

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
木下昌重	主査 教授 勝 岡 洋 治 主査 教授 清 水 章 副査 教授 森 浩 志 副査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 谷 川 允 彦
主論文題名 Differently regulated androgen receptor transcriptional complex in prostate cancer compared with normal prostate (前立腺癌組織ではアンドロゲン受容体転写複合体の調節は正常前立腺組織と異なる)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》            前立腺癌の治療において重要な疑問点は、癌の進行と共にアンドロゲンに対する感受性が変化することである。アンドロゲン除去療法は早期では有効であるが、やがて無効となり予後不良となる。アンドロゲンはアンドロゲン受容体(以下AR)を介して生物学的機能を発揮する。最近、AR の転写調節機構には転写共役因子が大きな役割を果たしていることがわかってきた。本研究では、前立腺癌患者の癌組織および正常組織における AR および AR の共役因子の遺伝子発現量を定量し、得られた結果をもとに癌組織および正常組織の AR 転写複合体における構成遺伝子同士の相対的な関連について検討した。</p> <p>《対象と方法》            患者および測定検体            大阪医科大学附属病院泌尿器科で手術を行った前立腺癌患者 15 名からインフォームドコンセントを得て検体を採取した。手術時に摘除した前立腺から正常組織および癌組織を得て、スライスし凍結保存した。解凍後、定法に従い RNA を抽出し、cDNA を合成した。トータル RNA200ng を逆転写して cDNA を合成した。</p> <p>測定遺伝子およびリアルタイム PCR による発現定量法            測定遺伝子はサイバーグリーンによる半定量法でスクリーニングし、プローブ法により定量を行った。報告されている AR に関連する転写共役因子の中から 8 個の遺伝子を選択し癌組織および正常組織でスクリーニングを行った。その結果FHL2 が、癌組織で特異的に遺伝子発現が低下していることがわかった。次に定量法で、AR,AR の標的遺伝子である PSA および転写共役因子 FHL2 と SMRT の遺伝子発現量を測定した。遺伝子配列は NCBI より入手し、プライマーおよびプローブはオリゴソフトで設計し、合成を委託した。プローブ法における基準物質は PCR 産物を pGEM ベクターに組み替えて得られたものからコピー数を計算して、測定ごとに標準直線を得て測定値をコピー数で表した。内部標準として <math>\beta</math> アクチン遺伝子の発現量を定量し、目的遺伝子発現量のコピー数を <math>\beta</math> アクチンで割ったものを相対的な比として算出して解析に用いた。</p>	

## 統計解析

統計解析は Statview で行った。それぞれの遺伝子発現量同士の関連の強さを評価するために相関係数を測定した。相関係数同士の有意差検定は、Z テストで行った。p 値が 0.05 以下を統計的有意とした。

## 《結果》

### 転写共役因子のスクリーニング

AR に関連する転写共役因子の中から、ARA55, FHL2, SRC1, Cyclin D1, Cyclin E, SMRT, CBP および TIF2 のプライマーを作成し、癌組織と正常組織由来の cDNA を用いて、スクリーニングを行った。5 検体を用いて行った結果、FHL2 の遺伝子発現量が癌組織で 2 から 4 倍低下していることがわかった。その他、7 個の遺伝子は両者間で大きな差が認められなかった。

### AR 転写複合体構成遺伝子発現定量

AR は転写共役因子により活性あるいは抑制される。AR 転写複合体の構成遺伝子の遺伝子発現量をリアルタイム PCR で定量した。対象は、AR 遺伝子および AR の標的遺伝子である PSA、癌組織で発現量の低下していた転写共役因子 FHL2 を選んだ。また、FHL2 は転写を活性する働きを有するため、対照として抑制する遺伝子である SMRT も選択した。リアルタイム PCR により、精度、感度ともによく定量でき再現性も確認できた。内部標準で補正した比を用いて癌組織と正常組織を比較したところ、FHL2 の遺伝子発現量のみが癌組織で有意に低下していた(平均:癌組織  $0.146 \pm 0.021$ 、正常組織  $0.336 \pm 0.12$ 、 $p=0.03$ )。その他 3 つの遺伝子発現量では有意差が認められなかった。

### AR, PSA, SMRT および FHL2 の遺伝子発現の関連

次に、癌組織と正常組織で AR の転写調節機序が異なるのではないかと考えて、遺伝子同士の発現量の関連を相関係数で評価した。正常組織では、強い正の相関が見られるのは AR 対 FHL2 のみであった。一方、癌組織では、AR、FHL2、SMRT のそれぞれの組み合わせで強い正の相関がみられた。PSA と他の遺伝子では癌組織、正常組織ともに無相関であった。相関係数を Z テストで検定した結果、AR 対 SMRT、FHL2 対 SMRT を指標に用いると、癌組織と正常組織では有意差をもって異なる集団であることが分かった。

### 臨床的病期分類による解析

患者を臨床的病期分類である TMN 分類、Gleason 分類および血清 PSA 値の 3 つに分けて解析した。PSA が 20 以上のグループでは AR の遺伝子発現量が低下しており、統計的に有意であった。その他の解析で有意差を示すものは認められなかった。

## 《考察》

本研究で、前立腺癌組織と正常前立腺組織では AR 転写調節機序が異なることが示された。このことは進行性前立腺癌で、アンドロゲンに対する感受性が変化することを示唆する。つまり正常前立腺組織ではアンドロゲンによる生物学的作用は、AR を含めた転写調節複合体で調節されているが、一方、前立腺癌組織では、転写共役因子の変化が AR の DNA 結合能やリガンド結合能に影響を与え AR の転写調節機序に異常をきたし、その結果、アンドロゲン濃度に関係なく生物学的作用を有するようになると考えられる。本研究は FHL2 の遺伝子発現が癌組織で低下していることを示した。一方、アンドロゲン不応性癌組織においては FHL2、SRC1、TIF2 といった転写共役因子が過剰発現しているという報告がある。これらの報告は前立腺癌組織では最初から AR 転写複合体の調節異常が存在し、癌の進展とともに調節機構が破綻したことを示唆していると考えられる。

《結語》

本研究で、前立腺癌組織において、FHL2 遺伝子の発現量が低下していることを示し、新しい腫瘍マーカーとして報告する。さらに、相関係数を Z テストにより検定したところ癌組織と正常組織では AR 転写調節機序が異なる可能性のあることを示した。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	木下昌重
論文審査担当者		主査 教授 勝 岡 洋 治 主査 教授 清 水 章 副査 教授 森 浩 志 副査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 谷 川 允 彦	
主論文題名 Differently regulated androgen receptor transcriptional complex in prostate cancer compared with normal prostate (前立腺癌組織ではアンドロゲン受容体転写複合体の調節は正常前立腺組織と異なる)			
論文審査結果の要旨			
<p>前立腺はアンドロゲン依存性に成長する臓器であり、前立腺癌も同様に発生から進展の全ての過程にアンドロゲンがかかわっていることが知られている。アンドロゲンはアンドロゲン受容体を介して機能を発揮するが、アンドロゲン受容体の転写調節機構が十分にわかっているというわけではなく、特に進行性の前立腺癌はアンドロゲン不応性となる。前立腺癌におけるアンドロゲン転写調節機構の解析は、単に発癌のメカニズムだけでなくアンドロゲン依存性消失の機序の解明にもつながる。</p> <p>申請者は、AR および転写共役因子の遺伝子発現を定量し、遺伝子同士の相対的な関連が癌組織と正常組織で異なるかを検討し以下の結果を得ている。</p> <p>前立腺癌組織において、FHL2 遺伝子の発現量が低下していることより新しい腫瘍マーカーとなる可能性があること、さらに多変量解析により前立腺癌組織と正常前立腺組織では AR 転写調節機序が異なることが示された。</p> <p>これらの結果は、前立腺癌が進行に伴いアンドロゲン不応性を獲得する機序を説明する重要な知見を与えるものである。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) International Journal of Urology 12: 390-397, 2005</p>			