

ステロイド受容体活性化補助因子 SRC-3 と前立腺癌

ミンジャー ツァイ
米国 ベイラー医科大学

ありがとうございます。この会議で話をする機会を与えてくださった主催者に、この場でお礼申し上げます。吉里先生からお話がありましたように、セッション 3 では、カエルと哺乳動物との間で、大きな討論をすることになっています。私がこの会議に招待された理由が今わかったのですが、両者が喧嘩にならないように、両陣営の間に私をはさまるといふことなのでしょうね。

冗談はさておき、妹尾博士がおっしゃったように、ホルモン作用においてはステロイドホルモン受容体や甲状腺ホルモン受容体だけでなく、その他にも重要な役割を果たす因子が存在します。本日は、それら補助因子というものについてお話しします。

このスライドは、ホルモン依存性の核内受容体活性化の様子を示したものです。ステロイドホルモン受容体は 2 つのグループに分けることができます。第 1 グループは、PR と ER が代表的なものです。第 2 グループは甲状腺ホルモン受容体とレチノイン酸受容体です。

第 1 グループの中で、プロゲステロンと糖質コルチコイドの受容体は、細胞質において熱ショックタンパク質と会合していることが明らかになっていますが、一部が核内に存在することもあります。熱ショックタンパク質と会合することで、ホルモンを受容するのに適したコンフォメーションを形成して安定化するものと考えられています。

ホルモンと結合する時には、大きなコンフォメーション変化が起きます。私たちの研究室が明らかにしたところによると、ホルモンが存在しない状況では、C 末端のヘリックス 12 は緩いコンフォメーションになっています。ホルモンが存在すると、コンフォメーションに大きな変化が起こり、ヘリックス 12 がタンパク質の中心に位置するようになります。こうなると、プロテアーゼ分解を受けなくなります。おそらくはこうしたコンフォメーション変化によって、熱ショックタンパク質が解離します。熱ショックタンパク質との会合がなくなると、この受容体はまた別のコンフォメーションを取り、二量体化したり、DNA と結合したり、転写を活性化したりすることができるようになります。

甲状腺ホルモン受容体やレチノイン酸受容体などの第 2 グループの受容体は、ホルモンが存在しない状況で二量体化することができます。これらの受容体は二量体になることで、応答配列に結合することができます。前の講演でもありましたように、これら二量体は応答配列に結合すると、標的遺伝子の転写を抑制することができます。ホルモンが結合すると、その結果としてコンフォメーションの変化が起こって受容体が活性化し、標的遺伝子の発現を促進することができるようになります。

これら受容体は単独では標的遺伝子の活性化や抑制をすることができません。補助因子が必要です。抑制に関与する補助因子のことをコレプレッサーといい、活性化に関する補助因子はコアクチベーターといいます。私たちの研究室は、ステロイドホルモン受容体のコアクチベーターのクローニングに初めて成功し、それに SRC-1 と命名しました。その後、関連するコアクチベーターとしてその他に 2 種類がクローン化されました。その 1 つは、シャンボン氏のグループとストールカップ氏のグループがクローン化したもので、SRC-2 とか Tif2 とか GRIP1 などと呼ばれています。3 番目のメンバーである SRC-3 は、全部で 6 つの研究グループがクローニングし、それぞれが、P/CIP、ACTR、RAC3、AIB1、TRAM1 など独自の名前で呼んでいます。

この 3 つのメンバーはすべて、同じようなコンフォメーション、同じようなタンパク質配列、同じような構造を持っています。これらは、ステロイドホルモン受容体のコアクチベーターであると同時に、3 つのメンバーともが、その他の転写因子のコアクチベーターになることもできます。特に SRC-3 がそうです。SRC-3 は多くの異なる系において作用することが可能です。したがって SRC-3 は、多くの転写因子の標的遺伝子の活性化において、極めて重要な役割を果たしていることは間違いありません。

本日の私の話のテーマは、この SRC-3 です。SRC-3 をクローン化した NIH グループがこれを AIB1 と呼んだのは、これが乳腺で増幅されていたからです。乳腺で増幅されたということは、乳癌患者の一部にお

いてこの遺伝子が増幅することを意味します。となると、乳癌に関しては増幅そのものが重要なのではなく、AIB1の過剰発現のほうが重要であると言えます。

SRC-3は、卵巣癌と胃癌でも増幅することが日本で実証されています。SRC-3は乳癌および胃癌の全患者の40~60%において過剰発現し、乳癌患者における発現量は、腫瘍の大きさとHer-2/neuレベルに相関しています。SRC-3とHer-2/neuはともに、タモキシフェン抵抗性の原発性乳癌にとって必須であり、このことから、癌にとってはSRC-3が重要であることが想定されます。

私たちの研究室は前立腺癌に興味を持っており、前立腺癌においてもSRC-3が過剰発現するのかどうかを調べています。私たちが134名の患者のサンプルを分析したところ、その答えはイエスです。サンプルの47%において、腫瘍領域にSRC-3の過剰発現がありました。この割合はおおまかに言って、乳癌と胃癌における割合の中間になります。

次に、腫瘍領域に隣接した正常領域について調べてみました。61例を分析したところ、その8.2%にしかSRC-3の過剰発現はありませんでした。以上の結果は、SRC-3の過剰発現は前立腺癌においても同様に重要であることをきわめて明白に示しています。

次に私たちが調べたのは、SRC-3の過剰発現は癌の病期と関連しているかどうかという問題です。前立腺癌の病期を評価する方法のひとつに、Gleason値があります。Gleason値が5ならば初期段階です。Gleason値が9の場合には、前立腺癌後期を意味しています。このスライドにあるように、私たちはいろいろなGleason値を持つ多くのサンプルを分析しました。全体として、初期はSRC-3の発現が少なく、後期はSRC-3の発現が多いという傾向があります。

前立腺癌の病期は、別の方法を用いて評価することもできます。いわゆるT2、T3a、T3b、D1に分ける方法です。このスライドにあるように、初期段階のT2では、患者サンプルのうちSRC-3の過剰発現は36%にしか見られませんが、後期段階のT3bでは、80%にSRC-3の過剰発現が見られます。D1のデータは、2例しかありませんから意義がありません。

以上の2つのデータは、腫瘍の病期とSRC-3の発現量とが相関していることを示しています。病態がより深刻な後期段階には、SRC-3が過剰発現します。

前立腺癌には、乳癌と同じように、ホルモン依存性段階とホルモン非依存性段階とがあります。ホルモン依存性段階は、通常はホルモン療法で治療可能ですが、病期が進行してホルモン非依存性段階になると、ホルモン療法では治療できなくなるのが一般的です。私たちが8名の患者のサンプルを調べました。これらのサンプルは入手が非常に困難です。その87.5%においてSRC-3の過剰発現が見られました。このデータに基づき、前立腺癌患者においてはSRC-3が過剰発現すると私たちは結論づけました。SRC-3の過剰発現は、前立腺癌の予後の悪さと相関しています。このことは、後期前立腺癌の治療標的としてSRC-3を用いることが可能かもしれないという点から特に重要です。後期前立腺癌は、現在では治療不可能なのです。

次に私たちが取り組んだ問題は、腫瘍の進行すなわち腫瘍発生におけるSRC-3のシグナル経路と基礎メカニズムは何かというものです。この問題について私たちは、前立腺細胞においてSRC-3を過剰発現させたり過小発現させることを試みました。これはそう簡単にはいきませんでした。SRC-3を持続的に過剰発現させようとしたのですが、うまくできませんでした。安定した細胞系列としては、非常に低レベルのSRC-3を発現するものしか作れませんでした。そこで誘導系を用いることにしました。

これが、私たちの研究室で開発した誘導系です。2種類のベクター系を用いました。1つは調節遺伝子を誘導するもので、もう1つは標的を誘導するものです。この調節遺伝子は、CMVプロモーターの制御下にあり、Gal4 DNA結合ドメインとp65活性化ドメインを有しています。

その間にPRリガンド結合ドメインを挿入しました。ただしこのPRリガンド結合ドメインは、19番目のアミノ酸を欠損させていますので、プロゲステロンに結合することはできません。つまり、このタンパク質は、細胞内でいかなるステロイドホルモンによっても調節されないで、活性化することができません。

ところがこの欠損変異PRリガンド結合ドメインは、プロゲステロンのアンタゴニストであるRU486には結合することができます。RU486はこの調節遺伝子に結合して、調節することが可能です。RU486が

存在する場合には、調節遺伝子が活性化し、標的遺伝子のプロモーターと結合できるようになって、標的遺伝子すなわちこの場合は SRC-3 が活性化されます。私たちはさらに N 末端側に HA タグを用いました。こうすることで、SRC-3 の新規合成を追跡することができるようになります。

この方法を使うことで、何種類かの培養系列を作ることによりやく成功しました。ここに示しましたように、HA タグを用いて外因性の SRC-3 のみを検出することで、RU486 が存在しない状況で低レベルのリーク発現があることが判りました。

RU486 が存在する状況では、ご覧のように、安定 LNCaP 培養系列において SRC-3 の大きな誘導があります。私たちは実験に #6、#12、#48 を用いています。#6 は HG5 とも呼ばれ、#12 は HG11 とも呼ばれます。外因性と内因性の SRC-3 の総量が評価できる SRC-3 抗体の発現レベルを調べてみると、ご覧のように大きな誘導が見られます。この SRC-3 の誘導は、親細胞に比べて 5~6 倍以上です。

さて、この安定した細胞系列を用いることで、次の疑問に取りかかることができます。RU486 によって SRC-3 の過剰発現を誘発すると一体何が起こるのでしょうか。

私たちがまず最初に問題にしたのは、SRC-3 が過剰発現しているときにはチミジンの取り込みが増大するか否かということです。その答えはイエスです。このスライドにありますように、³H-チミジンの取り込みが大きく増大しており、このことは、SRC-3 が過剰発現すると DNA 合成が増大して細胞の分裂増殖が引き起こされる可能性のあることを示しています。

さらに私たちは、SRC-3 が細胞の分裂増殖を誘導するシグナル経路は何かということの問題として取り上げました。そこでウォルトマニンというインヒビターを用いました。これは PI (3) キナーゼのインヒビターです。ご覧のように、PI (3) キナーゼによってチミジンの取り込みを抑制することができ、このことは、SRC-3 が誘導する LNCaP 細胞系列の成長において、PI (3) キナーゼが重要な役割を持っていることを示しています。

PI (3) キナーゼとは何なのでしょう。PI (3) キナーゼは、成長因子のシグナル分子です。成長因子は、受容体に結合すると PI (3) キナーゼを活性化します。PI (3) キナーゼはホスファチジルイノシトールという脂質をリン酸化して、4-リン酸と 4,5-ニリン酸を、3,4-ニリン酸と 3,4,5-三リン酸にします。この脂質は細胞膜に結合し、PDK と Akt を細胞膜にリクルートします。この 2 種類の物質が細胞膜にリクルートされると、PDK が Akt の 2 箇所をリン酸化して Akt を活性化します。Akt は細胞の成長において大きな働きをする物質です。Akt は多数の経路を介して、アポトーシスを低減させ、細胞の生存・分裂増殖・成長を促進します。このように、細胞の成長においては Akt がきわめて重要な役割を果たしています。

私たちは、SRC-3 の過剰発現によって Akt 経路が増大するかどうかを調べました。ご覧のように、親細胞の Akt の発現量は、RU486 が存在する状況では増大しませんが、SRC-3 発現系を有する安定培養細胞系列で SRC-3 の発現を誘導すると、Akt の総量が著しく増大しました。

続いて、Akt 総量が増大している時には、Akt の活性型であるリン酸化 Akt も増大していることが判りました。この増大は、親細胞の LNCaP 細胞系列には起こりません。予想通りに、リン酸化 Akt の増大はこの図にあるように両部位で起こっています。以上の結果は、SRC-3 の過剰発現は実際に、総 Akt および活性型 Akt の発現を誘導できることを示しています。このように、SRC-3 は PI (3) キナーゼと Akt の経路において働いています。SRC-3 の過剰発現は腫瘍成長に関連しているのではないかと私たちが考える理由のひとつがこれです。

細胞の成長に関してはもう一つ疑問があります。ご存じのとおり、腫瘍発生においては、分裂増殖や DNA 合成に加えて腫瘍細胞の成長も大変に重要な役割を果たしています。そこで私たちが疑問にしたのは、SRC-3 は細胞の成長に対して作用を及ぼすのかということです。

このスライドにありますように、コントロールの親 LNCaP 細胞系列を RU で処置しても処置しなくても、細胞の大きさには差がないことが前方散乱分析で判りました。親細胞の大きさには増大がありません。しかし HG11 細胞を RU486 で処置すると細胞の大きさが増大します。これは、SRC-3 がチミジン取り込みに加えて細胞の大きさや成長を増大させることが可能であることを示しています。

大きさの増大は、LNCaP 細胞だけでなく、PC-3 細胞にも当てはまります。このスライドにありますように、SRC-3 発現系列のほうがはるかに大きくなっています。

すなわち、SRC-3 の過剰発現は、³H-チミジン取り込みと同時に細胞成長の増大も誘発することができます。では、SRC-3 が過剰発現だと細胞成長にどのような影響があるのでしょうか。この目的で私たちは siRNA を用いて SRC-3 の発現を抑制してみました。まず、siRNA が非常に特異的であることを確認しました。このスライドにありますように、SRC-3 に対する siRNA は、SRC-3 のみを抑制し、SRC-2 の発現は抑制しません。その反対に、SRC-2 に対する siRNA は、SRC-2 を抑制しますが SRC-3 は抑制しません。このことから、siRNA による抑制は非常に特異的であると考えられます。

そして私たちは、siRNA による SRC-3 のダウンレギュレーションが細胞成長を増大させるかどうかを前方散乱分析によって調べてみました。このスライドで判りますように、SRC-3 の siRNA によって SRC-3 の合成が抑制でき、同時に、細胞成長も抑制できました。これらの結果を総合すると、SRC-3 は細胞成長においてきわめて重要な役割を果たしていると考えられます。

次に私たちが取り上げた疑問は、その経路は何かということです。先ほど述べましたように、Akt は細胞成長においてたいへん重要な役割を果たしています。細胞成長の増大が起こる経路には、3 つの異なるものがあります。GSK3 経路、mTOR 経路、MAP カスケードを介するものです。そこで私たちは、SRC-3 が細胞成長を増大させる際にどの経路が重要なかを調べました。

それを調べるためには、3 種類のインヒビターを用いました。PI (3) キナーゼを抑制する LY 物質が 1 つ目、mTOR 経路を抑制するラパマイシンが 2 つ目、そして、MAP キナーゼ経路を抑制する PD 物質が 3 つ目です。このスライドにありますように Akt は、予想通りに PI (3) キナーゼインヒビターである LY 物質によって抑制されます。下流の mTOR を抑制するラパマイシンで細胞を処置すると、Akt の誘導に対しても、GSK3 のリン酸化に対しても影響はありませんでした。同様に、MAP キナーゼインヒビターである PD 物質も、Akt 誘導に対して影響はありませんでした。

ところが p70^{S6K} タンパク質をリン酸化して活性型にする経路の mTOR による誘導について調べてみると、この誘導は SRC-3 が存在すると起こり、LY 物質とラパマイシン双方によってこの誘導は阻害されました。このことから、この経路が SRC-3 による細胞成長の誘導においてたいへん重要な役割を果たしていることが想定されます。

このスライドにあるように細胞の大きさについては、すでにお見せしましたように RU486 によって大きさが増します。細胞を、PI (3) キナーゼを抑制する LY 物質存在下で RU486 処置しますと、SRC-3 による細胞の大きさの増大は完全に阻害されます。

mTOR を抑制するラパマイシンで処置すると、同じように細胞の大きさの増大が阻害されます。このことから、mTOR 経路は SRC-3 が誘導する細胞成長において重要な役割を果たしていることが考えられます。それとは対照的に、MAP キナーゼを抑制する PD98059 は影響をまったく及ぼしません。これは、SRC-3 が誘導する細胞成長においてこの経路が重要でないことを示しています。

以上の結果が明らかに示しているのは、SRC-3 は Akt のリン酸化を増大させ、さらに mTOR 経路を介して p70^{S6K} および S6 を活性化し、次いで細胞の大きさが増大するということです。しかし現時点では、その他の 2 つの経路が除外できたわけではないことに留意してください。

結論を述べます。私の考えでは、低レベルの SRC-3 発現によって LNCaP の DNA 合成と細胞成長が増大します。活性型 Akt は、SRC-3 が過剰発現した細胞において増大することから、これが、SRC-3 が誘導する細胞の分裂増殖において重要な役割を果たしていると考えられます。

以上の結果から、内分泌攪乱物質は補助因子を標的にしている可能性と、内分泌攪乱物質によってはこれら補助因子をマーカーとして利用できる可能性があることが考えられます。したがって、受容体を直接的に対象にする研究の代わりに、内分泌攪乱物質がコアクチベーターやコレプレッサーに干渉することに関した研究があり得ます。

最後に、今回の研究に協力してくださった方々にお礼を申し上げます。この研究は、ソフィア・Y.ツァイ研究室が協力して、ク・チョウ博士と橋本吉広博士が行いました。患者のサンプルは、病理学者のトーマス・M. ホイラー博士とシン・レイ博士から提供していただきました。これで話を終わり、質疑応答に移りたいと思います。ありがとうございました。

質疑応答

妹尾：ツァイ博士、たいへんありがとうございました。数分間の討論時間があります。

質問：お話をありがとうございました。例えばマウスなどに SRC-3 の過剰発現を人為的に誘発したとしたら、前立腺やその他の部位が後天的に癌に罹りやすくなったりするのでしょうか。そういうデータはお持ちでしょうか。

ツァイ：そういうデータは今のところ持っていません。私たちは現在、前立腺特異プロモーターを用いたトランスジェニック動物として、SRC-3 を過剰発現するマウスを作成し、うまくいけばそのことを調べようとしているところです。私たちは、作成した動物の 1 種においてそのことを調べていますが、前立腺には残念ながら癌は起こっていませんが、他の部位に癌が発生しています。このことから、このプロモーターは完全には特異的ではないことが考えられます。

質問：なるほど。やってみると時にはそれが起こるということですね。その理由については分かりますか。

ツァイ：分かりません。おそらく、SRC-3 導入遺伝子の挿入部位が異なっているからでしょう。私たちは別の種類のトランスジェニックマウスも作成しているところで、それがうまく行けば、ご質問に答えることができるようになると思います。

質問：大変興味深いです。

ツァイ：ありがとうございます。

質問：講演の中での話がどうだったか忘れたのですが、SRC-3 を過剰発現している患者はアンドロゲンに対して反応しますか。

ツァイ：ご承知のように、サンプルが入手できる患者のほとんどは初期段階の者であり、ホルモン依存性の癌です。ですから、去勢術やアンタゴニスト療法や外科的切除を行えば、こうした患者の腫瘍は通常は縮小します。しかし数年後には腫瘍はほとんどの場合で再発してきます。

ですので、今の質問はたいへん重要です。SRC-3 が過剰発現しているこうした患者の腫瘍は、ホルモン療法後の早いうちから成長を開始するのでしょうか。現在私たちは、その関連性を見つけようとしているところです。現在までに私たちが行ってきた実験はすべて *in situ* ハイブリダイゼーションを用いたものですので、非常に面倒であり、簡単に実施することができません。それで私たちは今、SRC-3 に特異的な抗体の開発を試みているところです。それがうまくいけば、免疫染色が可能になります。

抗体による免疫染色の利用が可能になり、SRC-3 を予後判定のマーカーとして利用できるようなれば、患者の転帰に関連づけることができるようになります。

質問：もう一つ質問があります。前立腺癌において Akt は誘導されるのですか。

ツァイ：はい。SRC-3 の過剰発現と Akt との関連性はまだつけられていませんが、Akt はとても多くの患者サンプルにおいて過剰発現することが明らかになっています。

妹尾：質問を簡潔にどうぞ。

質問：関連質問です。先生が調べられた LNAaP 細胞は、実際にはアンドロゲン依存性に増殖する細胞系列であることが知られています。この SRC-3 過剰発現は、アンドロゲン依存性の増殖に対して具体的に何らかの影響を及ぼしますか。

ツァイ：いいご質問です。私たちは、LNCaP 細胞だけでなく、D145 や PC-3 細胞も用いて実験を行いました。これらはアンドロゲン非依存性の細胞系列であり、同じ結果を再現することができました。アンドロゲンが存在していても存在していなくとも、これらの細胞は SRC-3 が発現すると巨大になります。こうした場合は、細胞増殖はアンドロゲンに依存しません。SRC-3 のみに依存します。

質問：LNCaP 細胞は、増殖に関してはある程度アンドロゲン依存性ではありませんか。つまり質問したいのは……

ツァイ：分裂増殖はアンドロゲンに依存します。
しかし成長は依存しません。

質問：なるほど、分かりました。

ツァイ：私が言う成長とは、大きさのことです。

妹尾：ツァイ先生、たいへんありがとうございました。