

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応答遺伝子 14-3-3ζの意義

指導教員 本間 之夫教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程 外科学専攻

氏名 村田 太郎

前立腺癌は、アメリカ人男性において最も高頻度に診断される癌であり、癌死の原因としても 2 番目に多い。日本においても近年発生率は急激に増加している。前立腺癌は、アンドロゲンの作用により増殖、進行し、その作用は主にアンドロゲン受容体(androgon receptor: AR)を介して発揮されると考えられている。そのため、AR を阻害する抗アンドロゲン療法は進行性前立腺癌において確立された治療法となっている。さらに、抗アンドロゲン療法に抵抗性となった去勢抵抗性前立腺癌においても、AR が癌の進展に重要な役割を果たしていることが報告されている。その機序については十分解明されていないが、AR の活性型変異、増幅あるいは癌抑制遺伝子の不活化や他の成長因子などのシグナルの影響により AR が活性化されていると報告されており、アンドロゲン応答遺伝子

がアンドロゲン非依存性癌の増殖に働いている可能性が示唆される。よって AR の標的遺伝子の探索と機能解析は、前立腺癌の発生、進行の機序の解明につながり、また新たな診断マーカーや治療薬の開発に応用できる可能性がある。

近年、転写因子のゲノム上における結合を実験的に確認する有用な手段としてクロマチン免疫沈降法(Chromatin immunoprecipitation: ChIP)が利用されている。そして ChIP に組み合わせてゲノムタイタリングアレイを用いることで転写因子の結合部位をより網羅的に同定する方法(ChIP-chip 法)が開発された。これまで、当研究グループでは、ChIP-chip 法を用いてヒトゲノム上に AR の結合部位を同定しヒトゲノム上において 2872 ヶ所の AR 結合部位を同定し報告している。一方で、当研究グループでは、前立腺癌において 14-3-3 蛋白のアイソフォームの 1 種である 14-3-3 σ の発現が低下していることを過去に報告しており、前立腺癌における 14-3-3 蛋白の機能について以前より注目していた。そして、この AR 結合部位の解析データを活用し、14-3-3 蛋白の各アイソフォームを検索したところ、14-3-3 ζ において AR の結合部位が存在することを見出した。私はこの解析によって AR の結合部位が同定された標的遺伝子の一つとして 14-3-3 ζ に着目するに至った。

14-3-3 蛋白は、代謝経路の制御、酸化還元の制御、RNA 転写プロセッシング、タンパク合成分解、ミトコンドリア輸送、細胞周期の制御、アポトーシスなど、

真核生物の様々な細胞活動に関わっている。近年の報告では、その異常発現が発癌や癌の進行にかかわる可能性が示唆されている。14-3-3 ζ は乳癌や肺癌において高発現し、細胞増殖を促進し予後不良因子であることが報告されており、癌遺伝子としての役割が示唆されている。前立腺癌における14-3-3 ζ の機能については、AR陰性前立腺癌細胞株DU145において、14-3-3 ζ の高発現によりトポイソメラーゼI阻害薬9-nitrocamptothecinにより誘導されるアポトーシスに対し抵抗性となるとの報告がある。しかし、14-3-3 ζ とアンドロゲンおよびARとの関係についての報告はなく、前立腺癌における14-3-3 ζ の意義はいまだ明らかではない。

そこで本研究では、新規アンドロゲン標的の候補遺伝子である可能性が示唆された14-3-3 ζ の前立腺癌におけるアンドロゲン応答性と機能を解析することを目的とした。AR陽性であるヒト前立腺癌細胞株LNCaPを用いて、14-3-3 ζ が前立腺癌の増殖、進行に与える影響やARとの相互作用について検討した。さらに、前立腺の臨床検体における14-3-3 ζ の発現を解析し、臨床的意義についても検討した。

まず、ヒト前立腺癌LNCaP細胞における14-3-3 ζ のアンドロゲン応答性発現を検証した。LNCaP細胞を72時間ホルモン枯渇状態で培養後、0.1%エタノールまたは10 nM R1881で刺激し、刺激後0時間、24時間、48時間の3時点でRNA

および蛋白を回収した。定量的 Real-time PCR にて 14-3-3 ζ の mRNA レベルを評価したところ、アンドロゲン刺激により 14-3-3 ζ の mRNA レベルが上昇していた。また、Western blot 法にて 14-3-3 ζ の蛋白レベルを比較したところ、mRNA での変化と同様にアンドロゲン刺激により 14-3-3 ζ の発現が増加していた。14-3-3 ζ はアンドロゲンによって mRNA および蛋白レベルで発現が増加しており、アンドロゲン応答遺伝子であることが確認された。

そこで、LNCaP 細胞の 14-3-3 ζ 安定発現細胞株を作成し、14-3-3 ζ が前立腺癌細胞に与える影響を検証した。細胞の増殖能を MTS assay にて評価したところ、14-3-3 ζ 安定発現細胞株は Control vector 細胞株と比較し有意に増殖能が亢進していた。培養培地に etoposide を添加した後の MTS assay では、14-3-3 ζ 安定発現細胞株は Control vector 細胞株と比較し、生存細胞数が有意に多いことが示された。アポトーシス細胞数を評価する目的で培地に etoposide を添加した後 TUNEL assay を行ったところ、14-3-3 ζ 安定発現細胞株は Control vector 細胞株と比較し、アポトーシスが誘導されている Fluorescein-12-dUTP 染色細胞の陽性率が有意に低かった。さらに、Cell migration assay にて細胞移動能を比較したところ、14-3-3 ζ 安定発現細胞株は Control vector 細胞株と比較し、細胞移動が有意に亢進していた。よって、14-3-3 ζ の過剰発現により、LNCaP 細胞は増殖能、移動能が亢進し、アポトーシスに対する耐性を獲得することが示された。一方、LNCaP 細胞の内在

性 14-3-3 ζ を siRNA を用いてノックダウンした上で同様の実験を行ったところ、増殖能が低下し、etoposide により誘導されるアポトーシスに対し感受性が高まることが明らかとなった。以上より、14-3-3 ζ は前立腺癌細胞の増殖能、移動能の亢進、アポトーシス耐性獲得において重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、14-3-3 ζ の AR との相互作用を調べる目的で、免疫沈降法を用いた Western blot 法を行った。14-3-3 ζ がアンドロゲン依存性に AR と結合することを、14-3-3 ζ 安定発現細胞株と通常の LNCaP 細胞両方で証明した。さらに、細胞の免疫染色法を用いて、14-3-3 ζ は主として細胞質に存在するが、アンドロゲン存在下に核内にも局在することが示された。よって、14-3-3 ζ はアンドロゲンにより AR と結合し核内に移行することが示唆された。

さらに、14-3-3 ζ が AR の転写活性に及ぼす影響を検証する目的で、PSA-Luc ベクターを用いた Luciferase assay を行った。アンドロゲン刺激下で 14-3-3 ζ 安定発現細胞株は Control vector 細胞株と比較して、有意に Luciferase 活性が上昇していた。逆に、LNCaP 細胞の内在性 14-3-3 ζ をノックダウンすると、アンドロゲン刺激下での Luciferase 活性は有意に低下した。14-3-3 ζ 安定発現細胞株および Control vector 細胞株の PSA mRNA レベルを定量的 RT-PCR にて評価したところ、14-3-3 ζ 安定発現細胞株は Control vector 細胞株と比較して有意に PSA mRNA レベ

ルが上昇していた。LNCaP 細胞の PSA mRNA レベルは、si14-3-3 ζ (5 nM)の導入により Control に対し低下した。これらの結果より、14-3-3 ζ は AR の転写活性に対し促進的に働くことが示された。

最後に、前立腺手術標本における 14-3-3 ζ の発現を評価した。免疫組織化学法にて、前立腺癌 90 例中 50 例(55.6%)において 14-3-3 ζ が強発現していたが、良性前立腺組織では強発現例は20例中2例(10%)しかなく、両群間で統計学的に有意な差を認めた(P<0.001)。また、14-3-3 ζ が強発現していた前立腺癌症例では、強発現していない前立腺癌症例より、リンパ節転移を認める例が有意に多かった(P=0.03)。前立腺手術検体からレーザーマイクロダイセクション法により癌、非癌部を選択的に採取した。採取した組織より RNA を抽出し、14-3-3 ζ の発現量を定量的 RT-PCR により mRNA レベルにて解析した。癌部における 14-3-3 ζ mRNA レベルは、非癌部と比較して有意に高かった。以上より、前立腺癌は良性前立腺組織に比べ14-3-3 ζ が高発現していることが mRNA および蛋白レベルで示された。

以上より、新規アンドロゲン応答遺伝子 14-3-3 ζ は AR と結合して AR の転写活性を促進し、前立腺癌の発生、増殖、進行に重要な役割を果たしていることが示唆された。14-3-3 ζ は前立腺癌における新たな診断マーカーあるいは分子標的治療のターゲットとしての可能性が期待される。