

氏名	いの うえ たか ひろ 井 上 貴 博
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3124 号
学位授与の日付	平 成 19 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Requirement of androgen-dependent activation of PKC ζ for androgen-dependent cell proliferation in LNCaP cells and its roles in transition to androgen-independent cells. (LNCaP 細胞の増殖にはアンドロゲン依存性に PKC ζ が活性化されることが必要で、その活性化がアンドロゲン非依存性細胞への変異に関与している)
論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 田 潤 教 授 松 田 道 行 教 授 篠 原 隆 司

論 文 内 容 の 要 旨

前立腺癌にはアンドロゲン除去療法が有効であるが、おおよそ2年後には大半の症例でアンドロゲン除去療法の効果が低下する。このホルモン不応性機序の詳細はいまだに不明である。アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP はアンドロゲン除去下では増殖しえない。この LNCaP 細胞を長期にアンドロゲン除去下で培養し続け、アンドロゲン除去下での増殖能力を獲得した変異株 AILNCaP 細胞を樹立した。この変異モデルを用いて、アンドロゲン非依存性増殖機序に関与する細胞内シグナル伝達経路を解明することが本研究の目的である。アンドロゲン除去下での AILNCaP 細胞の増殖は、アンドロゲン受容体特異的阻害剤である bicalutamide 投与でもその細胞増殖は抑制されなかったため、アンドロゲン除去後も存在する極微量のアンドロゲン刺激による可能性は低かった。活性型 p42/p44 MAPK の発現が LNCaP 細胞ではアンドロゲン除去に伴い上昇していた。一方、AILNCaP 細胞では恒常的にその活性型蛋白の発現が上昇しており、LNCaP 細胞に比べその発現が高かった。しかし、p42/p44 MAPK を抑制しても AILNCaP 細胞の増殖は抑制されなかったため、p42/p44 MAPK の恒常的活性化はこのモデルでのアンドロゲン非依存性増殖には関与していなかった。LNCaP 細胞ではアンドロゲン除去に伴い、mTOR/S6 kinase (S6K) 経路の活性が低下し、この経路が AILNCaP 細胞で恒常的活性化していることを見出した。S6K の活性を制御しているとされる kinase 群の中で、TSC2、PDK1 および Akt はその活性型の発現に LNCaP 細胞と AILNCaP 細胞とでは差がなかった。しかし、その群のうち、PKC (Protein kinase C) ζ がアンドロゲン除去に伴い LNCaP 細胞でその活性が低下し、AILNCaP 細胞で恒常的に活性化していることを見出した。PKC ζ の特異的阻害剤である PKC ζ pseudosubstrate inhibitory peptide を LNCaP および AILNCaP 細胞に投与すると mTOR/S6 kinase (S6K) 経路の活性が低下し、細胞増殖も抑制された。さらに PKC ζ と S6K とが LNCaP 細胞内で結合し、その結合はアンドロゲン刺激で増強された。LNCaP 細胞では PKC ζ /mTOR/S6K 経路はアンドロゲン刺激で活性化され、その活性化はアンドロゲン受容体を介していた。PKC ζ pseudosubstrate inhibitory peptide で PKC ζ の活性を阻害すると、アンドロゲン受容体陰性前立腺癌細胞株 DU145、PC3 においても mTOR/S6 kinase (S6K) 経路の活性が低下し、細胞増殖も抑制された。したがって、PKC ζ /mTOR/S6K 経路の活性がアンドロゲン依存性、非依存性に関わらず前立腺癌細胞株において細胞増殖に関与していることが示唆された。さらにホルモン治療を施していない限局性前立腺癌組織 67 例、184 スポットでの免疫組織学的解析で活性型 PKC ζ と活性型 S6K との発現が正の相関を示し、双方の活性型が陽性であるスポットはそうでないスポットに比べ有意に細胞増殖の指標でもある Ki67 が高い傾向であった。ホルモン治療を施した限局性癌 12 例、29 スポットではその 25 スポット、86%で双方の活性型とも陽性を示した。したがって、PKC ζ /mTOR/S6K 経路の活性が前立腺癌細胞の増殖に関与し、その恒常的活性化がホルモン不応性変異の一機序であること *in vivo* でも示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP からアンドロゲン除去下でも増殖しうる変異株 AILNCaP 細胞を樹立した。この変異モデルを用いて、アンドロゲン非依存性増殖機序に関与する新たな細胞内シグナル伝達経路を解析した。

Immunoblotting および kinase assay 法を用い、LNCaP 細胞で PKC (Protein kinase C) と mTOR/S6kinase (S6K) 経路がアンドロゲン刺激で活性化され、AILNCaP 細胞では、その経路がアンドロゲン除去下でも恒常的に活性化されていることを示した。この経路の活性を PKC と pseudosubstrate inhibitory peptide で特異的に阻害すると、LNCaP、AILNCaP 細胞のみならず、アンドロゲン受容体陰性前立腺癌細胞株 DU145、PC3 においても細胞増殖が低下することから、この経路が前立腺癌細胞の細胞増殖に必要であることを示された。

ホルモン治療未施行および治療後ヒト限局性前立腺癌組織で構成された tissue array による免疫組織学的解析を用い、PKC と TOR/S6K 経路の活性が前立腺癌細胞の増殖に関与し、その恒常的活性化がホルモン不応性変異の一機序であることが *in vivo* でも示唆された。

以上の研究は前立腺癌のホルモン不応性機序の一因の解明に貢献し、新たな分子標的の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものとみとめる。

なお、本学位授与申請者は平成 19 年 3 月 12 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。