

**Androgen Receptor and Androgen
Receptor Cofactors in Prostate**

Department of Medicine and Comprehensive
Cancer Center, University of Wisconsin-Madison

Hiroshi Miyamoto, Shuyuan Yeh, Hidefumi
Kinoshita, Naohiro Fujimoto, Kazuo Nishimura,
Shigeki Inui, Atsushi Mizokami, Hiroji Uemura,
and Chawshang Chang (speaker)

Previously we reported the cloning of the androgen receptor (AR) co-activator, ARA70, and demonstrated that the transcriptional activity of wild-type (wt) AR can be increased by ARA70 in human prostate cancer DU145 cells with passage number near 245. Here, using two new DU145 cell lines with passage numbers 59 and 205 that expressed ARA70 mRNA, we show the transcriptional activity of mutated ARs (AR877, AR874, AR715 identified from human prostate tumors) can be also increased 5 to 8 fold by ARA70. In contrast, ARA70 failed to induce the transcriptional activity of AR with one amino acid substitution in the second zinc finger of the DNA binding domain. Deletion analysis further suggested that N-terminal, but not C-terminal of ARA70, may be responsible for the increased AR transcriptional activity. Together, our data suggest that ARA70 can increase the transcriptional activity of wtAR and several mutated ARs in DU145 cells. Whether these in vitro ARA70 effects can also occur in vivo will be the next important question to ask.

アンドロゲン受容体 (AR) は、ステロイド受容体スーパーファミリーに属する転写調節因子のひとつである。この転写調節の過程には、受容体とリガンド (ホルモン) 以外にも複数の因子が選択的に作用するものと考えられている。これまでにホルモン受容体と相互作用を示すいくつかの蛋白質の存在が報告されている。しかし、ステロイド受容体スーパーファミリーに属するステロイドホルモンや甲状腺ホルモンなどの受容体は、その一次構造が非常に類似しており、単一の受容体のみ転写活性を特異的に調節する因子の存在は明らかではなかった。われわれは yeast two-hybrid システムを用いて、AR に特異的な coactivator (ARA₇₀) の単離に成功した。

ARA₇₀ は 70-KDa の蛋白質であり、AR の C 末端側 (ホルモン結合部位) を bait として、ヒト脳の cDNA ライブラリーから単離された。マウス組織を用いたノーザンプロットによると、ARA₇₀ mRNA は前立腺、精巣、副腎、胸腺など多くの組織で発現していた。また細胞株でも、LNCaP、PC3、DU145 などの前立腺癌由来細胞や他臓器癌細胞 (MCF-7、HeLa) などで発現が認められている。さらに、in situ hybridization 法により約 30 例のヒト前立腺癌組織における発現を調べたところ、約三分の二の症例で ARA₇₀ の発現が認められた。その発現と癌の臨床像との関係に統計学的有意差は認められなかったが、組織学的に high grade (poorly differentiated) 症例に ARA₇₀ の発現が消失している傾向が認められた。酵母細胞 Y190 を用いた liquid assay によると、リガンド (DHT) の存在下で、AR と ARA₇₀ の相互作用が認められ、β-ガラクトシダーゼ活性が亢進したが、他のステロイド受容体 (レチノイン酸レセプターと TR4 オーフアンレセプター) との相互作用は弱かった。また、CAT (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) アッセイでは、ARA₇₀ は DU145 細胞において、リガンド (テストステロンあるいは DHT) の存在下で AR の転写活性を 7-10 倍亢進させたのに対し、他のステロイド受容体 (エストロゲン、グルココルチコイド、プロゲステロン受容体) の転写活性誘導作用はきわめて弱かった (2 倍以下)。これらのことは、ARA₇₀ が AR と特異的に相互作用し、転写活性を誘導することを示唆している。

次に、CATアッセイにより得られたARA₇₀に関するいくつかの知見について述べる。第一に、DU145細胞で認められたARA₇₀のAR転写活性の誘導作用（7-10倍）が他の細胞株でも働くかどうか検討した。LNCaP、PC3、HeLa、Chinese hamster ovary (CHO)細胞を調べてみたが、いずれも弱い転写活性誘導作用（3倍未満）を示すのみであった。ノーザンブロットによる内因性ARA₇₀の発現には、各細胞株間に差はなく、DU145に特異的に強力な作用を示す理由は今のところはっきりしていない。しかし、以下の実験にはすべてDU145細胞を使用した。第二に、他のAR標的遺伝子でもARA₇₀が働くかどうか検討した。先の実験では、すべてMMTV(mouse mammary tumor virus)-CATを使用していた。もうひとつの重要なAR標的遺伝子として、前立腺癌の腫瘍マーカーとして一般的なPSA(prostatic specific antigen)がある。PSA-CATを用いた場合でもARA₇₀の効果はまったく同様に認められ、AR標的遺伝子の誘導においてARA₇₀の重要な役割を持つことが示唆された。第三に、ARA₇₀のどの領域が活性充進作用に関係するか検討した。ARA₇₀cDNAは614のアミノ酸からなる。そこで、N末端側（コドン1-401）とC末端側（コドン379-614）に分け、full-lengthと比較した。N末端側ではfull-lengthと変わらない効果が認められたが、C末端側では活性充進はまったく認められなかった。このことから、ARA₇₀のN末端側がARの転写活性誘導に重要であると考えられた。第四に、変異型ARでも同様のARA₇₀効果が認められるか検討した。AR遺伝子の変異は、しばしば前立腺癌組織で検出されている。今回は、前立腺癌腫瘍より得られた3つの変異型AR（いずれもアンドロゲン結合領域であるコドン715、874、および877の点突然変異）について調べた。これらの変異型ARでは、いずれも5-8倍の転写活性誘導効果が認められた。これは、ARの機能的な転写活性にARA₇₀が不可欠であることを示唆している。第五に、他のARA (AR-associated protein)について検討した。われわれの研究室では、同様の方法 (yeast two-hybrid system) でいくつかのARAを単離している。しかし、ARA₇₀のような強力なco-activator作用を持つものは見つかっていない。最近、われわれが単離したARA₅₅が、5倍前後のAR転写活性誘導効果をもたらす

ことが明らかになってきた。

ARA₇₀と前立腺癌との関連が示唆される知見について述べる。前立腺癌の治療として、抗アンドロゲン剤がしばしば使用されている。代表的な抗アンドロゲン剤のひとつであるhydroxyflutamide (HF) が、高濃度ではARに対しアゴニスト作用をもつ可能性があるとの報告が散見される。このことは、HF投与中に上昇してきたPSAが、HFを中止することで再び下がってゆく現象で、いわゆるflutamide withdrawal syndromeと関連性があると思われる。われわれは、DU145を用いたCATアッセイから、このHFのアゴニスト作用は、AR (野生型および変異型) にARA₇₀をco-transfectionした場合に強力に認められることを見出した。先に示したように、前立腺癌におけるARA₇₀の発現は一様ではないと思われる。前立腺癌のアンドロゲン依存性について、ARの変異が重要であると以前から考えられてきたが、われわれの結果から、ARA₇₀の発現の有無も重要な役割を果たしているものと予想される。

ARA₇₀はヒト前立腺癌細胞DU145において、初めてのリガンド依存的なアンドロゲン受容体に対する特異的coactivatorである。これにより、アンドロゲンの作用機構が分子レベルでより一層明確なものになってゆくと思われる。しかし、現在得られているデータはほとんどin vitroのものであり、in vivoに應用してゆく必要があると考えている。このことは、将来的に前立腺癌のアンドロゲン依存性喪失機序の解明や特異的な抗アンドロゲン剤の開発に役立つものと考えられる。