

1. 課程・論文博士の別：論文博士
2. 申請者氏名（ふりがな）：原 隆人（はら たかひと）
3. 学位の種類：博士（薬学）
4. 学位記番号：博薬 第 15904 号
5. 学位授与年月日：平成16年2月12日
6. 論文題目：前立腺癌におけるホルモン療法抵抗性獲得のメカニズムの解明に

関する研究

7. 審査委員会委員 主査 東京大学 教授 岩坪 威
副査 教授 新井 洋由
副査 教授 入村 達郎
副査 助教授 青木 淳賢
副査 助教授 影近 弘之

8. 提出ファイルの仕様

提出ファイル名：原隆人論文要旨.pdf

使用アプリケーション：Adobe Acrobat

OS：win98

審査結果の要旨

氏名 原 隆人

前立腺癌は米国で最も多い癌であり、男性の癌死要因としては第 2 位の癌である。前立腺癌の増殖はアンドロゲンに依存しているため、アンドロゲン作用をブロックするホルモン療法が非常に有効である。しかし、ホルモン療法の前立腺癌抑制効果は一時的であり、2 から 3 年後には半数程度、最終的にはほとんどすべての患者で再燃が起こる。再燃癌の出現部位は 80%程度が骨、20%程度がリンパ節である。このホルモン療法抵抗性獲得のメカニズムは未だ解明されておらず、ホルモン療法抵抗性癌に対する有効な治療法は全くないのが現状である。ホルモン療法抵抗性獲得のメカニズムが未解明であることの最大の理由は、臨床癌を反映する細胞株がほとんどないことである。これまでは、ホルモン療法抵抗性癌はホルモン非依存性癌と呼ばれ、その増殖はもはやアンドロゲンに依存しないと考えられてきた。しかし、近年、ホルモン非依存性癌でアンドロゲン受容体 (AR)の発現量が増加していることが明らかにされ、ホルモン療法抵抗性と AR との密接な関係が示唆されている。前立腺癌のホルモン療法には大きく分けて 2 種類ある。一つは、去勢単独療法、もう一つは去勢療法と AR アンタゴニストの併用療法 (CAB(Combined Androgen Blockade))療法)である。申請者はそれぞれのホルモン療法抵抗性癌に対応する細胞モデルを構築し、AR に着目し抵抗性獲得のメカニズムを解明することを試みた。

1. 去勢単独療法抵抗性獲得のメカニズム

去勢療法抵抗性の臨床癌で AR 発現量が増加しており、また、再燃癌患者でアンドロゲン誘導性である Prostate specific antigen(PSA)の血中濃度が上昇することから、去勢療法抵抗性獲得に AR シグナルの亢進が関与するとの仮説に基づき実験を行った。はじめに臨床での去勢療法を模した細胞実験モデルを構築した。ステロイドホルモンを除去したメディウム(DCC メディウム)中で培養することにより、ホルモン依存性ヒト前立腺癌細胞株である MDA PCa 2b 細胞の増殖を抑制し、およそ 35 週間の持続的な増殖抑制後、このメディウム中でも増殖するようになったホルモン抵抗性癌細胞を MDA PCa 2b-hr と名付けた。この細胞株は AR 陽性、PSA 陽性であり、臨床の去勢療法抵抗性癌の特徴を有していた。

これらの細胞を用いて、ステロイドホルモン除去処理中のアンドロゲン反応性の変化を調べた。ステロイドホルモン除去処理4週間後までにアンドロゲン反応性は徐々に低下した。増殖が再開していた48週後には、アンドロゲン感受性が亢進し、低濃度のテストステロンによって増殖が促進された。この結果はARのシグナルと増殖とが密接に関係することを示しており、ホルモン抵抗性獲得にARシグナルの亢進が関与することを示唆している。

次に、ステロイドホルモン除去処理中のAR蛋白発現量の変化を調べたところ、AR発現量と増殖とが密接に関連していた。ステロイドホルモン除去処理により増殖が抑制される時にはAR発現量も低下しており、増殖が再開した時にはAR発現量も回復していた。MDA PCa 2b-hrのAR発現量はMDA PCa 2bより多かった。この結果は、AR発現量と増殖が密接に関係することを示しており、ホルモン抵抗性の獲得におけるARシグナルの亢進にAR発現量の増加が関与することを示唆している。

ホルモン抵抗性増殖におけるARシグナルの関与を調べるため、DCCメディウム中でのMDA PCa 2b-hr細胞の増殖に対するARアンタゴニストの作用を調べた。ビカルタミドはMDA PCa 2b-hr細胞の増殖を有意に抑制した。この結果は、ホルモン抵抗性増殖にARのシグナルが関与することを示している。

次に、*in vivo*におけるアンドロゲン反応性を調べるため、デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)の徐放性ペレットを埋め込んだ去勢ヌードマウス内におけるMDA PCa 2b腫瘍およびMDA PCa 2b-hr腫瘍の増殖率を比較した。DHEAを用いたのは、去勢療法で抑制されない副腎性アンドロゲンを利用することが去勢療法抵抗性のメカニズムであるとの仮説に基づく。MDA PCa 2b腫瘍は100 mg/3weeks未満のDHEAペレットにより増殖が促進されなかったが、MDA PCa 2b-hr腫瘍は1.5 mg/3weeksのDHEAペレットでも有意に増殖が促進された。この結果は、*in vivo*においてもMDA PCa 2b-hr腫瘍のアンドロゲン感受性が亢進していることを示している。

以上の結果はARシグナルの亢進により、去勢療法で抑制されない低濃度の副腎由来のアンドロゲンを利用することが去勢療法抵抗性獲得のメカニズムであるとの仮説を裏付けるものであった。

2. CAB療法に対する抵抗性獲得のメカニズム

CAB療法抵抗性の臨床癌の中にはARアンタゴニストを休薬すると腫瘍が退縮し、患者の血中PSA濃度が低下するケースがあることから、CAB療法抵抗性獲得にARの機能変化によるARアンタゴニストのアゴ

ニスト化が関与するとの仮説に基づき実験を行った。臨床の CAB 療法抵抗性癌を反映する細胞モデルが全くなかったため、はじめに、臨床での CAB 療法を模した細胞実験モデルを構築した。1 μ M のビカルタミドを含む DCC メディウム中で培養することにより、ホルモン依存性ヒト前立腺癌細胞株である LNCaP-FGC 細胞の増殖を抑制し、およそ 6 週間の持続的な増殖抑制後、このメディウム中でも増殖するようになった CAB 療法抵抗性癌細胞株を LNCaP-cxD2 と名付けた。臨床の CAB 療法抵抗性癌と同様に、メディウム中のビカルタミドを除去すると LNCaP-cxD2 細胞の増殖が抑制されたので、この細胞株は臨床の CAB 療法抵抗性癌の特徴を有すると考え、この細胞株および親株を用いて、抵抗性獲得のメカニズムの解明を試みた。

LNCaP-cxD2 細胞の増殖に対するビカルタミドの作用を調べ、親株の反応性と比較した。親株の増殖はビカルタミドにより用量依存的に抑制されたが、LNCaP-cxD2 細胞の増殖はビカルタミドにより 1 μ M をピークとし二相性に促進された。親株のテストステロンによる増殖促進作用も同様の二相性を示すことが確認されているので、この結果は、LNCaP-cxD2 細胞に対しビカルタミドがアンタゴニストではなくアゴニストとして作用することを示唆している。次に PSA の産生を調べた。親株ではビカルタミドにより PSA 産生が抑制されたのに対し、LNCaP-cxD2 細胞ではビカルタミドにより用量依存的に PSA 産生が促進された。この結果は、LNCaP-cxD2 細胞に対しビカルタミドがアンタゴニストではなくアゴニストとして作用することを示している。

ビカルタミドがアゴニストに変換されたことの分子メカニズムを調べるため、AR 遺伝子の塩基配列を決定した。LNCaP-cxD2 細胞の AR 遺伝子に親株ではなかった新たな変異がコドン 741 に見つかった。トリプトファンを指定する TGG が、システインを指定する TGT に変異していた (W741C)。LNCaP-cxD2 細胞と同様に樹立した他の細胞株の中には、コドン 741 がロイシンを指定する TTG に変異していたものもあった。

このコドン 741 の変異によりビカルタミドのアゴニストへの変換が起こると考えられたので、W741C および W741L 変異型 AR の転写活性を、AR 遺伝子および、ARE をもつルシフェラーゼ遺伝子のコトランスフェクションアッセイにより調べたところ、ビカルタミドは W741C および W741L 変異型 AR の転写活性を刺激した。この結果はコドン 741 の変異によりビカルタミドがアンタゴニストからアゴニストへ変換されることを示している。最近、ビカルタミド抵抗性癌に W741C 型 AR が検出されたとの報告が発表され、この実験モデルの妥当性が示された。

以上の結果は AR の変異により、AR アンタゴニストをアゴニストとして利用することが CAB 療法抵抗性

獲得のメカニズムであるとの仮説を裏付けるものである。

以上をまとめると、本研究において申請者は、臨床における前立腺癌のホルモン療法を模した新たな細胞モデルを構築し、去勢単独療法抵抗性獲得のメカニズムとして、AR 発現量の増加を伴う AR シグナルの亢進により去勢療法で抑制されない副腎性アンドロゲンを利用して癌が再燃する可能性を示し、一方、前立腺癌の CAB 療法に対する抵抗性獲得のメカニズムとして、AR の変異を介し AR アンタゴニストを AR アゴニストとして利用することにより癌が再燃する可能性を示した。これらの結果は、低ステロイド環境における AR 発現量の増加および AR アンタゴニスト存在環境における AR の変異が起こるメカニズムの解明に手掛かりを与え、ホルモン療法抵抗性を誘発しない抗腫瘍薬の開発に重要な情報をもたらすものであり、博士（薬学）の学位に値するものと判定した。