

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 渡邊 資之

本論文は前立腺における男性ホルモン受容体の高次機能の解析に関するものである。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>) が高頻度で見い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、点変異による 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依然として不明である。そこで本研究では、ヒト型 AR 遺伝子点変異 (T877A) を個体レベルで導入するマウスラインの確立を行い、更に全身にこの点変異体を導入したマウスの前立腺でのヒト型 AR 変異体 (AR<sup>T877A</sup>) のリガンド応答性について解析した。

ヒト型 AR 遺伝子点変異 (T877A) 導入マウスの作出にあたり、Cre/loxP システムに基づいた標的遺伝子組み替え技術を用いた。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。これより、Cre の特異的な発現によって点変異 (T877A) の導入が可能となる。こうして得られた雄キメラマウスと雌 WT を交配し、得られた雌ヘテロマウス (AR<sup>fllox/+</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。その結果、点変異 floxed および AR 点変異導入雄マウスが得られ、これより、マウス AR 遺伝子にヒト型 AR 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。ヒト型 AR 点変異 floxed マウス (以下 AR<sup>fllox/+</sup>) およびヒト型 AR 点変異導入マウス (以下 AR<sup>T877A/+</sup>) はメンデルの法則で期待される比率で正常に出生・成長し、生殖能も有した。

得られたマウスを用いてヒト型 AR 点変異 (AR<sup>T877A</sup>) 導入マウスの解析を行った。

まず始めに、ヒト型 AR 遺伝子点変異 (AR<sup>T877A</sup>) 導入マウスの同定を行った。まず、Cre の発現による AR への点変異の導入が高率 (約 75%) で行われたことを確認した。また AR タンパク量は AR<sup>WT/+</sup> に比べ AR<sup>fllox/+</sup>、AR<sup>T877A/+</sup> では共に約 50%程度低下していることを確認した。次に内分泌系の異常を調べたところ、AR<sup>T877A/+</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。

次にヒト型 AR 点変異体 (AR<sup>T877A</sup>) が前立腺の形成に与える影響について検討した。9 週齢と 17 週齢 AR<sup>T877A/+</sup> において前立腺の詳細な解析を行った。9 週齢では、AR<sup>fllox/+</sup> に比べて AR<sup>T877A/+</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。腺管構造の形成が完了した 17 週齢においてはその差異はより顕著になり、AR 点変異により前立腺の過形成が促されることが明らかになった。アンドロゲン依存性癌の発症・増悪に影響すると思われる AR 応答遺伝子群の発現量を検討したところ、前立腺の形成に関与する probasin は  $AR^{T877A/Y}$  において発現上昇が観察された。また、癌抑制遺伝子の 1 つである Nkx3.1 の mRNA の発現低下も観察され、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 AR 点変異体の機能を初代培養における MMT アッセイにて検討した。その結果、前立腺上皮細胞は  $AR^{lox/Y}$  ではアンドロゲンによってのみ増殖したのに対し、 $AR^{T877A/Y}$  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。

ホルモン投与による前立腺の再生及び機能維持について検討した。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  $AR^{T877A/Y}$  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、 $AR^{lox/Y}$  ではアンドロゲンでのみ前立腺が再生した。一方、 $AR^{T877A/Y}$  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  $AR^{T877A/Y}$  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、抗アンドロゲンへの応答が確認された。

最後に、点変異体の癌増悪への影響について解析した。前立腺癌誘導のために、TRAMP マウスを利用した。TRAMP マウスは、前立腺特異的に発現する Probasin 遺伝子の promoter により、SV 40 T antigen の発現を誘導する。Probasin の発現部位である Dorsal Prostate に着目したところ、WT 群では、WT-TR において前立腺の腺管構造が若干太くなる傾向が見られたものの、両者に大きな差異は認められず、この時期においてはまだ癌化が軽度であることが推察された。ところが、mutant マウス群では、mutant-TR において、腺管構造が肥大すると同時に崩れており、AR 点変異体の影響が強く見られた。これより、ヒト型 AR 点変異体 ( $AR^{T877A}$ ) はアンドロゲン依存性癌の増悪の原因となりうる可能性が示唆された。

本研究より、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 点変異体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。

点変異の癌への関与については、ヒト型 AR 点変異体が細胞周期制御の変容をもたらし、また癌抑制遺伝子の発現にも影響を及ぼしたことから、変異による AR 機能亢進が発癌の原因となる可能性が強く示唆された。また、TRAMP マウスとの交配により発癌を試みた、ヒト型 AR 点変異導入マウスにおいて、前立腺の腺管構造の変化が顕著であったことから、AR 点変異が癌の増悪の原因となりうる可能性が示唆された。

以上、本論文は、標的遺伝子組み替え技術を応用してヒト疾患のモデルとなる遺伝子点変異導入マウスを作成し、生体での遺伝子点変異体の機能を解明しており、分子生物学のみならず、癌治療の分野での発展性が期待され、学問上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。