

## 論文の内容の要旨

氏名：伊藤 亜希子

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：TMPRSS2-ERG 融合遺伝子を標的としたピロール・イミダゾール（PI）ポリアミドの前立腺癌に対する抗腫瘍効果の検討

### 【背景および目的】

前立腺癌は日本において近年増加傾向である。米国において TMPRSS2-ERG 融合遺伝子は前立腺癌の約半数に観察され、前立腺癌のマーカーおよび予後不良因子として報告されている。AR 依存性の TMPRSS2-ERG 融合遺伝子発生にかかわる配列（Break Fusion Site）に結合する特異的な PI ポリアミドを設計し、生成抑制効果およびヒト前立腺癌に対する抗腫瘍効果の検討を行った。PI ポリアミドは芳香族アミノ酸 N-methylpyrrole (Py) および N-methylimidazole (Im) で構成される分子であり、DNA に配列特異的に結合する。PI ポリアミドと DNA への結合は、DNA 結合蛋白と DNA の結合に相当する親和性を持ち、Im/Py と Py/Py の組み合わせ次第で、多様な配列の DNA に結合させることができる。この PI ポリアミドを各遺伝子のプロモーター領域の転写因子結合部位に結合させることで、遺伝子特異的な発現抑制が可能である。

### 【対象と方法】

TMPRSS2-ERG の Break Fusion Site に結合する PI ポリアミドを設計・合成し、Gel shift assay を用いて上記配列に対する PI ポリアミドの結合能を検討した。次に AR を発現し、DHT 刺激によって初めて TMPRSS2-ERG 融合遺伝子を発現するヒト前立腺癌細胞株 LNCaP、AR ならびに TMPRSS2-ERG が発現している VCaP および AR ならびに TMPRSS2-ERG 陰性ヒト前立腺癌細胞株 PC3 を用いて主要細胞株への影響を検討した。アンドロゲン (DHT) 刺激を行った LNCaP に、融合ポリアミドを投与し TMPRSS2、ERG 特異的プローブを用いた FISH 法により転座陽性細胞率を計測した。陰性対照ポリアミド投与群についても同様に実験した。

次に LNCaP、VCaP、PC3 に対し、ポリアミド処理と DHT 刺激を施行し、qRT-PCR にて TMPRSS2-ERG および ERG の mRNA 発現レベルを分析した。また、細胞増殖速度は MTS assay を用いて測定し、細胞の遊走能に与える影響については Cell migration assay により検討した。最後に、 $3 \times 10^6$  個の腫瘍細胞を皮下に移植した 7 週齢の雄マウスに融合ポリアミドまたは陰性対照ポリアミド週 1 回、4 週間にかけて尾静脈注射し、腫瘍の大きさを経時的に計測し、融合ポリアミドの *in vivo* における腫瘍細胞増殖抑制効果の検討を行った。

### 【結果】

融合ポリアミドは Break Fusion Site に配列特異的に強く結合することが Gel shift assay により確認できた。また、その効果は用量依存的であることが示された。FISH 解析を行ったところ、陰性対照ポリアミドを投与した LNCaP において、DHT 刺激後、TMPRSS2 と ERG の共局在を示す細胞数が有意に増加した。一方、この DHT 刺激による染色体転座は、融合ポリアミド投与群にて減少した。融合遺伝子の発現量を real time PCR にて調べたところ、融合ポリアミド投与下では陰性対照ポリアミドと比較して有意に発現が抑制されていた。VCaP では融合ポリアミドによる融合遺伝子の発現抑制効果は観察されなかった。MTS assay では、融合ポリアミドで処理した LNCaP は陰性対照ポリアミド処理群と比較して DHT 刺激後 4 日後に細胞増殖の有意な減少を示した。一方、PC3 と VCaP における細胞増殖には影響しなかった。また、融合ポリアミド投与群では、LNCaP において細胞遊走を有意に減少させた。一方、VCaP および PC3 においては、遊走能の抑制は観察されなかった。融合ポリアミドの *in vivo* における腫瘍細胞増殖抑制効果の検討では、腫瘍増殖は融合ポリアミドで処置したマウスにおいて有意に減少した。

### 【結論】

今回設計した、前立腺癌特異的融合遺伝子 TMPRSS2-ERG の Break Fusion Site を標的とした融合ポリアミドは、標的 DNA 配列に結合し、アンドロゲン感受性のヒト前立腺癌細胞株 LNCaP における融合遺伝子の生成・発現を抑制した。更にこの PI ポリアミドは LNCaP の腫瘍成長を *in vitro* および *in vivo* において抑制した。以上のことから、融合ポリアミドは前立腺癌に対して有意な遺伝子制御薬になりうると考えられた。