

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

由前列腺癌細胞對雄性激素阻斷後其雄性激素受體輔助
因子之表現差異來探討荷爾蒙不依賴性之可能機轉
**From the expression change of AR coactivators after androgen
deprivation to study the mechanism of hormone refractory
prostate carcinoma**

計畫類別： 個別型計畫

計畫編號： NSC 89-2314-B-002-352-

執行期限：2000年8月1日至2001年7月31日

計畫主持人：張宏江

共同主持人：謝汝敦

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學醫學院泌尿科

中 華 民 國 91年1月16日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

由前列腺癌細胞對雄性激素阻斷後其雄性激素受體輔助因子之表現差異來探討荷爾蒙不依賴性之可能機轉

From the expression change of AR coactivators after androgen deprivation to study the mechanism of hormone refractory prostate carcinoma

計畫編號：NSC 89-2314-B-002-352-

執行期限：2000年8月1日至2001年7月31日

主持人：張宏江 執行機構及單位名稱國立台灣大學醫學院泌尿科

共同主持人：謝汝敦 執行機構及單位名稱國立台灣大學醫學院泌尿科

計畫參與人員：助理 彭福娣

一、中文摘要

截斷雄性激素能相當有效的抑制前列腺癌細胞之生長。雖然荷爾蒙治療相當有效，但會漸漸的失去對荷爾蒙治療之感受性。為何前列腺癌細胞會由荷爾蒙依賴型轉成荷爾蒙不依賴型？現有許多假說及實驗證據解釋其原因。在這其中，以 AR 的輔助因子 (cofactor) 最受重視。許多分子生物學的實驗證據顯示在雄性激素相當低量微弱下，AR 的 cofactor 可以增強 androgen 與其 receptor 接合後啟動下游基因之生物效應，或甚至在 cofactor 存在下使 estrogen 也能啟動 AR 下游基因之生物效應。第一個被發現的雄性激素受體的輔助因子是 1996 年的 ARA70。基於 AR cofactor 的特別功能，新的 AR 調節的轉錄途徑因此被發現。在 ARA70 或是 ARA55 輔助下，抗雄性激素藥物例如 Hydroxyflutamide 或 Casodex 可能變成雄性激素。在 AR cofactor ARA70 協同作用下，天然的雌性激素 (17beta-estradiol)，可作用類似雄性激素，並活化雄性激素受體調控基因。這說明抗雄性激素藥物從拮抗性變成同質性 (agonist) 的途徑可受到 AR cofactor 的調節。簡而言之，AR cofactor 很可能就是前列腺癌轉變成雄性激素不依賴型的關鍵蛋白質。過去的研究報告，是屬於基因層次的證據，進一步必須要有細胞生物學及組織學上的佐證。因此本研究將 androgen dependent 的前列腺癌之細胞株 (LNCaP) 培養於 androgen deprived Charcoal treated FBS medium，以瞭解細胞生長在缺乏雄性激素環境下，這些 AR cofactor 是否其 mRNA 表達的量是否會有變化，本實驗完全採用 non-isotope methods 進行 Multi-probe RNase protection assay：選取 AR 相關之 cofactors 的基因序列設計一組多重探針之模版，可以同時定量分析一系列之 RNA。這種變化，將是支持進一步研究 AR cofactor 是前列腺癌轉變成雄性激素不依賴型的關鍵。

由初步的結果可知當 androgen dependent prostate cancer cell (LNCaP) 培養於 androgen deprivation 的環境下其 AR 及 ara24 的 mRNA 會增加。而 ara54 ara70 及 RAC3 的 mRNA 則減少。這個結果不同於已有的文獻報告認為 ara70 可能是前列腺癌轉變成雄性激素不依賴性的關鍵蛋白質的理論。

關鍵詞：雄性素受體，雄性素受體輔助因子，前列腺癌

Abstract

The role of androgen as an important factor in etiology and progression of human prostate cancer has been well documented. However, androgen ablation has been the cornerstone of treatment for advanced prostate cancer, but the effect is often short-lived, as hormone-refractory elements continue to proliferate. The mechanisms responsible for androgen independence remain uncharacterized. There are several hypotheses to explain why prostate cancer can transform from hormone dependent to independent status. But within them, the androgen receptor associate protein (AR cofactor) is the most important finding since 1997. Several evidences has been shown that during androgen ablation or androgen blockage, the AR cofactor can enhance the ability of AR to activate the AR target gene. By this phenomenon, the prostate cancer cell can keep growing in androgen deprivation status.

The AR functions as a ligand activated transcription factor that may play critical roles in prostate cancer growth and sexual development. The androgen receptor regulates androgen target genes by binding to androgen response elements with the potential involvement of coactivator or corepressor. Several coactivators were found e.g. ARA70, ARA55, and ARA54 for the C-terminal AR-ligand binding domain (AR-LBD), ARA160 and ARA24 for N-terminal. These coactivators can enhance DHT-mediated AR transcriptional activity and this interactions between AR and ARA70, ARA55, or ARA54 are androgen-dependent.

There are increasing evidences to show that the AR cofactor plays an important role in androgen-independent growth of prostate cancer. For example: Miyamoto *et al.* reported that antiandrogens (HF, casodex) can activate androgen target genes in the presence of ARA70 in DU145 cell line. ARA70

may be the trigger key factor between androgen dependent and independent. Yeh *et al.* reported that E2-AR-ARA70 also play an essential role for the AR function. ARA70 can induce AR transcriptional activity in the presence of E2. ARA70 is essential factor to modulate this pathway, without ARA70, this pathway will be closed.

This study establish an androgen independent prostate cancer cell line that mimic the hormone refractory status and simultaneously to analyze the changes of 10 interested mRNA (AR, Rb, ara160, ara24, ara54, ara55, ara70, BRCA1, F-SRC-1, RAC3) of AR and AR associated cofactors by the non-isotope multiple probe ribonuclease protection assay.

From the preliminary data, the mRNA expression of AR and ara24 will increase after culture in androgen deprived culture medium. But the expression of mRNA will decrease in ara70, ara54, and RAC3. This results can not support the previous reports that ARA70 may be the trigger key factor between androgen dependent and independent. So we need further cell biology evidence or different view to evaluate the role of AR cofactors in the transition from androgen dependent to independent growth.

In this one year research project, we succeed to setup a novel non-isotope multiple RPA and help us to further study several interested mRNA in prostate cancer cell growth and apoptosis. This method make it possible to simultaneously to study several mRNA expression in non-isotope environment.

Keywords: androgen receptor, coactivator, prostate cancer.

二、緣由與目的

理論背景： 雄性激素(androgen)是控制前列腺癌生長的重要因素，截斷雄性激素能相當有效的抑制前列腺癌細胞之生長。雖然荷爾蒙治療在初期的二至三年相當有效，但隨後漸漸的失去對荷爾蒙治療之感受性。為何前列腺癌細胞會由荷爾蒙依賴型轉成荷爾蒙不依賴型?現有許多假說及實驗證據解釋其原因。在這其中，以 AR 的輔助因子 (cofactor) 最受重視。許多分子生物學的實驗證據顯示在雄性激素相當低量微弱下，AR 的 cofactor 可以增強 androgen 與其 receptor 接合後啟動下游基因之生物效應、或甚至在 cofactor 存在下使 estrogen 也能啟動 AR 下游基因之生物效應。

AR 的輔助因子是細胞內輔助進行細胞生理反應的一種蛋白質或胜(peptide)，它廣泛存在人體的各種組織內。近年的研究證明在雄性激素與 AR 反應的過程中有輔助因子 (cofactors) 的介入。

第一個被發現的雄性激素受體的輔助因子是 1996 年的 ARA70，以及陸續確認的其它幾個輔助因子 ARA55、ARA54、ARA160、ARA24、Rb、SRC-1。基於 AR cofactor 的特別功能，新的 AR 調節的轉錄途徑因此被發現，以下即為與 AR cofactor 有關的例子：

a. 在 ARA70 或是 ARA55(輔助下，抗雄性激素藥物例如 Hydroxyflutamide 或 Casodex 可能變成雄性

激素。

b. 在 AR cofactor ARA70 協同作用下，天然的雌性激素(17beta-estradiol)，可作用類似雄性激素，並活化雄性激素受調控基因。

上述 a, b 兩項說明抗雄性激素藥物從拮抗性變成同質性(agonist)的途徑可受到 AR cofactor 的調節。

目的： 由以上諸多分子生物學的證據已發現 AR cofactor 是掌控 AR 啟動其目標基因轉錄反應的重要因子，甚至可以使雌性激素或抗雄性激素之物質可以表現出具有雄性激素之功能。簡而言之，AR cofactor 很可能就是前列腺癌轉變成雄性素不依賴型的關鍵蛋白質。過去的研究報告，是屬於基因層次的證據，進一步必須要有細胞生物學及組織學上的佐證。因此本研究利用 androgen dependent 的前列腺癌之細胞株(LNCaP)進行研究，以瞭解細胞生長在缺乏雄性素環境下，這些 AR cofactor 是否其 mRNA 表達的量是否會增加，假如確實可以觀察到這種變化，將是佐證 AR cofactor 是前列腺癌轉變成雄性素不依賴型的關鍵蛋白質。結果若能證明輔助因子會增強 AR 之功能，臨床藥物治療上將可試圖截斷這些輔助因子，以恆久的抑制前列腺癌細胞之生長。

方法：

1. 在建立荷爾蒙不依賴型細胞株方面將以 LNCaP 細胞培養於雄性激素匱乏的環境下，經多代之培養後將可以獲得不同代別之細胞株以進行研究。
2. 收集的細胞株代表了不同荷爾蒙感受性。進行 **Multi-probe RNase protection assay**: 選取相關之蛋白質的基因序列設計一組多重探針之模版，可以同時定量分析一系列之 RNA。由獲得的基本文獻證據，將選以下幾種可能有關的基因：ARA54, ARA55, ARA70, ARA160, ARA24, Rb, F-SRC-1, BRCA-1, Androgen receptor.並以 GAPDH 為 RNA 的 internal control.
3. probe 的製作使用 Ambion 的 in vitro transcription kit (MAXIscript T7™ Kit) labeled with Biotin-14-CTP (GIBCOBRL®), template 使用 BD Pharmingen Co. 的 hAR template (10 種與 AR 有關的 Coactivator 及兩種作為 Internal control 的 housekeeping gene). Multi-probe RNase protection assay 則使用 Ambion 的 RPAIII kit.反應後的 protected RNA 以垂直電泳器進行 polyacrylamide gel electrophoresis. Gel 以電轉漬法轉至 positive charged nylon membrane 上再以 Ambion 的 BrightStar™ Biodetect™ assay kit.處理 nylon membrane.然後使用一般的感光底片 expose 30 min.

三、結果與討論

1. 本實驗計劃完全採用 non-isotope methods,這種 Non-isotope multiple RPA assay methods 是文獻上尚未見過的報告,值得一般實驗室採用.以 Non-isotope multiple RPA assay methods 可以觀察最常見的三種前列腺癌細胞株(PC3, DU145, LNCaP)的 AR 及其相關的 coactivator 的 RNA

expression. 最明顯的是 AR 只在 androgen dependent prostate cancer cell line (LNCaP)才有表現. 請見 Figure 1.

2. 將 LNCaP 培養在 RPMI medium 1640 with 10% Charcoal/Dextran treated FBS 內,經過三週後生長速度減慢,且型態發生變化. 抽取每相隔七天的 LNCaP RNA 進行 multiple RPA assay, 以了解 androgen deprivation 對 prostate cancer cell 的 AR 及相關 coactivator 的變化. 請見 Figure 2 and table 1. 由初步的結果可知當 androgen dependent prostate cancer cell (LNCaP)培養於 androgen deprivation 的環境下其 AR 及 ara24 的 mRNA 會增加. 而 ara54 ara70 及 RAC3 的 mRNA 則減少. 這個結果不同於已有的文獻報告認為 ara70 可能是前列腺癌轉變成雄性素不依賴型的關鍵蛋白質的理論. 因此如何看待 AR cofactor 在 androgen independent prostate cancer cell 形成過程中扮演的角色,將需要不同的分子生物學的解釋.

四. 計畫成果自評

研究內容與原計畫相符、LNCaP cell 培養於 androgen-deprived medium 生長速度變緩慢,原計劃期望培養出 stable growth 的 cell line 還未達成,預期尚需一年的時間努力. 外國文獻已有以同樣方法完成新的 cell line, 因此可以考慮直接向對方索取以加速實驗的進行.

研究成果的學術或應用價值: 以 Non-isotope method 進行 multiple RPA assay methods 是高難度的定量檢測 RNA 的方法,不但可同時定量多組樣本且可以同時比較一系列多達十種之 mRNA 這是文獻上尚未見過的報告,值得一般實驗室採用.

主要發現: 由初步的結果可知於 androgen deprivation 的環境下其 AR 及 ara24 的 mRNA 會增加. 而 ara54 ara70 及 RAC3 的 mRNA 則減少. 這個結果仍不能支持已有的文獻報告的理論認為 ara70 可能是前列腺癌轉變成雄性素不依賴型的關鍵蛋白質. 因此如何看待 AR cofactor 在 androgen independent prostate cancer cell 形成過程中扮演的角色,將需要不同的分子生物學的解釋.

本次研究之方法及結果適合在學術期刊發表、

五. 參考文獻

- [1]. **Yeh, S., H. Miyamoto, and C. Chang.** Hydroxyflutamide may not always be a pure antiandrogen [letter]. *Lancet* 349: 852-853, 1997.
- [2]. **Miyamoto, H., S. Yeh, G. Wilding, and C. Chang.** Promotion of agonist activity of antiandrogens by the androgen receptor coactivator, ARA70, in human prostate cancer DU145 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7379-7384, 1998.
- [3]. **Fujimoto, N., S. Yeh, H.Y. Kang, S. Inui, H.C. Chang, Mizokami, and C. Chang.** Cloning and characterization of androgen receptor coactivator, ARA55, in human prostate. *J Biol Chem* 274: 8316-8321, 1999.

- [4]. **Yeh, S. and C. Chang.** Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5517-5521, 1996.
- [5]. **Kang, H.Y., S. Yeh, N. Fujimoto, and C. Chang.** Cloning and characterization of human prostate coactivator ARA54, a novel protein that associates with the androgen receptor. *J Biol Chem* 274: 8570-8576, 1999.
- [6]. **Hsiao, P.W. and C. Chang.** Isolation and characterization of ARA160 as the first androgen receptor N-terminal-associated coactivator in human prostate cells. *J Biol Chem* 274: 22373-22379, 1999.
- [7]. **Hsiao, P.W., D.L. Lin, R. Nakao, and C. Chang.** The linkage of Kennedy's neuron disease to ARA24, the first identified androgen receptor polyglutamine region-associated coactivator. *J Biol Chem* 274: 20229-20234, 1999.
- [8]. **Yeh, S., H. Miyamoto, K. Nishimura, H. Kang, J. Ludlow, P. Hsiao, C. Wang, Su, and C. Chang.** Retinoblastoma, a tumor suppressor, is a coactivator for the androgen receptor in human prostate cancer DU145 cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 248: 361-367, 1998.
- [9]. **Onate, S.A., S.Y. Tsai, M.J. Tsai, and B.W. O'Malley.** Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270: 1354-1357, 1995.
- [10]. **Yeh, S., H. Miyamoto, H. Shima, and C. Chang.** From estrogen to androgen receptor: a new pathway for sex hormones in prostate. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5527-5532, 1998.
- [11]. **Yeh, S., H.K. Lin, H.Y. Kang, T.H. Thin, M.F. Lin, and C. Chang.** From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5458-5463, 1999.
- [12]. **Culig, Z., J. Hoffmann, M. Erdel, I.E. Eder, A. Hobisch, A. Hittmair, G. Bartsch, G. Utermann, M.R. Schneider, K. Parczyk, and H. Klocker.** Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system. *British Journal of Cancer* 81: 242-251, 1999.

Table 1. The LNCaP are cultured in RPMI 1642 with charcoal treated FBS for three weeks. The cell are harvested weekly and the expression of mRNA were assay quantitatively by using non-isotope multiple RPA for

AR and AR cofactors. The expressions of mRNA are indicated in relative light unit of CDP-StarTM on nylon membrane electroblotted from denaturing polyacrylamide gel.

Figure 2. Samples of total RNA (15 μ g, Lane 3-6) were isolated weekly from LNCaP that cultured in RPMI 1642 medium with charcoal treated FBS. These total RNA were analyzed for distinct mRNA species by using Pharmingen's RiBoquantTM multiple-probe RPA system with the hAR multiple-probe template set. The chemiluminescent exposure on film shows RNase-protected probe following hybridization with RNA from LNCaP (Lane 3-6). Also shown are the hAR multi-probe template set not treated with RNases (Lane 1) and BrightStarTM Biotinylated RNA centuryTM size markers (1 μ g, Lane 2).