

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 安藤 嵩  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 728 号  
学位授与の日付 平成 29 年 3 月 23 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 Dihydrotestosterone synthesis pathways from inactive androgen  
5 $\cdot$ -androstane-3 $\cdot$ ,17 $\cdot$ -diol in prostate cancer cells: Inhibition of  
intratumoural 3 $\cdot$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities by abiraterone.  
(前立腺がん細胞内における非活性型アンドロゲン 5 $\cdot$ -androstane-3 $\cdot$ ,17 $\cdot$ -diol  
からのジヒドロテストステロン合成: アビラテロンによるがん細胞内 3 $\cdot$ -水酸化ス  
テロイド脱水素酵素阻害)

論文審査委員 主査 教授 味岡 洋一  
副査 教授 曾根 博仁  
副査 講師 原 昇

### 博士論文の要旨

【背景・目的】前立腺がん (PC) は日本のみならず世界的に増加している重要な悪性疾患である。一般的に、有転移性・進行性前立腺がんに対してはアンドロゲン抑制療法 (ADT) が中心的な治療法であり、生体内でのアンドロゲン生成を阻害して高い有効性を示す。しかし、ほとんどの症例が最終的には去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) へと進展し、強い治療抵抗性を示すようになる。そのため、去勢抵抗性獲得機序の解明は急務であり、様々な機序の存在が示されてきた。その一つとして、長期間の ADT にも関わらず、CRPC 細胞内にはジヒドロテストステロン (DHT) が残存していることが示され、この残存 DHT の存在が PC の去勢抵抗性獲得機序になっていると考えられている。長年、活性型アンドロゲンである DHT から代謝生成された 5 $\cdot$ -androstane-3 $\cdot$ ,17 $\cdot$ -diol (3 $\cdot$ -diol) と 5 $\cdot$ -androstane-3 $\cdot$ ,17 $\cdot$ -diol (3 $\cdot$ -diol) は活性を持たない非活性型アンドロゲンとされていたが、近年、一般的なアンドロゲン合成経路以外に 3 $\cdot$ -diol 経路での DHT 供給経路が存在していることが示され、アンドロゲン代謝の多様性が再度注目されてきている。アンドロゲン代謝には様々な代謝酵素が作用するが、中でも 3 $\cdot$ -水酸化ステロイド脱水素酵素 (3 $\cdot$ -HSD) はアンドロゲン代謝不可逆的に進める重要な酵素である。新規 CRPC 治療薬であり、アンドロゲン合成を阻害する CYP17A1 阻害薬のアビラテロン (abi) がこの 3 $\cdot$ -HSD を阻害しうることが示され、新しい CRPC 治療の可能性を示唆した。今回、申請者は、3 $\cdot$ -diol の異性体である 3 $\cdot$ -diol が PC 細胞に及ぼす作用と、その代謝を含めた PC 細胞内のアンドロゲン代謝に対する abi の阻害効果について詳細な検討を行った。

【方法】前立腺がん細胞株の LNCaP と VCaP を用いた。各種薬剤が添加された培養液中で細胞株を 3 日間培養した後に各種測定を行った。アンドロゲンとしてデヒドロエピアンドロステロン (DHEA)・エピアンドロステロン (EpiAND)・3 $\cdot$ -diol を用いた。MTS assay で細胞増殖を、Tandem-R 法で PC 細胞の分泌蛋白であ

る前立腺特異抗原 (PSA) の培養液中への分泌量を、質量分析法で細胞内において代謝生成されたアンドロゲンの培養液中への分泌を、RT-PCR 法で細胞内の mRNA 変化を測定した。また、siRNA トランスフェクション法により LNCaP の 3 $\beta$ -HSD-type 1 (3 $\beta$ -HSD-1) をノックダウンし、3 $\beta$ -diol の作用の変化を確認した。

**【結果】** 3 $\beta$ -diol を添加すると、LNCaP の細胞増殖・PSA 分泌は亢進し、これらの亢進作用は DHEA あるいは EpiAND を添加した場合よりも強く、細胞培養液中に分泌された DHT 濃度と強く相関していた。VCaP に対しても同様の 3 $\beta$ -diol による細胞増殖・PSA 分泌亢進作用が確認された。LNCaP は 3 $\beta$ -diol の存在下において、継続的に増殖可能であった。DHEA・EpiAND・3 $\beta$ -diol による LNCaP の PSA 分泌亢進作用は abi の添加によって阻害され、各アンドロゲンからの DHT 合成も阻害されていた。LNCaP 細胞内では 3 $\beta$ -diol から DHEA を始めとした DHT より上流のアンドロゲンが再合成 (back-conversion) されており、この再合成は abi による阻害を受けないことが確認された。LNCaP 細胞内のアンドロゲン代謝は 3 $\beta$ -HSD の存在部位に一致して abi により阻害されていた。3 $\beta$ -diol による PC 細胞へのアンドロゲン作用は、3 $\beta$ -diol から代謝生成された DHT によるものと考えられ、その代謝経路としては 3 $\beta$ -HSD による DHT への直接変換が中心であると考えられた。更に、Abi はこの直接変換を含む、3 $\beta$ -HSD の介在する細胞内アンドロゲン代謝全てを阻害することができ、3 $\beta$ -diol が DHT へと至るいずれの代謝経路も阻害可能であった。3 $\beta$ -HSD には二つのサブタイプが存在するが、PC 細胞においては type 1 (3 $\beta$ -HSD-1) が発現していることが分かっており、siRNA トランスフェクション法によって LNCaP の 3 $\beta$ -HSD-1 発現を抑制したところ、有意に 3 $\beta$ -diol の作用を抑制することが可能であった。

**【考察】** 近年、新規 CRPC 治療薬として登場した abi の臨床的有効性は CRPC となってもなお、アンドロゲンの作用が PC にとって重要であることを示唆し、PC 細胞内におけるアンドロゲン代謝が再度注目を集める一つの契機となった。今回、申請者は、PC 細胞株を用いて PC 細胞内に新しい DHT 再合成経路が存在することを示し、PC 細胞内には複雑なアンドロゲン代謝が存在することを示した。DHT 再合成を含めた複雑なアンドロゲン代謝経路の存在は、ADT 下で PC が生存し、更に去勢抵抗性を獲得して CRPC へと至る一つの機序になると考えられた。また、申請者は、DHT 再合成経路を含め、PC 細胞内におけるアンドロゲン代謝の鍵となる 3 $\beta$ -HSD (特に 3 $\beta$ -HSD-1) 活性を abi が阻害することを示した。3 $\beta$ -HSD-1 は前立腺細胞に特異的・選択的に発現しており、3 $\beta$ -HSD-1 をノックダウンすることで 3 $\beta$ -diol の作用を抑制できたことから、3 $\beta$ -HSD が新しい CRPC 治療のターゲットになりうると思われた。

**【結論】** DHT の不活化代謝物で非活性型アンドロゲンとされていた 3 $\beta$ -diol から DHT が再合成されており、PC 細胞内には複雑なアンドロゲン代謝が存在することを示した。また、abi は PC 細胞内における全ての 3 $\beta$ -HSD 活性を阻害することができ、この 3 $\beta$ -HSD が新しい CRPC 治療のターゲットになりうると思われた。

#### 審査結果の要旨

アンドロゲン抑制療法に抵抗性を示す去勢抵抗性前立腺癌の去勢抵抗性獲得機序として、3 $\alpha$ -diol 経路でのジヒドロテストステロン (DHT) 配給経路が注目されている。本研究では、3 $\alpha$ -diol 異性体である 3 $\beta$ -diol が前立腺癌細胞に及ぼす作用と、その代謝を含めた前立腺癌細胞内のアンドロゲン代謝に対する abi (CYP17A1 阻害薬であるアピラテロン) の阻害効果について検討した。前立腺癌細胞株 LNCaP と VCaP に各種アンドロゲンを添加し、PSA 分泌量、代謝生成されたアンドロゲンの分泌量を測定し、siRNA トランスフェクション法で LNCaP の 3 $\beta$ -HSD-type 1 をノックダウンして、3 $\beta$ -diol の作用変化を確認した。その結果、

申請者は、前立腺癌細胞内に新しいDHT再合成経路が存在すること、同細胞内には複雑なアンドロゲン代謝が存在すること、同細胞内におけるアンドロゲン代謝の鍵となる $3\beta$ -HSD(水酸化ステロイド脱水酵素)活性をabiが阻害すること、 $3\beta$ -HSDは前立腺癌細胞に特異的・選択的に発現しており、それをノックダウンすることにより $3\beta$ -diol作用を抑制できること、を明らかにした。

以上のことから、本研究は $3\beta$ -diolからDHTが再合成されており、前立腺癌細胞内には複雑なアンドロゲン代謝が存在すること、abiは前立腺癌細胞内における $3\beta$ -HSD活性を阻害することから、 $3\beta$ -HSDが新しい去勢抵抗性前立腺癌治療のターゲットになりうることを示した点で、学位論文としての価値を認める。