



これより probasin プロモーターから rabbit beta-globin polyA を含むように切り出した遺伝子断片をマウスの前核期受精卵へインジェクションを行い、この受精卵をマウスの卵管内に移植させた。出生したマウスの尾よりジェノミック DNA を抽出し、PCR を用いてトランスジェニックマウスを確認した。probasin プロモーターの DNA 配列からセンスプライマーを IGF-1 もしくは FGF-2 の cDNA 配列からアンチセンスプライマーを作成し、PCR を行った。確認したトランスジェニックマウスを繁殖、犠死させて得た前立腺組織の解析を行った。

IGF-1 トランスジェニックマウスは western blotting を用いて前立腺での IGF-1 の発現量を確認後、免疫組織染色 (IGF-1、IGFBP-3) を用いてその局在を確認した。また HE 染色標本は光学顕微鏡 (BX51-34、Olympus) デジタルカメラ (DP50、Olympus) と WINROOF(Mitani corporation,Fukui)を使用し、組織形態解析を行った。

FGF-2 遺伝子発現ベクターは Lipofectamin™ を用いてアンドロゲン依存性ヒト前立腺癌細胞樹立株 LNCaP に遺伝子導入させ、Probasin プロモーターのみを含むベクター pUC18-probasin を遺伝子導入させたものをコントロールとして FGF-2 蛋白量を western blotting にて比較した。IGF-1 トランスジェニックマウスと同様に FGF-2 発現ベクターから切り出したコンストラクトを用いて FGF-2 トランスジェニックマウスの作成を行った。FGF-2 トランスジェニックマウスの前立腺組織も免疫組織染色 (FGF-1、FGFR-2、Ki-67) を行い、IGF-1 同様に組織形態解析を行った。

(結果) IGF-1 発現遺伝子を注入した受精卵からは 7 匹(雄 4 匹、雌 3 匹)のトランスジェニックマウスが確認された。これらの雄トランスジェニックマウスを交配させて得た line 1 と 2 の F1 マウスを犠死させ得た前立腺を解析に用いた。Western blotting では、2 ヶ月令の Line1 トランスジェニックマウスと、コントロールの前立腺組織中の IGF-1 蛋白量の差異は認められなかった。しかし 8 ヶ月令のトランスジェニックマウスの IGF-1 蛋白量はコントロールマウスに比べて増加していた。6 日月令の Line2 トランスジェニックマウスではコントロールマウスの前立腺組織中の IGF-1 蛋白量と差異は認められなかった。免疫組織染色にて 1 4 日月令と 1 7 ヶ月令の line1 トランスジェニックマウスの ventral lobe の上皮細胞、dorsal lobe、lateral lobe の上皮基底膜に IGF-1 の発現が認められた。コントロールマウスでは発現は認められなかった。IGFBP-3 は ventral lobe の上皮細胞にのみ発現が確認された。ventral lobe では腺上皮が扁平化し、内腔は広がる形態の変化が認められた。

FGF-2 発現遺伝子断片を注入した受精卵からは 6 匹(雄 4 匹、雌 2 匹)のトランスジェニックマウスが得られた。これを交配させたが F 1 マウスを得ることができなかった。このため F 0 マウスを 2 2 ヶ月で犠死させその前立腺組織の解析を行った。免疫染色では FGF-2 は 4 匹中 2 匹のトランスジェニックマウスの dorsal lobe、lateral lobe、及び ventral lobe の前立腺上皮に発現が認められたがコントロールマウスでは発現が認められなかった。コントロールでは FGF-2 の発現は認められなかった。FGFR-2 の発現の局在は FGF-2 とほぼ同様であり、FGF-2 の発現が認められたトランスジェニックマウスの腺上皮に発現し、コントロールマウスではその発現は認められなかった。

間質ではトランスジェニックマウス、コントロールマウスともに FGF-2 の発現が認められた。FGF-2 を発現しているトランスジェニックマウスの dorsal lobe ではコントロールマウスにくらべて腺管が密であり、腺上皮の過形成も認められた。同じ個体の ventral lobe では上皮面積はかわらないものの管腔が増大していた。過形成を示したトランスジェニックマウスに Ki-67 染色を施行したが核が染色されたのはわずかであった。

(考察) western blotting にて IGF-1 蛋白量が 2 ヶ月令ではトランスジェニックマウスとコントロールマウスに差異が認められず、8 ヶ月令でトランスジェニックマウスでの増加が認められたが、これは probasin プロモーターがアンドロゲンの支配下にあるためと考えられた。IGF-1 蛋白の増加している line では、IGF-1 の発現の局在は ventral lobe の腺上皮、lateral lobe および dorsal lobe の上皮基底膜に認められ、ventral lobe では腺管の内腔が拡大する形態変化が認められた。これらの変化は強制発現させた IGF-1 遺伝子によるものと考えられた。また強制発現した IGF-1 を抑制させるために IGFBP-3 の発現が認められたと考えられた。各 lobe での IGF-1 発現量の差異が、lobe による形態変化の有無をもたらしたと推測された。

FGF-2 トランスジェニックマウスにおいては、dorsal lobe、lateral lobe、および ventral lobe の腺上皮に FGF-2 の発現が認められた。FGF-2 の発現している個体では dorsal lobe の過形成と、ventral lobe の管腔拡大が認められた。コントロールマウス及び FGF-2 の発現が認められない個体では形態変化は認められず、これらの形態変化も強制発現させた FGF-2 によるものと考えられた。正常前立腺においては腺上皮には FGF-1 は発現せず、受容体は FGFR2-IIIb の発現が知られているが、FGF-2 を強制発現させたことにより受容体も FGFR2-IIIc へのスイッチが認められた。これによってあらたなオートクライン作用が構築され形態変化がもたらされたと考えられた。

(まとめ) IGF-1 を強制発現させることにより ventral lobe にて腺管の内腔が開大し、ヒトにおける肥大症に類似した変化がもたらされた。FGF-2 トランスジェニックマウスでも ventral lobe では IGF-1 トランスジェニックマウスに類似し個々の腺管内腔が広がる傾向を示した。また FGF-2 は dorsal lobe にのみ過形成をもたらし、lobe によっての反応の差異が認められた。これらの結果は今後、前立腺癌の発症機序の解明に寄与すると考えられた。