

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 13 年度博士課程進学  
氏名 渡邊資之  
指導教官名 加藤茂明

論文題目 前立腺における男性ホルモン受容体の高次機能の解析

### 1 はじめに

男性ホルモンであるアンドロゲンは、雄性生殖器官の分化誘導や機能維持、脳の性分化や性行動制御等の雄性化の主要因子であることが広く知られている。その主たる作用はリガンド依存的転写制御因子であるアンドロゲンレセプター(AR)を介した標的遺伝子群の発現制御により発揮されると考えられている。そのため、AR 遺伝子の各種変異による AR 機能不全は様々な疾患を引き起こすが、AR 機能不全と疾患との分子レベルでの関連については、不明な点が多いのが現状である。中でもアンドロゲン依存性進行性前立腺癌においては、AR のリガンド結合領域(LBD)に位置する Thr877 が Ala に点変異すること(AR<sup>T877A</sup>)が高頻度で見だされているものの、発癌や癌増悪との関係は不明である。一方、この AR 遺伝子点変異体(AR<sup>T877A</sup>)を用いた in vitro 系での解析により、アンドロゲンの特異的な結合には Thr 残基が必須であり、この点置換変異による LBD の構造変化がリガンド認識特異性を低下させ、抗アンドロゲン剤や他の内因性ステロイドホルモンへの応答性を獲得することが明らかになっている。しかしながら、この AR 点変異体(T877A)によるリガンド認識特異性の低下が、癌化の原因であるか結果であるかは全く不明である。そのため、細胞増殖における AR の機能やアンドロゲン依存性前立腺癌の増悪機構解明には、この AR 点変異体(T877A)の機能解析は格好のモデルと考えられる。

そこで本研究では、ヒト型 AR 遺伝子点変異 (T877A) を個体レベルで前立腺のみに導入するマウスラインの確立を行い、更に全身にこのヒト型 AR 点変異体を導入した前立腺でのヒト型 AR 変異体 (AR<sup>T877A</sup>) のリガンド応答性について解析した。

## 2 Cre-loxP システムを利用したヒト型 AR 遺伝子点変異 (T877A) 導入系の確立

Cre/loxP システムに基づいた標的遺伝子組み替え技術により、ヒト型 AR 遺伝子点変異 (T877A) 導入マウスの作出を以下の様に試みた。マウス AR 遺伝子座に、ヒト型 AR 点変異体 LBD (T877A) cDNA の導入を以下のターゲティングクターを介して行った。ヒト AR LBD (WT) をコードするエクソン 6~8 の cDNA の 3' 下流にヒト AR 点変異体 LBD (T877A) をコードするエクソン 6~8 の変異体 cDNA を接続し、更にヒト型 AR LBD cDNA 断片の前後に loxP 配列を 2ヶ所導入した。また各々のエクソン 8 の後ろにはクローニングベクター上にある poly adenylation (poly A) signal をつなげることで、mRNA の安定化を図った。これにより、Cre recombinase (Cre) を発現させることで、ヒト AR LBD (WT) cDNA が切り出され、ヒト AR 点変異 LBD (T877A) を含むマウス AR 変異体が発現すると期待される。このターゲティングクターを TT2 ES 細胞株にエレクトロポレーション法により導入し、2 個の相同組み替え ES クローンを単離した。得られた ES 細胞から、アグリゲーション法によりキメラマウス (AR<sup>flx/flx</sup>) を作出した。キメラマウスは全て雄であるが、WT と同様の生殖能力を有し、雄の生理機能に異常は検出されなかった。雄キメラマウスと雌 WT との交配により得られた雌ヘテロマウス (AR<sup>flx/+</sup>) を、まずは全身で Cre を発現する CMV-Cre トランスジェニックマウスと交配した。サザンブロット解析により遺伝型を解析した結果、点変異 floxed および AR 点変異導入雄マウス が得られた。このことから、マウス AR 遺伝子にヒト型点変異 (T877A) が導入されたマウスのライン化に成功したと判断した。

## 3 ヒト型 AR 点変異 (T877A) 導入マウスの解析

### 3-1 点変導入マウスの同定

ヒト型 AR 点変異 floxed マウス (以下 AR<sup>flx/flx</sup>) およびヒト型 AR 点変異導入マウス (以下 AR<sup>T877A/flx</sup>) はメンデルの法則で期待される比率で正常に出生し、成長した。またいずれのマウスラインも生殖能も有し、ヒト型点変異 (T877A) は個体発生や生存には影響を与えないことが示された。

始めに、AR 遺伝子ならびにタンパクの発現を検討した。前立腺及び精巣より取得した mRNA から RT-PCR を行ったところ、Cre の発現による AR への点変異の導入が高率 (約 75%) で行われたことが確認された。また AR mRNA 発現量は WT とほぼ変わらないものの、タンパク量は AR<sup>flx/flx</sup>、AR<sup>T877A/flx</sup> において約 50% 程度低下していた。このタンパク量の低下の理由として、ターゲティングの際に 3'UTR を省いたために、AR mRNA 群の安定性が減少した可能性が考えられた。

次に内分泌系の異常を調べたところ、AR<sup>T877A/flx</sup> において性腺刺激ホルモン (LH) の血中濃度が低下しており、LH の刺激により誘導されるテストステロン (T) の血中濃度もそれに伴い低下していた。これは AR 機能亢進に起因した LH のネガティブフィードバックの亢進によるものと考えられる。一方、エストロゲン (E2) の血中濃度には変化が認められず、前駆体となる T の低下の影響を受けないものと考えられた。

### 3-2 点変異が前立腺の形成に与える影響

機能的に成熟した前立腺の変異について、9 週齢と 17 週齢 AR<sup>T877A</sup>において詳細な解析を行った。9 週齢では、前立腺は厳格にアンドロゲン依存的に発達する課程であるため、AR タンパク発現量が低下した AR<sup>flx/flx</sup>、AR<sup>T877A/flx</sup> では前立腺全体の低形成が見られた。しかしながら、AR<sup>flx/flx</sup> に比べて AR<sup>T877A/flx</sup> の前立腺には太い腺管構造が見られ、ヒト型 AR 点変異体(T877A)の機能亢進が推察された。更にこれら腺管構造形成が完了した 17 週齢においてはその差異はより顕著になったことから、AR の点変異により形成が促進されることが証明できた。そこで AR の標的遺伝子であり前立腺の形成に関与する probasin 遺伝子発現量を検討したところ、AR<sup>T877A/flx</sup> では mRNA の発現上昇が観察された。同時に、癌抑制遺伝子の 1 つであり前立腺癌において発現低下が見られる Nkx3.1 の mRNA の発現低下も観察されたことから、このマウスでは将来自然発癌を来す可能性が示唆された。

次いで前立腺細胞増殖におけるヒト型 AR 点変異体(T877A)の機能を初代培養による MMT アッセイにて検討した。その結果、AR<sup>flx/flx</sup> では前立腺上皮細胞はアンドロゲンでのみリガンド依存的に増殖したのに対し、AR<sup>T877A/flx</sup> ではアンドロゲンのみならず E2 や抗アンドロゲンによっても増殖することが確認できた。

### 3-3 ホルモン投与による前立腺の再生及び機能維持

前立腺は去勢によるアンドロゲン除去により退縮し、アンドロゲン補充によって再生することが知られている。そこで AR<sup>T877A/flx</sup> の前立腺における抗アンドロゲン剤への応答を検討した。去勢により退縮させた前立腺に対しアンドロゲンまたは抗アンドロゲンを投与した結果、AR<sup>flx/flx</sup> ではアンドロゲンでのみ前立腺が再生した。一方、AR<sup>T877A/flx</sup> では抗アンドロゲンに対しても応答が見られた。去勢と同時にホルモンを投与した場合も、同様に AR<sup>T877A/flx</sup> では抗アンドロゲンによる前立腺の退縮抑制効果が微弱ながら見られ、応答が確認された。

## 4 考察

本研究では、ヒト型 AR 遺伝子点変異(T877A)導入マウスを作出することにより、リガンド特異性が低下した AR 点変異体の生体内高次機能の解明を試みた。作出したヒト型 AR 点変異導入マウスの前立腺において、抗アンドロゲンのアンドロゲン様作用が確認され、in vitro の系で明らかにした AR 点変異体のリガンド認識特異性の低下が、in vivo においても再現されることを証明した。更にこのヒト型 AR 点変異体はマウスの前立腺で過形成が観察されたことから、AR 変異体(T877A)のリガンド認識特異性の低下が同時に内因性ステロイドホルモン応答能を引き起こすことも証明することができ、AR 点変異体の生体内での機能亢進を明確にした。

これまでアンドロゲン依存性前立腺癌の多くにおいては、AR の過剰発現や AR タンパクのリン酸化亢進が見られること、またマウス AR 高発現トランスジェニックマウスにおいて前立腺の過形成が見られることなど、AR の機能亢進がアンドロゲン依存性癌の増悪に関与することが示唆されてきた。実際、ヒト型 AR 点変異 (T877A) 導入マウスでも前立腺の過形成や上皮細胞の増殖能亢進が見られ、この上皮細胞の増殖亢

進が前立腺癌増悪につながる可能性が考えられる。実際に、器官形成を終え性成熟した 17 週齢の前立腺において、癌抑制遺伝子である Nkx3.1 の発現低下が認められたことは、この点変異が発癌の原因となりうる可能性を示す興味深いものである。今後は AR の下流遺伝子による細胞増殖制御に着目し、更なる解析を行う予定である。

以上、本研究ではヒト型 AR 遺伝子点変異 (T877A) 導入マウスを作出し、これまで分子メカニズムの解明が困難であった進行性前立腺癌に関する個体での解析の基盤を築いた。このマウスの解析により、進行性前立腺癌で見られる点変異 (T877A) が、AR の機能亢進による前立腺の過形成を誘導することを示し、今まで不明であった AR<sup>T877A</sup> 点変異体の生体内高次機能の一端を解明した。