

## 審査の結果の要旨

氏名 村田 太郎

本研究は、ChIP-chip 法を用いたヒトゲノム上のアンドロゲン受容体(AR)結合部位の解析により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 $\zeta$ 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 $\zeta$ 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 $\zeta$ の発現を解析し、臨床的意義についても検討した。そして、下記の結果を得ている。

1. LNCaP 細胞において、14-3-3 $\zeta$ はアンドロゲン刺激によって mRNA および蛋白レベルで発現が増加し、アンドロゲン応答遺伝子であることが確認された。
2. LNCaP 細胞の 14-3-3 $\zeta$ 安定発現細胞株を作成し、14-3-3 $\zeta$ が前立腺癌細胞に与える影響を検証した。14-3-3 $\zeta$ 安定発現細胞株は Control vector 細胞株と比較し有意に増殖能、移動能が亢進しており、etoposide により誘導されるアポトーシスに対して耐性を獲得していた。逆に、LNCaP 細胞の内在性 14-3-3 $\zeta$ を siRNA を用いてノックダウンを行うと、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った。以上より、14-3-3 $\zeta$ 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。
3. 免疫沈降法を用いた Western blot 法にて、14-3-3 $\zeta$ がアンドロゲン依存性に AR と結合することを、14-3-3 $\zeta$ 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 $\zeta$ 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 $\zeta$ 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。
4. PSA-Luc ベクターを用いた Luciferase assay にて、アンドロゲン刺激下で 14-3-3 $\zeta$ 安定発現細胞株は Control vector 細胞株と比較して、有意に Luciferase 活性が上昇することが示された。逆に、LNCaP 細胞の内在性 14-3-3 $\zeta$ 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。また、14-3-3 $\zeta$ 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 $\zeta$ (5 nM)の導入により Control に対し低下した。以上より、14-3-3 $\zeta$ は AR の転写活性に対し促進的に働くことが示された。
5. 前立腺手術標本における 14-3-3 $\zeta$ 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 $\zeta$ 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られた( $P<0.001$ )。また、14-3-3 $\zeta$ 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 RNA を抽出し、14-3-3 $\zeta$  の発現量を定量的 RT-PCR により mRNA レベルにて解析したところ、癌部における 14-3-3 $\zeta$  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 $\zeta$  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、本論文は、新規アンドロゲン応答遺伝子 14-3-3 $\zeta$  が 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を明らかにした。本研究は、14-3-3 $\zeta$  が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の可能性となりうることを示唆していると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。