

論文の内容の要旨

論文題目

前立腺における男性ホルモン受容体の生体内高次機能解析

指導教官 北村唯一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

高橋さゆり

【目的】 ホルモン抵抗性前立腺癌においてアンドロゲンレセプター (AR) 遺伝子のリガンド結合領域に位置する点変異 AR^{T877A} が高頻度で報告されている。前立腺癌細胞株 LNCaP の解析により、この AR 点変異により AR のリガンド認識特異性の低下がもたらされ、DHT のみならずエストロゲンやフルタミドなど異種リガンドに対する応答性が獲得されることが明らかとなった。この AR 点変異の生体での機能や発癌・癌増悪との関係を明らかにするために、Cre-loxP システムを用いて AR^{T877A} 点変異を前立腺特異的に発現するコンディショナルマウスを作成し解析を行った。

【方法・結果】 AR コドン 877Thr は AR の exon8 にコードされるため、点変異を導入したヒト AR_{exon6-8} の cDNA を、loxP サイトに挟まれた WT ヒト AR_{exon6-8} cDNA に接続しターゲティングベクターを構築した。遺伝子ターゲティング法によりこれを導入した floxed マウスを作成し、前立腺時期組織特異

的に cre 蛋白を活性化する PSA-cre トランスジェニックマウスと交配することで、前立腺組織時期特異的に AR 点変異を発現することを可能にした。スクリーニングのために挿入した NEO_r 遺伝子が入った状態の L3 型 AR^{fl_{ox}}/Y マウスは精巣腫瘍を発生するなどの問題があり NEO_r を抜いた L2 型 AR^{fl_{ox}}/Y マウスを作成した。交配により得られた PSA-CreAR^{fl_{ox}}/Y マウスに 6 週齢でタモキシフェンを投与し点変異の導入を確認した。このマウスは野生型と同様に成長し血中のテストステロン、LH、エストラジオール濃度はコントロールである AR^{fl_{ox}}/Y マウスと差はなかった。

16 週齢にて前立腺を摘出し定量したところ、ventral prostate はコントロール群が $1.15 \pm 0.07 \text{mg}$ に対して点変異導入体では $1.55 \pm 0.07 \text{mg}$ と大きく、anterior prostate, dorsal prostate も同様に大きかった。組織所見で腺管形成が亢進していることを確認した。24 週齢、52 週齢でも同様に点変異導入マウス前立腺で形成が亢進していた。Brd-U 染色で点変異導入マウスの陽性細胞率が高く増殖能が亢進していることが確認された。また 52 週齢まで経過をみたが発癌は起こらなかった。

次に生体内での AR 点変異体のホルモン応答性を調べるために、24 週齢のマウスを用いて、ヒドロキシフルタミド(HF)、エストラジオール(E2)、カゾデックス(CSDX)の応答性を、ホルモンペレットを皮下に埋め 3 週間ホルモン投与し定量した。また同時に castration も行い退縮抑制効果を調べた。コントロールでは、HF、E2、CDX のいずれでも前立腺の退縮を生じた。AR 点変異導入マウスでは DHT+castration 群を 100%とし比較定量したところ、castration 単独群では 17.1%に退縮したが、HF+castration 群では 28.7%、E2+castration 群では 85.8%と前立腺退縮の抑制が見られた。また CSDX+castration 群では 14.7%と抑制効果は見られなかった。病理組織所見では HF+castration 群および E2+castration 群での腺管構造は保たれており AR 点変異のリガンド認識の低下が示唆された。

前立腺癌における AR 点変異の効果を調べるため、SV40 を強制発現し前立腺癌を発癌するモデルマウスである TRAMP マウスを点変異導入マウスおよびコントロールマウスに交配した。前立腺癌による死亡週齢を統計したところコントロール TRAMP 群では 38 週齢ごろより生存率が低下し 62 週齢で 0%になるのに対し、AR 点変異導入 TRAMP 群では、21 週齢より生存率が低下し、38 週齢ですべてが死亡した。また各週齢により平均前立腺重量を比較したところ 24 週齢で 10,000 倍の重量差を認め、AR 点変異が TRAMP マウスの発癌を早めたことが示唆された。

前立腺癌組織をヌードマウス前立腺に同所移植し 8 週間後に前立腺癌を定量したところ、control 群では $2700 \pm 1273 \text{mg}$ であるのに対し TRAMP-点変異群

は $9420 \pm 4572\text{mg}$ と癌増殖の亢進を認めた。このヌードマウスに **castration** を行い同様に前立腺癌組織を同所移植したところ、**AR** 点変異導入前立腺癌では **castration** を行わない移植マウスと同等の前立腺癌を形成した。次にマウスでは報告のない骨転移モデルを作るため、ヌードマウス頸骨に前立腺癌を同様に移植した。4ヶ月後、**AR** 点変異導入前立腺癌移植ヌードマウスは巨大な腫瘍を移植部に形成。レントゲンにて骨破壊と造骨を伴った腫瘍であり、病理組織では破骨細胞の低下を認めヒト前立腺癌で見られる造骨性骨転移像に類似した。

mRNA 発現を **real time PCR** 法で解析したところ、**PTEN**、**c Myc**、**p 27**、**NKX3.1** などの発癌のイニシエーションになる遺伝子の変動は見られなかった。しかし **AR** 点変異導入マウスで **TGF β 1**、**TGF β 2**、**TGF β 3** および **TGF β R 1**、**TGF β R3** の発現が上昇しており、**TGF β** シグナルの下流の **Smad3** の上昇が見られ、**TGF β** シグナルの亢進が癌増悪に関与している可能性が示唆された。

前立腺癌の増殖には上皮細胞—間質クロストークが重要と考えられているため、**Wnt** シグナルの前立腺癌への関与の解明を試みた。**Wnt 5 a** ヘテロノックアウトマウスを、**AR** 点変異導入 **TRAMP** マウスと交配したところ、前立腺癌の発癌の時期が遅れ、抑制に働いた。**Wnt** シグナルが前立腺癌の発癌に影響を与えていることが示唆された。**Wnt5a** 抗体を用いて、ヒト前立腺組織の免疫染色を行ったところ、正常前立腺、前立腺肥大症では陰性であったが、前立腺癌上皮細胞で高い確率で陽性であった。

【結論】 **AR** 点変異体は前立腺の腺管形成を促進した。**DHT** のみならず **HF** や **E2** をもリガンドとすることから内因性ホルモンをリガンドとすることが示唆された。**AR** 点変異体が **TRMP** マウスによる前立腺癌の発癌を早めること、また増殖速度を著しく速めることがわかった。また **castration** を行っても癌の増殖が全く抑制されなかったため内因性ホルモンをリガンドとして成長する可能性が示唆され、ヒトにおけるホルモン抵抗性前立腺癌の解明につながると考えられた。mRNA 発現の解析では発癌遺伝子の亢進や癌抑制遺伝子の低下は見られなかったが、**TGF β** シグナルが亢進していた。**TGF β** シグナルは、正常の細胞では増殖抑制に働くが進行癌などでは逆に癌促進、転移の促進に働くことが最近わかってきた。**AR** 点変異がなんらかのクロストークにより **TGF β** シグナルを活性化し癌の増悪に関与していると考えられた。この **AR** 機能亢進モデルで **Wnt5a** 蛋白が前立腺癌の亢進に働くことが証明され、ヒト前立腺癌でも同様の所見を得た。本実験により明らかにされた **Wnt5a** の前立腺癌の関与は、臨床における前立腺癌のスクリーニングや治療への応用が期待できるであろう。