

論文の内容の要旨

論文題目 前立腺癌におけるアンドロゲン受容体結合部位と新規アンドロゲン
応答遺伝子の同定

指導教官 大内尉義

専攻 生殖発達加齢医学

平成 16 年 4 月 1 日入学

高山賢一

[研究の背景と目的]

前立腺癌はアメリカでは男性において最も頻繁に診断される癌であり日本においても近年発生率は急激に増加している。正常の前立腺上皮および前立腺癌はアンドロゲン受容体(AR)を介しアンドロゲンによりその増殖の制御を受けている。そのため AR を阻害する抗アンドロゲン療法は進行した前立腺癌において確立された治療法であり、癌が再燃した治療耐性のアンドロゲン非依存性癌においても AR シグナルの重要性が報告されている。

AR は男性ホルモンであるジヒドロテストステロン(DHT)をリガンドとして細胞質内で結合したのち核内に移行しゲノム上のアンドロゲン応答配列(ARE)と結合し転写因子として機能する核内受容体のファミリーの一つである。AR は SRC(Steroid receptor coactivator)ファミリーと言われる p160 共役転写活性化因子、ヒストンアセチル化酵素と結合することでターゲット遺伝子のプロモーター領域においてヒストンのアセチル化などの修飾を与え転写活性化を起こす。

これまで cDNA マイクロアレイ法によりアンドロゲン応答遺伝子の同定が試みられてきたが AR の直接のターゲットを同定するためには AR 結合部位を網羅的に同定するアプローチが求められてきた。近年、転写因子の結合部位をより網羅的に同定する方法として ChIP-chip 法が開発されてきた。クロマチン免疫沈降法(Chromatin immunoprecipitation: ChIP)はゲノム中での転写因子の結合を確認する有用な手段として用いられているが、ChIP-chip 法は ChIP に組み合わせるゲノムの DNA 配列を短いプローブに区切りアレイ上に並べたゲノムタイリングアレイを用いる手法である。標識した ChIP DNA をアレイにハイブリダイゼーションさせ有意なシグナルを得られる領域を検出する。本法の開発により様々な転写因子の結合部位同定に応用が試みられており、核内受容体の結合部位を同定するために ChIP-chip を応用することが有用であると考えられエストロゲン受容体(ER)についてはゲノム中に広く分布する ER 結合部位が同定されてきた。

本研究では ChIP-chip 法を用いて AR の直接的な応答遺伝子の同定を目的とした。まず ChIP によって得られた DNA をゲノムタイリングアレイにハイブリダイゼーションさせることで ENCODE(Encyclopedia of DNA Elements) 領域における新規の AR 結合部位を同定した。ENCODE 領域は 30 Mb の全ゲノム上の 1%を占める領域でありヒト全ゲ

ノムの代表的なモデルとして使用されている。さらに AR 結合部位の転写調節への役割、周辺遺伝子の発現変化を解析し新規の AR 応答遺伝子を同定した。本研究から AR の前立腺癌における機能や AR の下流シグナルが前立腺癌の発生、悪性化にどのように寄与しているかを総括的に考察した。

[結果と考察]

まず代表的なアンドロゲン応答遺伝子である PSA(Prostate specific antigen)をモデルに AR の機能を検証した。PSA の 5'上流領域には 2 箇所 AR 結合部位が知られている。転写開始点近傍におけるプロモーター領域の ARE、4K 上流にあるエンハンサー領域の ARE が報告されている。AR を発現するヒト前立腺癌細胞の LNCaP 細胞において合成アンドロゲンである R1881 により刺激し ChIP を行いプロモーター領域、エンハンサー領域共に AR が結合することまたルシフェラーゼアッセイによりエンハンサーを介した転写活性化が起こることを確認した。

次にゲノム上におけるバイアスのない AR 結合領域の同定のため ChIP-chip 法による解析を行った。ヒトゲノム中の ENCODE 領域を 25 bp ずつアレイに並べた DNA タイリングアレイを用いて AR 結合部位(ARBS)の同定を試みた。クロマチン免疫沈降法によって得られた DNA を *in vitro* transcription(IVT)法を用いてバイアスのかからない状態にて増幅し得られた DNA を断片化、ビオチン化しタイリングアレイにハイブリダイゼーションした。コントロールと比較して有意に増加(P 値 $<10^{-5}$)している領域を 10 箇所同定した。

得られた ARBS は intron 領域及び転写開始点より 10 kb 以上離れた intergenic 領域に存在しているものがほとんどであった。得られた AR 結合領域の例として UGT1A 遺伝子近傍および CDH2 遺伝子内に AR 結合部位を認めた。UGT1A は 10 個のアイソフォームからなる代謝酵素で UGT1A1、UGT1A3 の転写開始点の中間の領域に強い AR 結合領域を認めた。また接着分子である CDH2 の intron 1 においても強い AR の結合が観察された。

次に得られた AR 結合部位の Sequence を用いて ARE motif の同定を試みた。ARE は AGAACA nnn TGGTCT の回文型の配列であるが過去に報告された ARE 配列をみると中央の G/C 塩基が保存されている例が多く配列中の塩基により“重み”が異なるため転写因子結合配列中のそれぞれの塩基に重みづけをしたものが matrix と言われている。matrix として TRANSFAC, Jasper を用いたところ何らかの ARE 様の motif が見出された。これらの ARE motif に対してプライマーを設計し LNCaP 細胞において ChIP assay を施行し 10 個すべてにおいて 10 倍以上の濃縮が認められ ChIP-chip 法により求められた AR 結合領域が偽陽性を含まないものであることが確認された。

次にアセチル化ヒストン H3、ヒストン H4、RNA Polymerase II (Pol II)に対する特異抗体を用いて ChIP Assay を行い定量的 RT-PCR を用いて 10 個の AR 結合部位のアセチル化、Pol II の結合を解析した。UGT1A1、CDH2 の AR 結合部位においてヒストンのアセチル化の亢進、RNA Pol II の結合が強く観察された。またその他の ARBS すべてにおい

てヒストン H4 のアセチル化が確認された。今回同定した ARBS10 箇所(#1-10)のうち ARBS#1、4、5、10 においてリガンド依存性のヒストン H3 アセチル化の亢進、RNA Pol II の集積が確認され、AR 結合領域において転写活性化を促す変化が起きている可能性が示唆された。

また ARBS 近傍の遺伝子のアンドロゲン処理における mRNA 発現の変化を検証しアンドロゲン応答遺伝子の同定を試みた。10 個の遺伝子のうち 8 個は 2 倍以上の発現上昇を認め、特に UGT1A1、Pepsinogen C は強い発現誘導が確認された。また MET、SCAP2 の 2 個については処理により発現の抑制が観察された。これらのことより AR 結合領域の近傍の遺伝子の発現がアンドロゲンにより制御を受けていることが示唆された。

さらに SRC ファミリーの特異抗体を用いて ChIP Assay を行った。SRC ファミリーは SRC1、SRC2/GRIP1/Tiff2、SRC3/AIB1/ACTR の 3 種類が報告されアンドロゲン刺激により PSA プロモーターに集積されヒストンのアセチル化を促進し転写を活性化することが報告されている。今回同定した 10 個の AR 結合領域において SRC ファミリーの集積が起きているのか確認した。10 個の AR 結合領域においては特に UGT1A、CDH2 の AR 結合領域において SRC ファミリー全ての結合が強く確認された。また ARBS#4、#5 においては SRC1 の集積が上昇しているのが確認された。全ての AR 結合部位に SRC ファミリーが関与しているとは言えないもののいくつかの AR 結合部位については SRC ファミリーによる転写活性化の機構が働いていることが示唆された。

次に AR 結合領域がエンハンサーとしてアンドロゲンによる転写活性化に寄与している可能性を考ルシフェラーゼアッセイを用いて検証した。UGT1A の ARBS を挿入したルシフェラーゼベクターではアンドロゲン添加時に活性の上昇が認められ、その一方で ARE motif に変異を入れると活性の上昇は消失し、UGT1A の ARE motif がアンドロゲンによる転写活性化に寄与しておりエンハンサーとして働くことが考えられた。また CDH2 の ARBS を挿入したルシフェラーゼベクターにおいてもアンドロゲン添加時に活性の上昇が確認された。AR 結合領域がエンハンサーとして働きアンドロゲンによる転写活性化に関わっている可能性が示唆された。

本研究により新たに見出した標的遺伝子はカドヘリン、プロテアーゼ、代謝酵素、シグナル伝達、成長因子受容体、イオンチャンネル、転写因子など様々な機能にわたる遺伝子が同定された。個々の遺伝子と前立腺癌とのかかわりは未知なものがほとんどであり今後の機能解析により前立腺癌への影響が明らかになるものと期待された。

[結論]

本研究によりアンドロゲンの直接的な応答遺伝子を ChIP-chip 法を用いて同定した。AR 結合部位は従来考えられていた領域より多様な領域に分布し、機能としては転写活性化に寄与していることが示唆されより広い範囲で転写制御を行っていると考えられた。またその標的遺伝子は前立腺癌の悪性化、発癌に関与している因子が多くさらに範囲を広げることでより広いアンドロゲンのターゲットを同定することが可能でありアンドロゲンによる前立腺癌発症機構の解明が可能になるものと期待される。