つ⁽⁷⁷⁾ことが知られている。本研究において、機序は不明ながら docetaxel 投与に反応し ABHD2 の発現量が上昇することが確認され、ABHD2 の発現を抑制すること

によって、TNF α 群と有意差は認められなかったが、docetaxel 投与下での LNCaP 細胞のアポトーシスがより促進する傾向が認められた。

III PI3K/AKT シグナル経路における ABHD2 の関与

PI3K/AKT (phosphoinositide 3-kinase / protein kinase B) 経路とは、何らかの刺激により PI3K がリン酸化を受けることで活性化され、細胞膜のイノシトールリン脂質のリン酸化を促進する。PI3K により触媒され生成されたホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸により AKT のリン酸の活性化を起こす。AKT のリン酸化は mTOR や Bcl-2 (B-cell leukemia / lymphoma 2) ファミリーのメンバーである Bad (bcl-2-associated death promoter)、Bax (bcl-2 associated x protein)、Caspase9、GSK-3 (glycogen synthase kinase 3)、FoxO1 (TNF- α / forkhead box O1) などのリン酸化を通して、細胞死を抑制する生存シグナル経路として知られており、細胞の生存に重要な役割を持つ⁽⁷⁸⁾。PI3K/AKT 経路は、前立腺癌、大腸癌、卵巣癌、神経膠芽腫などにおいて恒常的な亢進が認められている⁽⁷⁹⁾。また、去勢抵抗性前立腺癌細胞内においては、PI3K/AKT 経路を抑制する癌抑制遺伝子 PTEN の発現が低いことが報告されており^(80, 81)、PI3K/AKT シグナル経路の活性化が去勢抵抗性獲得に関与していることが示唆されている。

本研究では、LNCaP 細胞において ABHD2 がどのようにアポトーシスに抑制的な機能を有するかを検討するため、PI3K/AKT 経路に着目し、ABHD2 と PI3K シグナルの関連を western blot analysis により解析を行った。ABHD2 を発現抑制させることにより、p-AKT の明らかな蛋白発現量の低下を認め、ABHD2 が AKT のリン酸化を促進する機能を有する可能性が示唆された。しかしながら、AKT 経路の上流に存在する PI3K では明らかな変化は認めなかった。このことより ABHD2 は AKT のリン酸化に特異的に作用している可能性がある。AKT のリン酸化の制御は、PI3K の下流の PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) などのリン酸化酵素を介する間接経路や癌抑制遺伝子 p53 の標的遺伝子である PHLDA3 (pleckstrin homology-like domain, family A, member-3) により制御されているメカニズムなどが報告されていることから⁽⁸²⁻⁸⁴⁾、今後は ABHD2 による PDK1 や PHLDA3 の機能への変化が見られるか、またそうであれば直接的な結合があるかについて免疫沈降法などを用いて検討する。ABHD2 による脂質への加水分解反応などの化学反応によりリン酸化経路の活性化を促している新たなメカニズムの可能性も考えられる。一方で、本研究では AKT の下流シグナルである mTOR (mammalian target of rapamycin) のリン酸化については関与を確認できなかった。このことは細胞や各種環境の条件による影響も想定され、AKT

経路への関与が確かかどうかについては、今後更なる確認実験が必要と思われる。

IV 今後の研究の展望

今回、新規アンドロゲン応答性遺伝子 ABHD2 の発現抑制が、前立腺癌細胞における細胞増殖、遊走能、抗アポトーシス能を抑制する作用を有することが考えられた。また、前立腺癌の臨床検体を用いた免疫組織染色では、前立腺癌患者において ABHD2 は予後不良因子であることが判明し、ABHD2 の発現抑制はヌードマウスにおける腫瘍増殖を抑制する効果が示された。以上より、AR の下流因子として ABHD2 が前立腺癌増殖および転移において重要な役割を果たしていることが期待された。今後は、前立腺癌細胞における ABHD2 賦活系の解析や、去勢抵抗性前立腺癌細胞内での ABHD2 の機能やメカニズムなどについて解析することによって、ABHD2 を治療標的とする新たな治療法の開発や、新たな診断マーカーおよび予後予測因子としての応用へと繋がる可能性が示唆された。さらに ABHD2 の細胞内における機能は未知であり加水分解反応の基質を同定すること、またその生理的な意義や細胞内シグナル伝達における役割を解析していくことが今後の課題であると思われる。ABHD2 を発現抑制することにより、肺気腫の発症の懸念があり、ABHD2 を治療法標的とする場

合は十分な注意が必要であると考えられる。ABHD2 と前立腺癌発症及び進展との関係を報告したものは本研究が初めてであり、今後のさらなる研究成果により癌の発症と進行の新たなメカニズムの解明も期待される。

【まとめ】

本研究では、新規アンドロゲン応答遺伝子である ABHD2 の前立腺癌における役割を解析した。LNCaP 細胞において ABHD2 は mRNA 及び蛋白レベルでもアンドロゲン応答性があることが確認された。前立腺癌の臨床検体における解析では、ABHD2 の発現強度は Gleason score と相関し、独立した予後予測因子であることがわかった。さらに、siRNA を用いた実験では、ABHD2 の発現抑制は細胞増殖能、遊走能を抑制し、アポトーシスに対して促進的に機能していることが判明した。特に、ABHD2 の発現抑制は *in vivo* での腫瘍増殖を抑制した。本研究により新たな治療法や診断マーカーの開発に繋がる可能性が示唆された。

【謝辞】

本研究の実施ならびに本論文の作成に当たり、様々な御指導、御鞭撻を賜りました日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野主任教授 高橋悟博士に謹んで感謝申し上げます。また、本研究の機会を与えて下さり、親切丁寧な御指導、貴重な御助言を賜りました東京大学大学院医学系研究科抗加齢医学講座特任教授 井上聡博士、東京大学大学院医学系研究科加齢医学講座講師 浦野友彦博士、東京大学医学部附属病院老年病科 高山賢一博士、東京大学医学部附属病院泌尿器科講師 藤村哲也博士、日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野助教 大日方大亮博士、日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野助手 芦荻大作博士に心から御礼申し上げます。本研究を行うにあたり、この上ない環境を与えていただき、また様々な御指導を賜りました日本大学医学部内科学系総合内科総合診療医学分野主任教授 相馬正義博士、日本大学医学部内科学系総合内科総合診療医学分野 藤原恭子博士、日本大学医学部内科学系総合内科総合診療医学分野の皆様は深く感謝申し上げます。そして日常から御指導を頂いております、日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野の皆様は感謝いたします。最後になりましたが、ここに至るまでの間私を見守り、支え続けてくれた両親に心より感謝致します。

【表・図・図説】

表 1 前立腺癌臨床検体におけるABHD2免疫組織染色 (n = 102)

	ABHD2 immunoreactivity		p value
	Low (n = 66)	High (n = 36)	
Age	67.7 ± 6.1	68.8 ± 4.9	0.36
Serum PSA	23.0 ± 29.4	33.8 ± 41.2	0.17
Gleason score			
5 – 7	55	14	<0.0001
8 – 10	11	22	
Pathological T stage			
2	27	18	0.26
3a	26	7	
3b	12	9	
4	1	2	
Pathological N stage			
N0	57	25	0.043
N1	9	11	

全細胞中の ABHD2 陽性細胞の割合を score を用いて分類した

(score 0 : なし、score 1 : 1/100 以下、score 2, 1/100 から 1/10、score 3 : 1/10 から 1/3、score 4 : 1/3 から 2/3、score 5 : 2/3 以上)。

さらに、染色強度を score 0 : なし、score 1 : 弱、score 2 : 中、score 3 : 強と分類し、二つの score の合計を immunoreactivity (IR) score とし 0-8 段階で評価した。IR score 6 以下を低発現、7 以上を高発現とした。

表 2 癌特異的生存率についての単変量解析および多変量解析 (n = 102)

Variable	Univariate			Multivariate		
	Hazard ratio	95% CI	p value	Hazard ratio	95% CI	p value
PSA (>10 vs. ≤ 10)	1.09	0.20-5.93	0.91			
GS (high vs low)	33.0	6.62-598.8	<0.0001	11.32	1.91-216.3	0.0049
Pathological stage (D1 vs. B, C)	10.2	3.63-33.12	<0.0001	4.67	1.54-16.4	0.060
ABHD2 IR (high vs low)	10.3	3.24-45.9	<0.0001	4.93	1.54-16.4	0.0179

GS: Gleason score、IR: immunoreactivity、high GS: 8 以上、low: 7 以下、high IR score 7 以上、low: 6 以下として解析した。

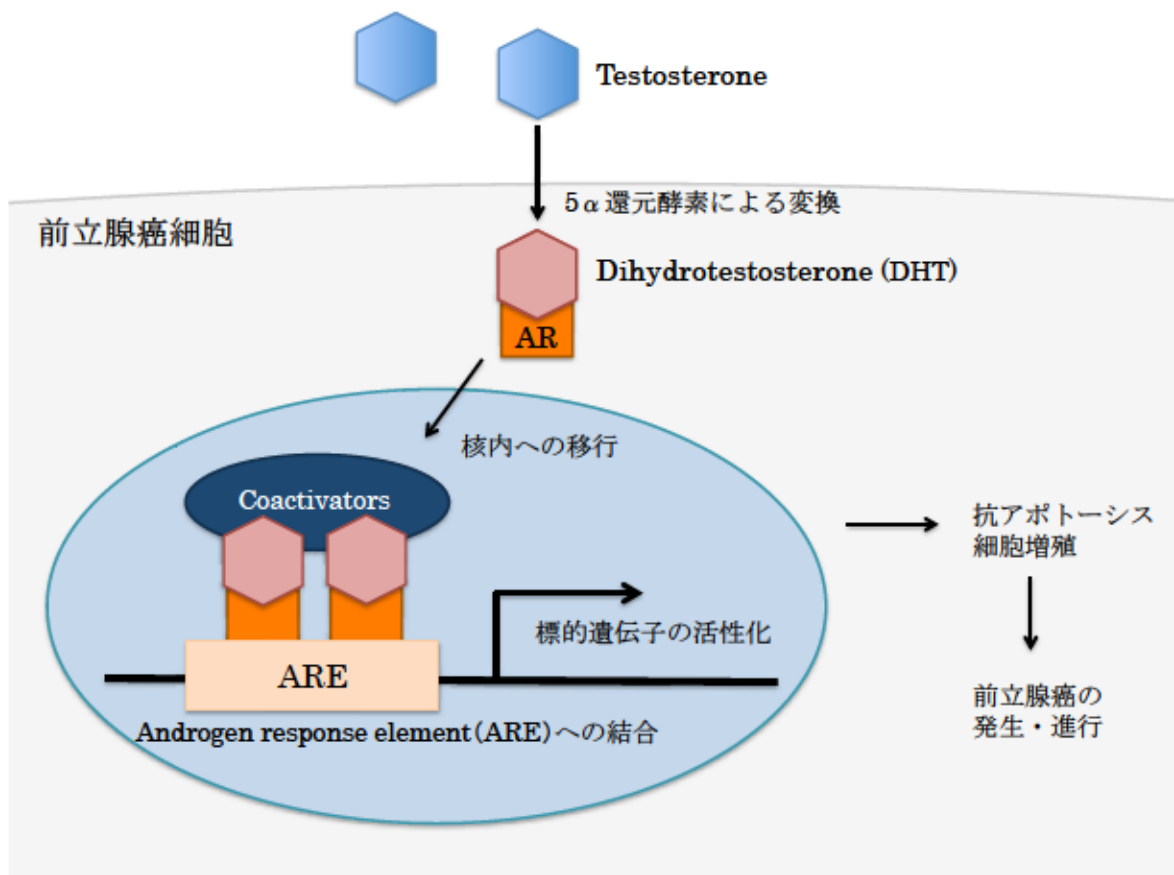


図1 前立腺癌細胞内でのアンドロゲンシグナル経路の概要

生体内で産生されたテストステロンは、前立腺細胞において5 α 還元酵素によりDHTに変換される。DHTはARと結合し、複合体を形成することで、核内へ移行すると、プロモーターおよびエンハンサー領域内に存在するAndrogen response element (ARE)に結合し、他の転写活性化因子とともに、標的となる遺伝子の転写を活性化させる。

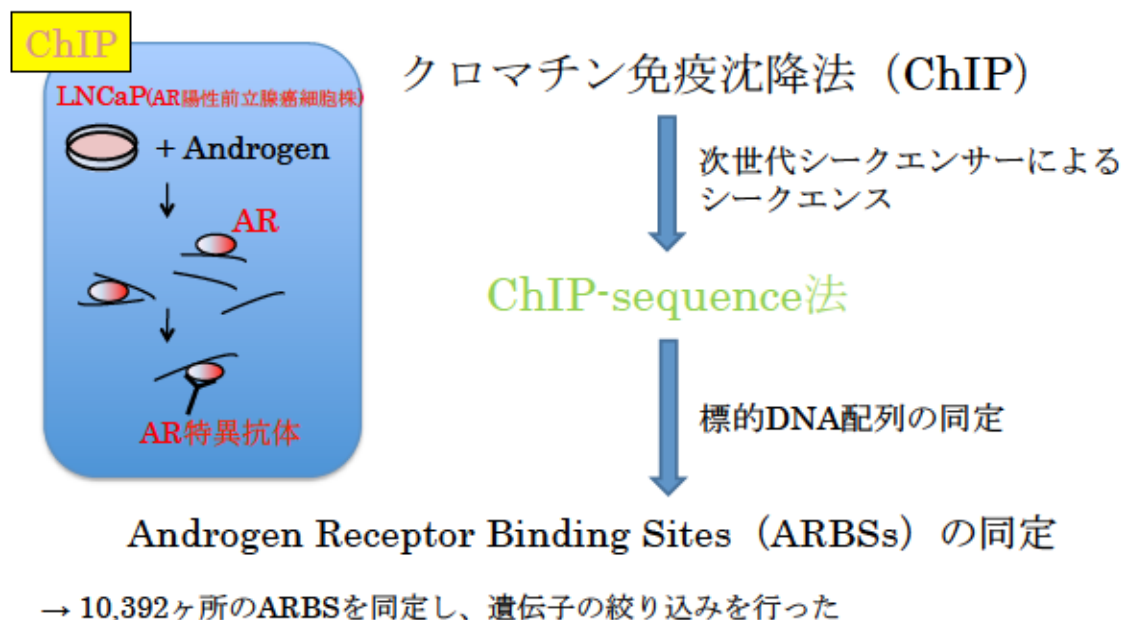


図2 ChIP-sequence法によるゲノムワイドなARBSsの同定

LNCaP細胞にアンドロゲンを付加し、ゲノムDNA上に結合したARに対しAR特異抗体を用いてクロマチン免疫沈降を実施した。さらに次世代シーケンサーを用いたChIP-sequence法により標的DNA配列、Androgen Receptor Binding Sites (ARBSs)を同定した。この方法により10,392箇所のARBSを同定し、ARBSを有する遺伝子の絞り込みを行った⁽⁴⁷⁾。

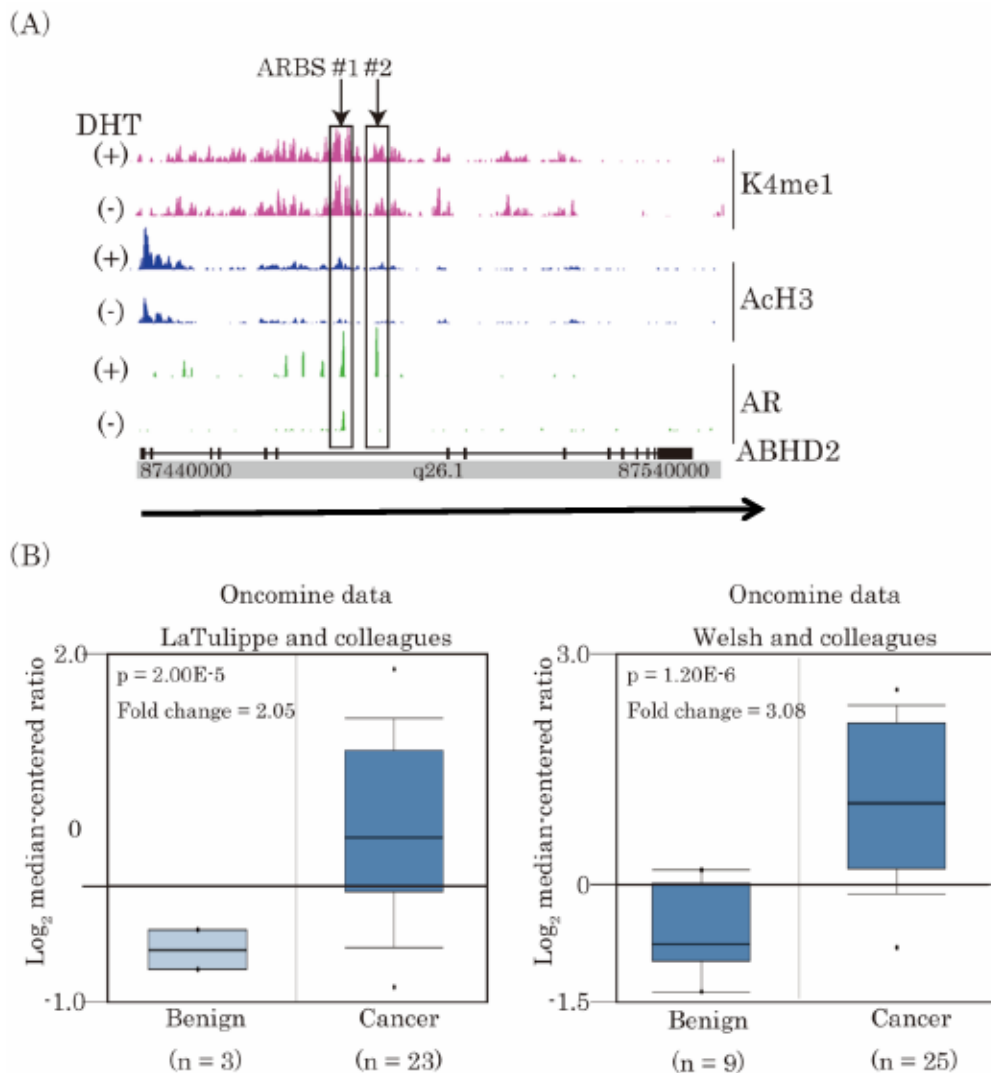
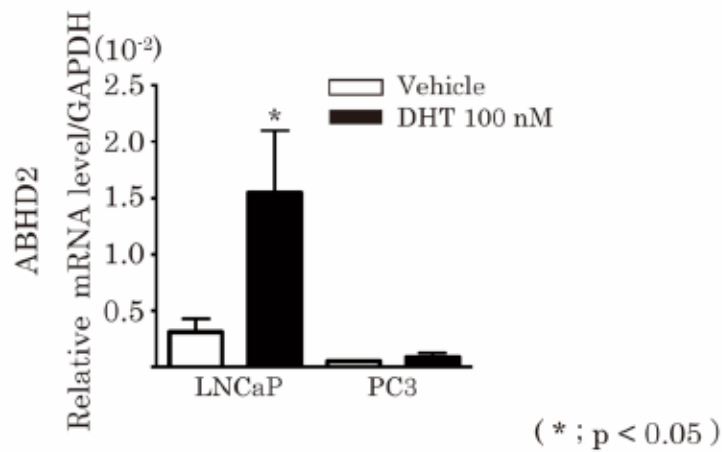


図3 ChIP-sequence 法によるアンドロゲン応答遺伝子 ABHD2 の同定

(A) LNCaP 細胞における ChIP-seq 解析の結果。Genome browser 上において AR 結合、ヒストン修飾部位 (K4me1, AcH3) の ChIP-seq のシグナルを表示した。ABHD2 遺伝子領域を表示しイントロン領域に 2 か所 AR の結合が強い ($p < 10^{-5}$) 領域である ARBS を検出した。矢印は遺伝子の向きを示す。

(B) Oncomine 内の LaTulippe らおよび Welsh らの報告から、マイクロアレイによる正常前立腺組織内および前立腺癌組織内での ABHD2 発現量の比較。

(A) qRT-PCR



(B) Western blot analysis

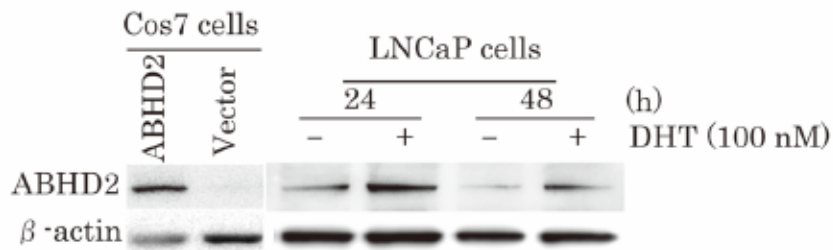


図 4 ABHD2 の mRNA および蛋白レベルでのアンドロゲン応答性発現解析

(A) LNCaP 細胞、PC3 細胞を用いて、それぞれにホルモン除去培地で 3 日間培養を行った後、Vehicle もしくは DHT (100nM) を投与 48 時間後に qRT-PCR にて mRNA レベルでの ABHD2 の発現を定量化した。ローディングコントロールとして GAPDH を用いた。結果は平均値 \pm 標準偏差 (SD)、n=3 にて提示した。

(B) Western blot analysis においては、LNCaP 細胞を用いて、同様に Vehicle もしくは DHT (100nM) を投与し、24、48 時間後に細胞蛋白を回収し、それぞれ蛋白レベルでの ABHD2 の発現量を比較した。ローディングコントロールとして β -actin を用いた。

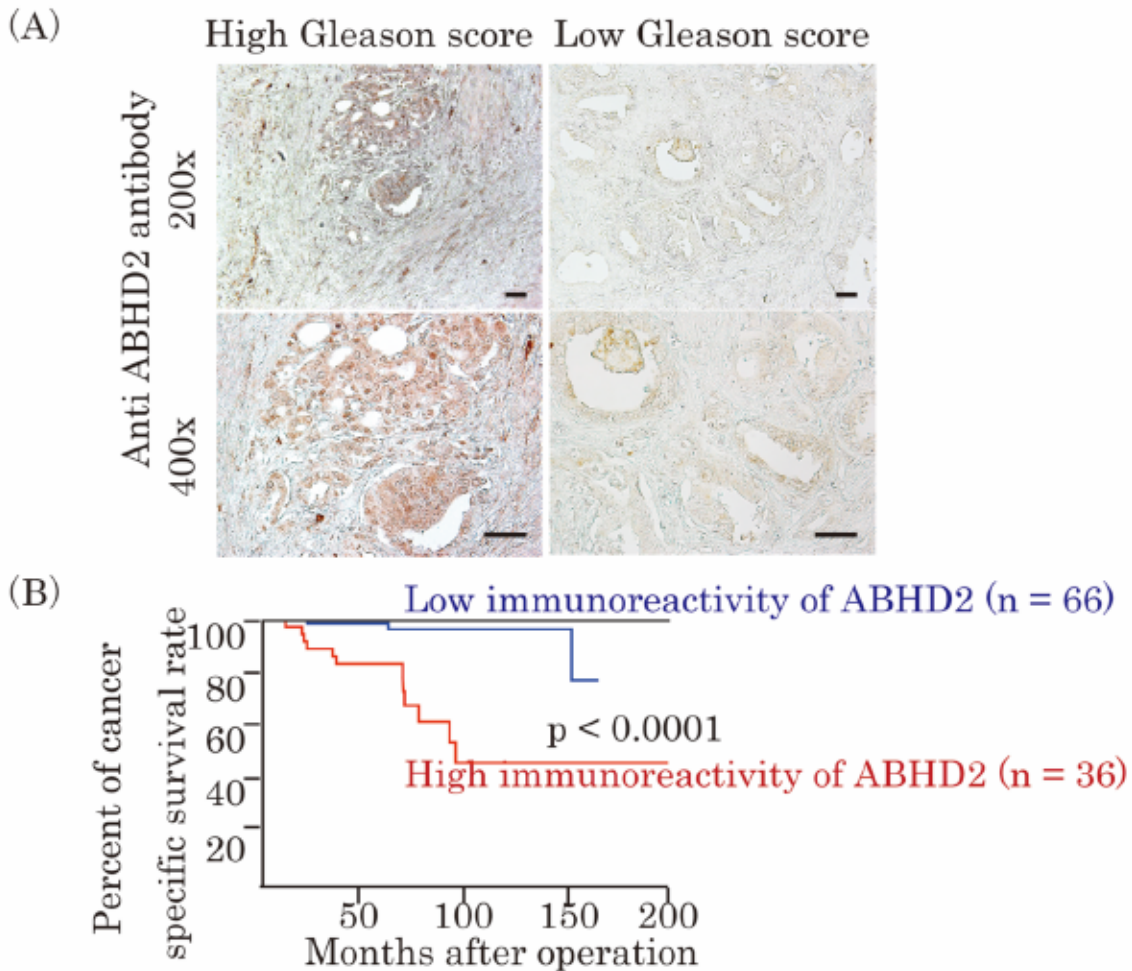
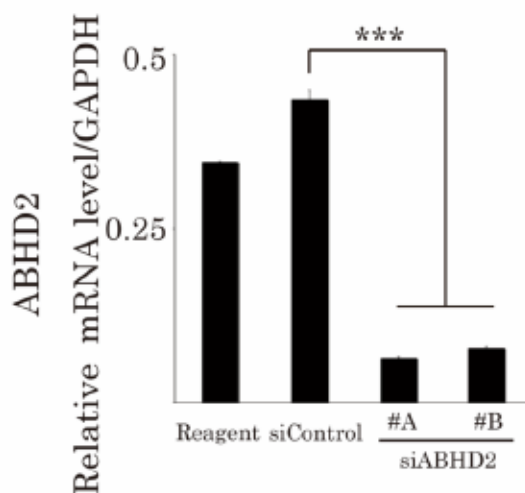


図 5 臨床検体を用いた前立腺癌組織における ABHD2 の発現解析

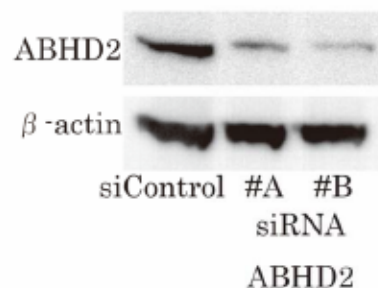
(A) 前立腺癌の臨床検体は、日本大学医学部附属板橋病院にて根治的前立腺全摘除術を施行した 102 例を用いて、1 : 100 希釈の anti-ABHD2 抗体にて免疫染色を実施した。Scar bar: 50 μ m

(B) ABHD2 の発現量により 2 群化し、Kaplan-Meier 法を用いて癌特異的生存率曲線を描出した。Log-rank 検定を用いて有意差の解析を行った。

(A) qRT-PCR



(B) Western blot analysis



(*** ; $p < 0.001$)

図 6 siRNA を用いた ABHD2 の発現抑制効果の検討

LNCaP 細胞にコントロール siRNA (siControl) および、今回作成した ABHD2 に対する siRNA (siABHD2 #A, #B, 10 nM) をそれぞれトランスフェクションし、48 時間後にトータル RNA と細胞蛋白を回収し、(A) qRT-PCR と (B) western blot analysis を実施し、ABHD2 の発現抑制効果について検討した。

(A) ローディングコントロールとして GAPDH を用いた。結果は平均 \pm 標準偏差 (SD)、n=3 にて提示した。(B) ローディングコントロールとして β -actin を用いた。

MTS assay

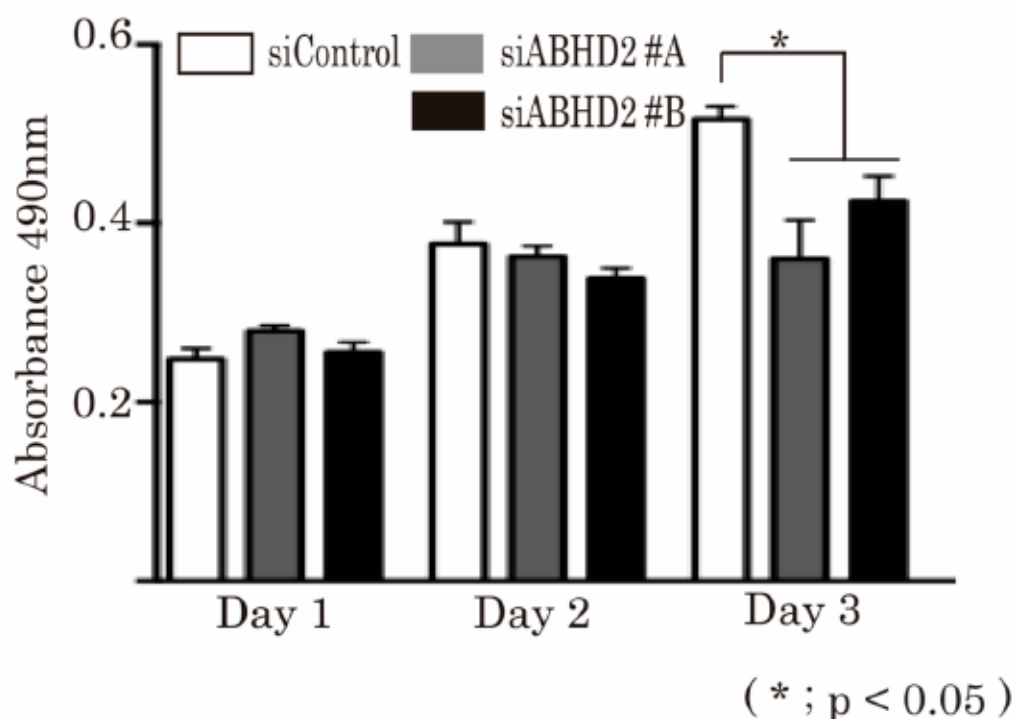


図 7 ABHD2 発現抑制の細胞増殖能に対する影響

各 siRNA (siControl、siABHD2 #A、siABHD2 #B) をトランスフェクションした LNCaP 細胞を 96 ウェルディッシュの各ウェルに 5,000 細胞ずつ入れ、37°C にて 24, 48, 72 時間培養後に MTS assay を行い、Microplate reader にて吸光度を測定した。結果は平均±標準偏差 (SD)、n = 4 にて提示した。

Migration assay

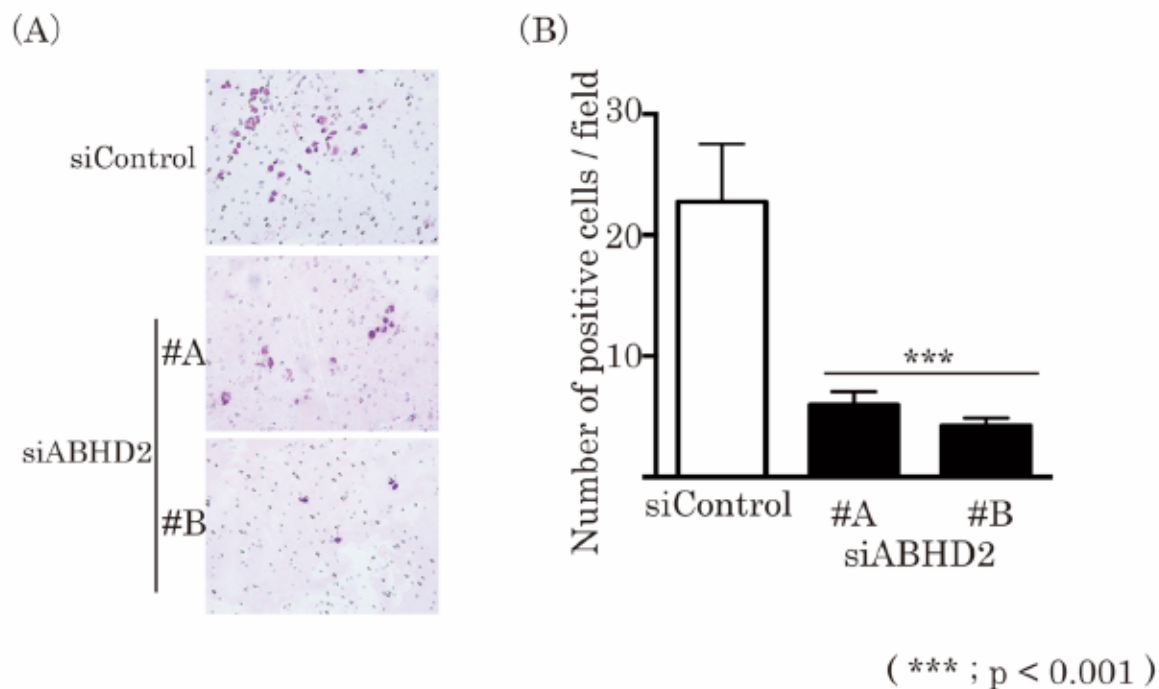


図 8 ABHD2 発現抑制の細胞遊走能に対する影響

Matrigel-coated invasion chambers と 24 ウェルディッシュを使用し、migration assay を実施した。上部のチャンバーに各 siRNA (siControl、siABHD2 #A、siABHD2 #B) をトランスフェクションした LNCaP 細胞 50,000 個と RPMI 1640 培地 300 μ l を入れ、24 時間インキュベートした。メタノール固定とギムザ染色後に、pore を通過したフィルター下面の細胞数を顕微鏡 200 倍ランダム 5 視野にて計測した。結果は平均 \pm 標準偏差 (SD) にて提示した。

Apoptosis assay

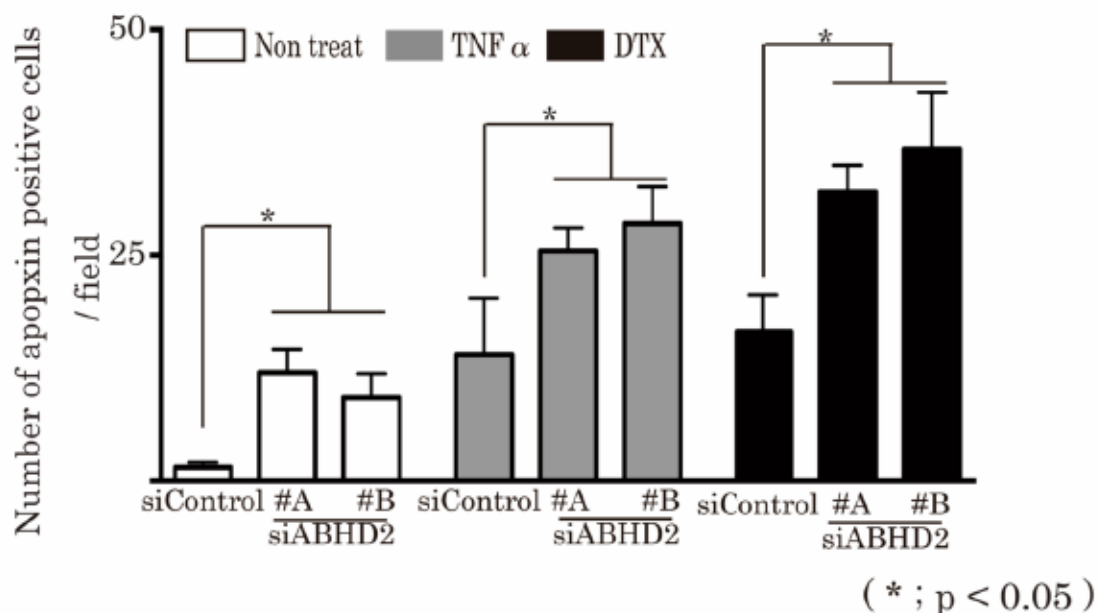
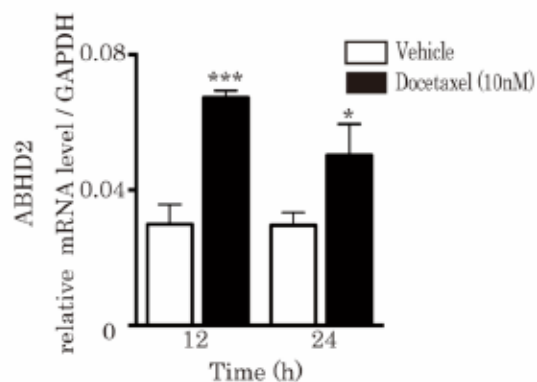


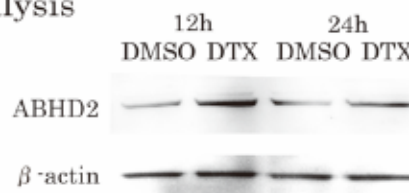
図 9 ABHD2 発現抑制のアポトーシスへの影響

12 ウェルディッシュを使用し、LNCaP 細胞をそれぞれ合計 9 ウェルに入れ、DMSO 投与群 (コントロール群)、TNF α 投与群、docetaxel 投与群として 3 ウェルずつ 3 群に分けた。各 siRNA (siControl、siABHD2 #A、siABHD2 #B) を各群にトランスフェクションし、それぞれに DMSO、docetaxel 10 nM、TNF α 25 ng/ml を投与した。Cell Meter™ Apoptotic and Necrotic Detection Kit を使用し apoptosis assay を実施した。Apopxin により緑色に染色されたアポトーシスを引き起こした細胞をランダム 5 視野でカウントし、結果は平均 \pm 標準偏差 (SD) にて提示した。

(A) qRT-PCR



(B) Western blot analysis



(* ; $p < 0.05$, *** ; $p < 0.001$)

図 10 Docetaxel 投与による ABHD2 の発現量の変化

LNCaP 細胞に DMSO もしくは docetaxel 10nM を投与し 12 時間後、24 時間後にトータル RNA および細胞蛋白を回収し、(A) qRT-PCR および (B) western blot analysis を用いて ABHD2 の発現量を検討した。

(A) ローディングコントロールとして GAPDH を用いた。結果は平均 \pm 標準偏差 (SD)、 $n=3$ にて提示した。(B) ローディングコントロールとして β -actin を用いた。

Western blot analysis

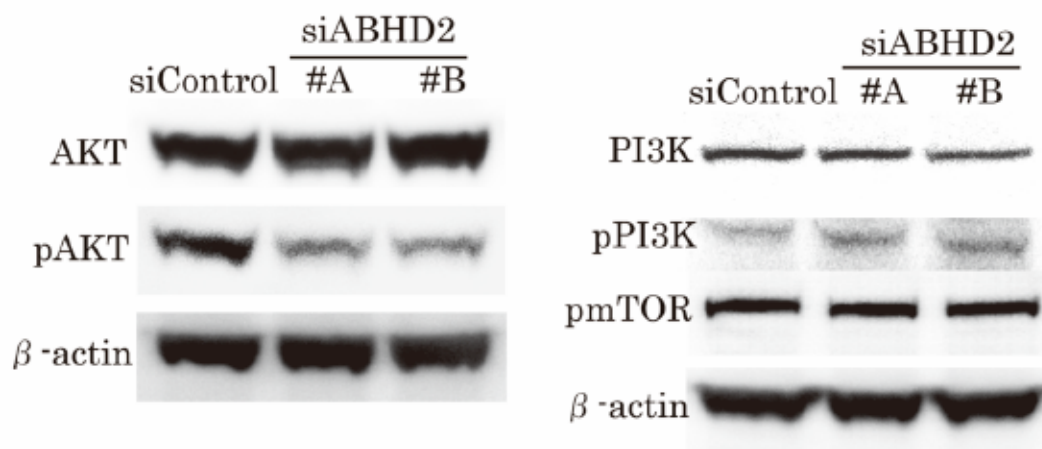


図 11 ABHD2 発現抑制の AKT 経路への影響

LNCaP 細胞に siControl もしくは siABHD2 #A、#B (10 nM) をトランスフェクションし、48 時間後に細胞蛋白を回収し、抗 AKT 抗体、抗 p-AKT 抗体、抗 PI3K 抗体、抗 p-PI3K 抗体、抗 p-mTOR 抗体を用いて蛋白の発現量、リン酸化の有無を western blot analysis により解析した。ローディングコントロールとして β -actin を用いた。

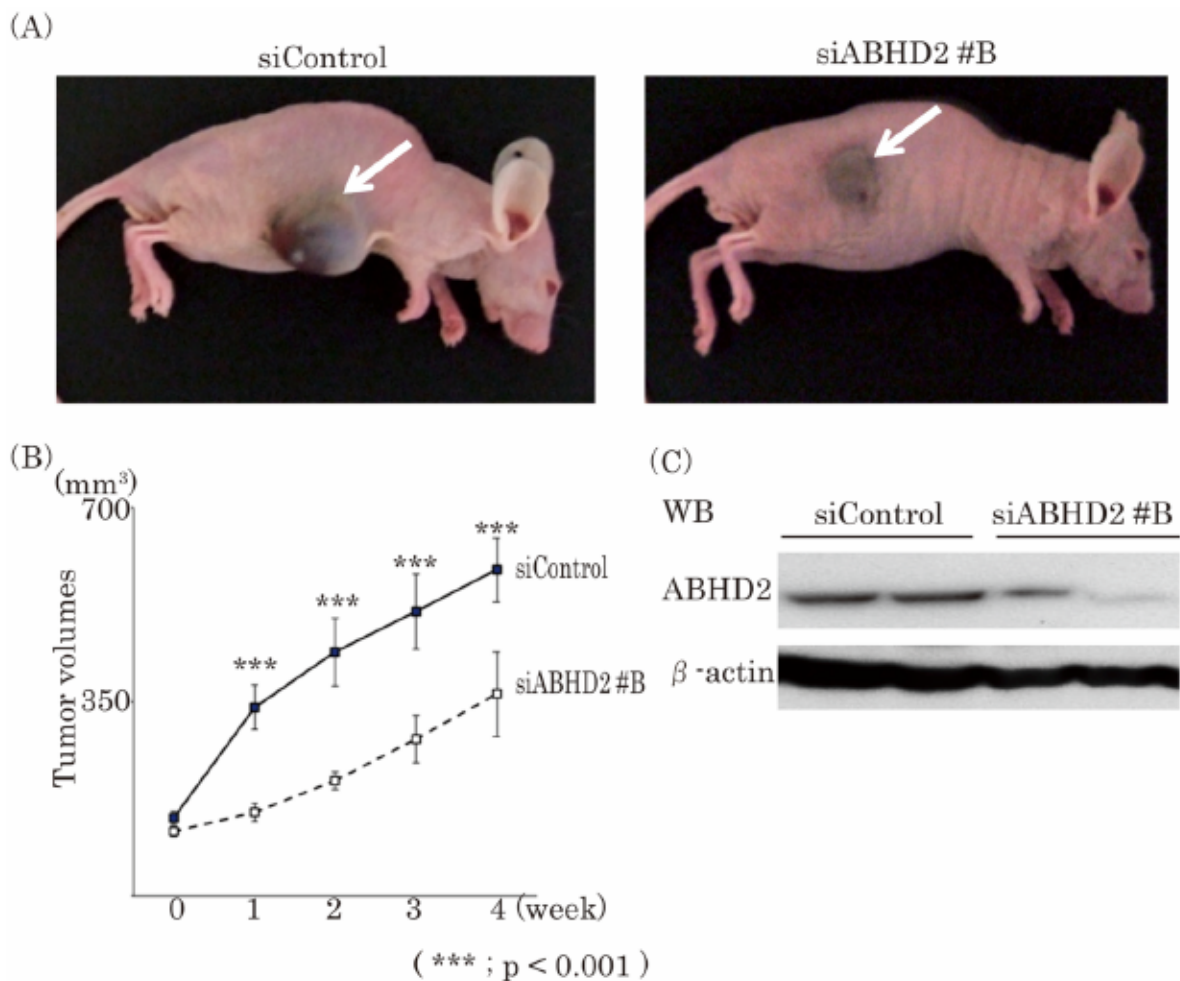


図 12 *in vivo* における ABHD2 発現抑制の腫瘍増殖能への影響

ヌードマウスの皮下に LNCaP 細胞を移植し、形成された腫瘍に siControl もしくは siABHD2 #B と RNAimax の混合溶液を注入し、経時的に腫瘍のサイズを測定した。

(A) siRNA (siControl もしくは siABHD2 #B) を注入 4 週間後の代表的なマウスの写真。矢印は発生した腫瘍を示す。

(B) siRNA 注入後の経時的な腫瘍体積の変化。腫瘍体積(mm³) = 0.5×最大径×中央径×最小径とし、平均±標準誤差 (SE)、n=8 にて提示した。

(C) 腫瘍組織内における ABHD2 発現量の比較 (n=2)。腫瘍組織より SDS リン洗剤バッファーを用いて蛋白質の抽出を行い **western blot analysis** により ABHD2 の蛋白質を検出した。ローディングコントロールとして β -actin を用いた。

【引用文献】

- [1] 国立がん研究センターがん情報サービス 人口動態統計（厚生労働省大臣官房統計情報部編）
- [2] がん・統計白書 2012-データに基づくがん対策のために（篠原出版新社）国立がん研究センターがん対策情報センター
- [3] Wu H, Sun L, Moul JW, Wu HY, McLeod DG, Amling C, Lance R, Kusuda L, Donahue T, Foley J, Chung A, Sexton W, Soderdahl D. Watchful waiting and factors predictive of secondary treatment of localized prostate cancer. *J Urol.* 2004; 171: 1111-6.
- [4] Lu-Yao GL, Yao SL. Population-based study of long-term survival in patients with clinically localised prostate cancer. *Lancet.* 1997; 349: 906-10.
- [5] Moul JW, Wu H, Sun L, McLeod DG, Amling C, Donahue T, Kusuda L, Sexton W, O'Reilly K, Hernandez J, Chung A, Soderdahl D. Early versus delayed hormonal therapy for prostate specific antigen only recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol.* 2004; 171: 1141-7.
- [6] Pisansky TM, Kozelsky TF, Myers RP, Hillman DW, Blute ML, Buskirk SJ, Cheville JC, Ferrigni RG, Schild SE. Radiotherapy for isolated serum prostate specific antigen elevation after prostatectomy for prostate cancer. *J Urol.* 2000; 163: 845-50.
- [7] Catalona WJ, Han M. Definitive Therapy for Localized Prostate Cancer An Overview. *Cambell-Walsh Urology.* 2007; 9th edition: 2932-46.
- [8] Zietman AL, Chung CS, Coen JJ, Shipley WU. 10-year outcome for men with localized prostate cancer treated with external radiation therapy:

results of a cohort study. *J Urol*. 2004; **171**: 210-4.

[9] Pilepich MV, Winter K, Lawton CA, Krisch RE, Wolkov HB, Movsas B, Hug EB, Asbell SO, Grignon D. Androgen suppression adjuvant to definitive radiotherapy in prostate carcinoma--long-term results of phase III RTOG 85-31. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005; **61**: 1285-90.

[10] D'Amico AV, Manola J, Loffredo M, Renshaw AA, DellaCroce A, Kantoff PW. 6-month androgen suppression plus radiation therapy vs radiation therapy alone for patients with clinically localized prostate cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004; **292**: 821-7.

[11] Zelefsky MJ, Fuks Z, Hunt M, Lee HJ, Lombardi D, Ling CC, Reuter VE, Venkatraman ES, Leibel SA. High dose radiation delivered by intensity modulated conformal radiotherapy improves the outcome of localized prostate cancer. *J Urol*. 2001; **166**: 876-81.

[12] D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 1998; **280**: 969-74.

[13] Ramos CG, Carvalhal GF, Smith DS, Mager DE, Catalona WJ. Retrospective comparison of radical retropubic prostatectomy and 125iodine brachytherapy for localized prostate cancer. *J Urol*. 1999; **161**: 1212-5.

[14] van der Kwast TH, Tetu B. Androgen receptors in untreated and treated prostatic intraepithelial neoplasia. *Eur Urol*. 1996; **30**: 265-8.

[15] Smith DF, Toft DO. Minireview: the intersection of steroid receptors with molecular chaperones: observations and questions. *Mol*

Endocrinol. 2008; **22**: 2229-40.

[16] Murata T, Takayama K, Urano T, Fujimura T, Ashikari D, Obinata D, Horie-Inoue K, Takahashi S, Ouchi Y, Homma Y, Inoue S. 14-3-3zeta, a novel androgen-responsive gene, is upregulated in prostate cancer and promotes prostate cancer cell proliferation and survival. *Clin Cancer Res.* 2012; **18**: 5617-27.

[17] Takayama K, Horie-Inoue K, Suzuki T, Urano T, Ikeda K, Fujimura T, Takahashi S, Homma Y, Ouchi Y, Inoue S. TACC2 is an androgen-responsive cell cycle regulator promoting androgen-mediated and castration-resistant growth of prostate cancer. *Mol Endocrinol.* 2012; **26**: 748-61.

[18] Obinata D, Takayama K, Urano T, Murata T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Takahashi S, Inoue S. ARFGAP3, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Int J Cancer.* 2012; **130**: 2240-8.

[19] Huggins C, Hodges CV. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res.* 1941; **1**: 293-7.

[20] Walsh PC. Immediate versus deferred treatment for advanced prostatic cancer: initial results of the Medical Research Council trial. The Medical Research Council Prostate Cancer Working Party Investigators Group. *J Urol.* 1997; **158**: 1623-4.

[21] Labrie F, Dupont A, Belanger A, Giguere M, Lacoursiere Y, Emond J, Monfette G, Bergeron V. Combination therapy with flutamide and castration (LHRH agonist or orchiectomy) in advanced prostate cancer: a

marked improvement in response and survival. *J Steroid Biochem.* 1985; **23**: 833-41.

[22] Caubet JF, Tosteson TD, Dong EW, Naylor EM, Whiting GW, Ernstoff MS, Ross SD. Maximum androgen blockade in advanced prostate cancer: a meta-analysis of published randomized controlled trials using nonsteroidal antiandrogens. *Urology.* 1997; **49**: 71-8.

[23] Fowler JE, Jr., Pandey P, Seaver LE, Feliz TP. Prostate specific antigen after gonadal androgen withdrawal and deferred flutamide treatment. *J Urol.* 1995; **154**: 448-53.

[24] Small EJ, Halabi S, Dawson NA, Stadler WM, Rini BI, Picus J, Gable P, Torti FM, Kaplan E, Vogelzang NJ. Antiandrogen withdrawal alone or in combination with ketoconazole in androgen-independent prostate cancer patients: a phase III trial (CALGB 9583). *J Clin Oncol.* 2004; **22**: 1025-33.

[25] Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Theodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA, Investigators TAX. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004; **351**: 1502-12.

[26] Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN, Jr., Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, Crawford ED. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004; **351**: 1513-20.

[27] Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, Wongvipat

J, Smith-Jones PM, Yoo D, Kwon A, Wasielewska T, Welsbie D, Chen CD, Higano CS, Beer TM, Hung DT, Scher HI, Jung ME, Sawyers CL. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*. 2009; **324**: 787-90.

[28] Scher HI, Beer TM, Higano CS, Anand A, Taplin ME, Efstathiou E, Rathkopf D, Shelkey J, Yu EY, Alumkal J, Hung D, Hirmand M, Seely L, Morris MJ, Danila DC, Humm J, Larson S, Fleisher M, Sawyers CL, Prostate Cancer Foundation/Department of Defense Prostate Cancer Clinical Trials C. Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study. *Lancet*. 2010; **375**: 1437-46.

[29] Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, de Wit R, Mulders P, Chi KN, Shore ND, Armstrong AJ, Flaig TW, Flechon A, Mainwaring P, Fleming M, Hainsworth JD, Hirmand M, Selby B, Seely L, de Bono JS, Investigators A. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med*. 2012; **367**: 1187-97.

[30] Yamaoka M, Hara T, Kusaka M. Overcoming persistent dependency on androgen signaling after progression to castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2010; **16**: 4319-24.

[31] de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, Chi KN, Jones RJ, Goodman OB, Jr., Saad F, Staffurth JN, Mainwaring P, Harland S, Flaig TW, Hutson TE, Cheng T, Patterson H, Hainsworth JD, Ryan CJ, Sternberg CN, Ellard SL, Flechon A, Saleh M, Scholz M, Efstathiou E, Zivi A, Bianchini D, Loriot Y, Chieffo N, Kheoh T, Haqq CM, Scher HI, Investigators C-A. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*. 2011; **364**: 1995-2005.

- [32] Mita AC, Denis LJ, Rowinsky EK, Debono JS, Goetz AD, Ochoa L, Forouzes B, Beeram M, Patnaik A, Molpus K, Semiond D, Besenval M, Tolcher AW. Phase I and pharmacokinetic study of XRP6258 (RPR 116258A), a novel taxane, administered as a 1-hour infusion every 3 weeks in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2009; **15**: 723-30.
- [33] de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, Gravis G, Bodrogi I, Mackenzie MJ, Shen L, Roessner M, Gupta S, Sartor AO, Investigators T. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet.* 2010; **376**: 1147-54.
- [34] Locke JA, Guns ES, Lubik AA, Adomat HH, Hendy SC, Wood CA, Ettinger SL, Gleave ME, Nelson CC. Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 2008; **68**: 6407-15.
- [35] Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; **12**: 1665-71.
- [36] Obinata D, Takahashi S : Androgen signaling pathway and the development of novel drugs for the management of castration-resistant prostate cancer. *J.Nihon Univ Med Ass.* 2014; **73**(3): 134-39.
- [37] Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* 1994; **63**: 451-86.
- [38] Buchanan G, Greenberg NM, Scher HI, Harris JM, Marshall VR, Tilley WD. Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2001; **7**: 1273-81.

- [39] Shiota M, Yokomizo A, Tada Y, Inokuchi J, Kashiwagi E, Masubuchi D, Eto M, Uchiumi T, Naito S. Castration resistance of prostate cancer cells caused by castration-induced oxidative stress through Twist1 and androgen receptor overexpression. *Oncogene*. 2010; **29**: 237-50.
- [40] Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, Rosenfeld MG, Sawyers CL. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med*. 2004; **10**: 33-9.
- [41] Hara T, Nakamura K, Araki H, Kusaka M, Yamaoka M. Enhanced androgen receptor signaling correlates with the androgen-refractory growth in a newly established MDA PCa 2b-hr human prostate cancer cell subline. *Cancer Res*. 2003; **63**: 5622-8.
- [42] Hara T, Miyazaki J, Araki H, Yamaoka M, Kanzaki N, Kusaka M, Miyamoto M. Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. *Cancer Res*. 2003; **63**: 149-53.
- [43] Taplin ME, Balk SP. Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *J Cell Biochem*. 2004; **91**: 483-90.
- [44] Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN, Balk SP. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med*. 1995; **332**: 1393-8.
- [45] Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; **1**: 34-45.
- [46] Slovin SF. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: a sheep in wolf's clothing? *Nat Clin Pract Urol*. 2006; **3**: 138-44.

- [47] Takayama K, Kaneshiro K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ijichi N, Ouchi Y, Shirahige K, Aburatani H, Inoue S. Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis. *Oncogene*. 2007; **26**: 4453-63.
- [48] Takayama K, Tsutsumi S, Katayama S, Okayama T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Kawazu C, Hasegawa A, Ikeo K, Gojyobori T, Ouchi Y, Hayashizaki Y, Aburatani H, Inoue S. Integration of cap analysis of gene expression and chromatin immunoprecipitation analysis on array reveals genome-wide androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2011; **30**: 619-30.
- [49] Obinata D, Takayama K, Urano T, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Homma Y, Ouchi Y, Takahashi S, Inoue S. Oct1 regulates cell growth of LNCaP cells and is a prognostic factor for prostate cancer. *Int J Cancer*. 2012; **130**: 1021-8.
- [50] Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Tanaka T, Zhang W, Azuma K, Takayama K, Obinata D, Murata T, Horie-Inoue K, Kodama T, Ouchi Y, Homma Y, Inoue S. Clinical significance of steroid and xenobiotic receptor and its targeted gene CYP3A4 in human prostate cancer. *Cancer Sci*. 2012; **103**: 176-80.
- [51] Murata T, Takayama K, Katayama S, Urano T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Takahashi S, Kawazu C, Hasegawa A, Ouchi Y, Homma Y, Hayashizaki Y, Inoue S. miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2010; **13**: 356-61.

- [52] Takayama K, Tsutsumi S, Suzuki T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Kaneshiro K, Fujimura T, Kumagai J, Urano T, Sakaki Y, Shirahige K, Sasano H, Takahashi S, Kitamura T, Ouchi Y, Aburatani H, Inoue S. Amyloid precursor protein is a primary androgen target gene that promotes prostate cancer growth. *Cancer Res.* 2009; **69**: 137-42.
- [53] Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, et al. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 1992; **5**: 197-211.
- [54] Nardini M, Dijkstra BW. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol.* 1999; **9**: 732-7.
- [55] Lord CC, Thomas G, Brown JM. Mammalian alpha beta hydrolase domain (ABHD) proteins: Lipid metabolizing enzymes at the interface of cell signaling and energy metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2013; **1831**: 792-802.
- [56] Ghosh AK, Ramakrishnan G, Chandramohan C, Rajasekharan R. CGI-58, the causative gene for Chanarin-Dorfman syndrome, mediates acylation of lysophosphatidic acid. *J Biol Chem.* 2008; **283**: 24525-33.
- [57] Igal RA, Rhoads JM, Coleman RA. Neutral lipid storage disease with fatty liver and cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997; **25**: 541-7.
- [58] Long JZ, Cisar JS, Milliken D, Niessen S, Wang C, Trauger SA, Siuzdak G, Cravatt BF. Metabolomics annotates ABHD3 as a physiologic regulator of medium-chain phospholipids. *Nat Chem Biol.* 2011; **7**: 763-5.
- [59] Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, Kienesberger P, Strauss JG, Gorkiewicz G, Zechner R.

Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab.* 2006; **3**: 309-19.

[60] L'Esperance S, Bachvarova M, Tetu B, Mes-Masson AM, Bachvarov D. Global gene expression analysis of early response to chemotherapy treatment in ovarian cancer spheroids. *BMC Genomics.* 2008; **9**: 99.

[61] Lin B, Huntley D, Abuali G, Langley SR, Sindelar G, Petretto E, Butcher S, Grimm S. Determining signalling nodes for apoptosis by a genetic high-throughput screen. *PLoS One.* 2011; **6**: e25023.

[62] Van Rechem C, Rood BR, Touka M, Pinte S, Jenal M, Guerardel C, Ramsey K, Monte D, Begue A, Tschan MP, Stephan DA, Leprince D. Scavenger chemokine (CXC motif) receptor 7 (CXCR7) is a direct target gene of HIC1 (hypermethylated in cancer 1). *J Biol Chem.* 2009; **284**: 20927-35.

[63] Schnekenburger M, Diederich M. Epigenetics Offer New Horizons for Colorectal Cancer Prevention. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2012; **8**: 66-81.

[64] Krig SR, Jin VX, Bieda MC, O'Geen H, Yaswen P, Green R, Farnham PJ. Identification of genes directly regulated by the oncogene ZNF217 using chromatin immunoprecipitation (ChIP)-chip assays. *J Biol Chem.* 2007; **282**: 9703-12.

[65] Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, Tatematsu M, Ushijima T. Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci.* 2006; **97**: 64-71.

- [66] Oster B, Thorsen K, Lamy P, Wojdacz TK, Hansen LL, Birkenkamp-Demtroder K, Sorensen KD, Laurberg S, Orntoft TF, Andersen CL. Identification and validation of highly frequent CpG island hypermethylation in colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer*. 2011; **129**: 2855-66.
- [67] Furuta J, Nobeyama Y, Umabayashi Y, Otsuka F, Kikuchi K, Ushijima T. Silencing of Peroxiredoxin 2 and aberrant methylation of 33 CpG islands in putative promoter regions in human malignant melanomas. *Cancer Res*. 2006; **66**: 6080-6.
- [68] Cottrell S, Jung K, Kristiansen G, Eltze E, Semjonow A, Ittmann M, Hartmann A, Stamey T, Haefliger C, Weiss G. Discovery and validation of 3 novel DNA methylation markers of prostate cancer prognosis. *J Urol*. 2007; **177**: 1753-8.
- [69] Jin S, Zhao G, Li Z, Nishimoto Y, Isohama Y, Shen J, Ito T, Takeya M, Araki K, He P, Yamamura K. Age-related pulmonary emphysema in mice lacking alpha/beta hydrolase domain containing 2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; **380**: 419-24.
- [70] Miyata K, Oike Y, Hoshii T, Maekawa H, Ogawa H, Suda T, Araki K, Yamamura K. Increase of smooth muscle cell migration and of intimal hyperplasia in mice lacking the alpha/beta hydrolase domain containing 2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; **329**: 296-304.
- [71] Ding X, Yang J, Wang S. Antisense oligonucleotides targeting abhydrolase domain containing 2 block human hepatitis B virus propagation. *Oligonucleotides*. 2011; **21**: 77-84.
- [72] Chen Y, Guo Y, Ge X, Itoh H, Watanabe A, Fujiwara T, Kodama T,

Aburatani H. Elevated expression and potential roles of human Sp5, a member of Sp transcription factor family, in human cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; **340**: 758-66.

[73] Ueyama K, Ikeda K, Sato W, Nakasato N, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Knockdown of Efp by DNA-modified small interfering RNA inhibits breast cancer cell proliferation and in vivo tumor growth. *Cancer Gene Ther.* 2010; **17**: 624-32.

[74] Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia.* 2004; **6**: 1-6.

[75] LaTulippe E, Satagopan J, Smith A, Scher H, Scardino P, Reuter V, Gerald WL. Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer Res.* 2002; **62**: 4499-506.

[76] Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Kern SG, Wang-Rodriguez J, Moskaluk CA, Frierson HF, Jr., Hampton GM. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res.* 2001; **61**: 5974-8.

[77] Ringel I, Horwitz SB. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *J Natl Cancer Inst.* 1991; **83**: 288-91.

[78] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007; **129**: 1261-74.

[79] Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* 2004; **9**: 667-76.

- [80] Ham WS, Cho NH, Kim WT, Ju HJ, Lee JS, Choi YD. Pathological effects of prostate cancer correlate with neuroendocrine differentiation and PTEN expression after bicalutamide monotherapy. *J Urol.* 2009; **182**: 1378-84.
- [81] Karantanos T, Corn PG, Thompson TC. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene.* 2013; **32**: 5501-11.
- [82] Lien GS, Wu MS, Bien MY, Chen CH, Lin CH, Chen BC. Epidermal growth factor stimulates nuclear factor-kappaB activation and heme oxygenase-1 expression via c-Src, NADPH oxidase, PI3K, and Akt in human colon cancer cells. *PLoS One.* 2014; **9**: e104891.
- [83] He XH, Yan XT, Wang YL, Wang CY, Zhang ZZ, Zhan J. Transduced PEP-1-heme oxygenase-1 fusion protein protects against intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res.* 2014; **187**: 77-84.
- [84] Kawase T, Ohki R, Shibata T, Tsutsumi S, Kamimura N, Inazawa J, Ohta T, Ichikawa H, Aburatani H, Tashiro F, Taya Y. PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt. *Cell.* 2009; **136**: 535-50.

【研究業績】

高田 将吾

I 発表	① 一般発表	1
	② 特別発表	なし
II 論文	① 原著論文	なし
	② 症例報告	1
	③ 総説	なし
III 著書		なし

以上

I 発表

① 一般発表

1. 高田 将吾, 大日方 大亮, 芦荻 大作, 高山 賢一, 浦野 友彦,
井上 聡, 高橋 悟: 新規アンドロゲン応答遺伝子 ABHD2 の同定及び
機能解析, 第 103 回 日本泌尿器科学会総会, 金沢, 2015 年 4 月

② 特別発表

なし

II 論文

① 原著論文

なし

② 症例報告

1. 高田 将吾, 神田 貴祥, 齊藤 史典, 村田 保貴, 大日方 大亮,
五十嵐 智博, 佐藤 克彦, 持田 淳一, 岡田 安弘,
山中 弥太郎, 山口 健哉, 平野 大作, 高橋 悟: 腎盂腎炎を合併
した骨盤腎の一例, 日大医学雑誌, 72: 232-235, 2013

③ 総説

なし

III 著書

なし