

原著

## 前立腺癌でみられるアンドロゲンレセプター変異体の リガンド結合の特異性

床鍋 繁喜

### Ligand Binding Specificity of Androgen Receptor Mutants detected in Prostate Cancer

Shigeki Tokonabe (Department of Urology, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Advanced prostate cancer may often progress as an androgen independent tumor in spite of androgen ablation therapies or medication of antiandrogen drugs. This diverse resistance to the hormonal therapies is thought to be due to the amplified, overexpressed or mutated androgen receptor (AR). Previous studies indicated that the mutated AR loses the specificity to the ligands. However, the functional relationship between mutations of AR and specificity of ligands are poorly understood. In this report, the author shows the dissociation constants (Kd) of mutated ARs to eight ligands including an antiandrogen drug (hydroxyflutamide). Only one amino acid mutation in the ligand-binding pocket, can cause a significant change on the binding affinity. Loss of ligand specificity is observed in the mutated AR such as L701H, H874Y, T877A and T877S, of which mutation is located in 3 or 11  $\alpha$ -helix of the ligand binding domain. Various changes of the affinity are seen among the mutants, which suggest that the mutated ARs could be different mechanisms for tumor growth in prostate cancer cell.

**Keywords:** androgen receptor, mutation, prostate cancer

*J Saitama Med School* 2004;31:25-31

(Received November 13, 2003)

### 緒言

現在、進行性前立腺癌の治療はアンドロゲンの作用を阻害する内分泌療法を主体として行われており、約90%の前立腺癌に奏効する。しかし、治療開始後2~3年以上(18~24カ月)経過すると癌は治療抵抗性となって再び増大することがしばしばみられる。また、治療薬である抗アンドロゲン薬の本来の作用に反して逆に腫瘍の増殖に働く antiandrogen withdrawal syndrome の報告<sup>1,2)</sup>がある。このような臨床的な観察から、進行性前立腺癌ではリガンドの刺激に対する腫瘍細胞の反応に多様な変化が生じていることが推察される。

これまで進行性前立腺癌のアンドロゲンレセプター (AR) には発現量の増加<sup>3,4)</sup>や変異体の出現<sup>5-7)</sup>が報告されており、これらのARの異常が癌の内分泌療法抵抗性や antiandrogen withdrawal syndrome の主要な要因と考えられている。ARはN末端に転写活性化部位 (Transactivation) , 中央に DNA 結合

部位 (DBD) , C末端にリガンド結合部位 (LBD) の大きく3つのドメイン構造を持ち (Fig. 1A) , 前立腺癌でみられるARの変異体ではリガンド結合部位における変異が多い(79%)<sup>8)</sup>。また、リガンドに対する特異性の消失については、これまでに個々の変異体で報告されている。エストロゲンやプロゲステロン<sup>7)</sup>あるいはコルチゾール<sup>9,10)</sup>に対して反応するものや、抗アンドロゲン薬によって活性が増強したり、腫瘍細胞が増殖したりする<sup>11,12)</sup>変異体の報告がある。しかし、これまで野生型ARと比較して個々の変異体ARでは変異部位が異なることでリガンドとの結合がどのように変化しているのか、またリガンドとの解離定数を決定してそれぞれを比較した考察はされていない。

本研究では前立腺癌で報告されているリガンド結合部位の変異体を8種類作製し、リガンドに対する解離定数の検討及び各変異体とリガンドとの結合状態の観察を行った。そこで結合状態を定量的に解析し、アンドロゲン非依存性の機能と病態との関連性に対する分子レベルの考察を行った。

## 方法

### 1 変異体の作製と発現

#### ARのcDNAのクローニングベクターへの挿入

ARのcDNAはpSGAR2に挿入された状態でChawnschang Chang博士から供与を受けた。ARにはN末端領域のcDNAにGC配列に富む部分 (Fig. 1A) があり全配列をPCRで増幅することはできなかった。このため以下に示すようにARのcDNAを3つのフラグメントに分けて、pBluescript II KS (-) のマルチプルクローニングサイト (MCS) のSal I siteとBam HI siteの間に3段階で挿入して、pARを作製した。

まず、ARのC末端領域の1691から2757までのcDNAをPCRで増幅し、Hind III siteとBam HI siteを用いてpBluescript II KS (-) のMCSに挿入してpAR-HBを作製した。さらに、N末端領域の1から117までのcDNAをPCRで増幅しpAR-HBのSal IとHind III siteの間に挿入してpARASHを作製した。最後に、残りの118から1690までのcDNAのフラグメントを制限酵素Sma IとHind IIIでpSGAR2から切り出した後、pARASHのSma I siteとHind III siteの間に挿入してpARを作製した。

#### 変異体のcDNAの作製

前立腺癌で報告されているリガンド結合部位の変異で、かつ複数の報告がある合計8種類の変異体を選択して作製した (Table 1)<sup>5, 7, 12, 13</sup>。8種類中、L701H, V715M, R726L, V730M, V757A, T877Aの6種類は内分泌抵抗性の進行性前立腺癌 (Stage D) で認められたAR変異体であった。また、L701HとV715Mはリガンド結合部位の3 $\alpha$ -ヘリックスの部位における変異体で

あり、H874Y, T877A, T877Sは11 $\alpha$ -ヘリックスの部位における変異体であった。

変異体の作製にはオリゴヌクレオチド指定変異法 (Kunkel法) を用いた。以下に示すように、まずウラシルを含むpAR-HBの一本鎖DNAを調整し、次いで変異の含んだオリゴヌクレオチドを用いて二本鎖DNAを合成、シーケンスで変異の塩基配列を確認し、最後に変異部をpARに挿入して変異体ARのcDNAを作成した。

一本鎖DNAを調整するためにpAR-HBを用いてBW313のコンピテント細胞を形質変換し、ヘルパーファージM13KO7 (moi=20) と共に0.2 $\mu$ g/mlのウリジンを含んだ培地で37 $^{\circ}$ Cで6時間培養した。培地を5,500 rpmで10分間遠心し、その上清にpolyethyleneglycol (PEG) 溶液を濃度が5% PEG / 0.5 M NaClとなるように加えて、室温で15分間放置した。遠心後、沈殿したファージをTE (pH 8.0) で溶解し、PEG溶液で再度精製してウラシルを含んだpAR-HBの一本鎖DNAを調整した。

調整した一本鎖DNAに相補的となるように、変異を含んだ8種類のオリゴヌクレオチド (Table 1) を設計した。これらのオリゴヌクレオチドをそれぞれT4 DNAキナーゼを用いてリン酸化した後、一本鎖DNAにアニールさせT7 DNAポリメラーゼを用いて伸張反応を行い、ウラシルを含むヘテロの二本鎖DNAを合成した。これをDH5 $\alpha$ コンピテント細胞で大量に調整することにより、ウラシルを含まない8種類の変異体のcDNAを得た。

これらのcDNAをpARのHind III siteとBam HI siteの間に挿入してpARL701H, pARV715M, pARR726L, pARV730M, pARV757A, pARH874Y, pART877A, pART877Sを作成した。

Table 1. AR mutants in prostate cancer

mutant	change		oligonucleotide sequence	location	patient information	
	base	amino acid			stage	authors
L701H	ctc $\rightarrow$ cac	Leu $\rightarrow$ His	5'-ttgcagcctgtg <u>cact</u> ctagcctcaatg-3'	3 $\alpha$ -helix	D2	Suzuki et al.
V715M	gtg $\rightarrow$ atg	Val $\rightarrow$ Met	5'-cagctgttacacatggtcaagtgccca-3'	3 $\alpha$ -helix	D2	Watanabe et al. Culig et al.
R726L	cgc $\rightarrow$ ctc	Arg $\rightarrow$ Leu	5'-ttgcctggcttctc <u>caact</u> tacacgtgg-3'		D1	Elo et al.
V730M	gtg $\rightarrow$ atg	Val $\rightarrow$ Met	5'-cgcaacttacacatgccaactccaggatg-3'	4 $\alpha$ -helix	D2	Newmark et al.
V757A	gtc $\rightarrow$ gcc	Val $\rightarrow$ Ala	5'-tcctcaccatg <u>ccaact</u> ccaggatg-3'		D1	Marcelli et al.
H874Y	cat $\rightarrow$ tat	His $\rightarrow$ Tyr	5'-gcgagagagctgtatcagttcactttt-3'	11 $\alpha$ -helix	B	Taplin et al.
T877A	act $\rightarrow$ gct	Thr $\rightarrow$ Ala	5'-ctgcatcagttc <u>gct</u> tttgacctgc-3'	11 $\alpha$ -helix	D2	Suzuki et al.
T877S	act $\rightarrow$ agt	Thr $\rightarrow$ Ala	5'-tgcatcagttcagtttgcactgct-3'	11 $\alpha$ -helix	D2	Suzuki et al. Taplin et al.

### 組換え体ウイルスの産生・精製・増幅

Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) 細胞及び HF (High Five) 細胞は Complete TC-100 培地 (10% FCS) を用いて 27 °C で培養した. pVL1392 由来のトランスファクター pTOF に, それぞれの変異体の cDNA を Nde I site と Bam HI site を用いてサブクローニングした. 得られた DNA 1.0  $\mu$ g との直鎖状バキュロウイルス DNA (BaculoGold™ Pharmingen) 0.25  $\mu$ g とを 5  $\mu$ l の LIPOFECTIN (GIBCO-BRL) を用いて  $0.5 \times 10^6$  の Sf9 細胞にトランスフェクション (27 °C, 4 時間) した後 3 日間培養し, 相同組換えによって組換え体ウイルスを産生した.

産生したウイルスを以下の方法でプラーク精製した.  $2 \times 10^5$  の Sf9 細胞に産生したウイルスを含む培養上清を 1, 10, 100  $\mu$ l の 3 段階に分けて感染 (27 °C, 4 時間) させ, 2% NuSieve GTG Agarose (FMC BioProducts) を重層した. 27 °C で 5 から 7 日間培養し, プラーク形成後にウイルスを含んだアガロースを回収した.

プラーク精製したウイルスを含むアガロースと  $2 \times 10^5$  cells の Sf9 細胞とを 24 well のプレートで 27 °C, 3 日間培養しウイルスを増幅した. タンパク質の発現を確認するために増幅させたウイルス 100  $\mu$ l を  $2 \times 10^5$  の HF 細胞に感染 (27 °C, 3 日間) させ, 回収した細胞を 150  $\mu$ l の sample buffer に溶解, その 15  $\mu$ l を 8% のゲルを用いて SDS-PAGE を行い Coomassie Brilliant Blue (CBB) で染色した. AR の過剰発現が認められたウイルスを 2 段階目以降の増幅に用いた. 40  $\mu$ l のウイルスと  $2 \times 10^7$  cells の Sf9 細胞を 150 cm<sup>2</sup> のフラスコで 27 °C, 3 日間培養してさらに増幅し, 最後にその培養上清 4 ml と  $5 \times 10^8$  cells の Sf9 細胞を 1 l のスピナーフラスコで 27 °C, 3 日間培養して, 合計 3 段階で増幅した.

### 変異体 AR の発現

増幅させたウイルス 40 ml と  $5 \times 10^8$  cells の HF 細胞を 1 l のスピナーフラスコで培養し (27 °C, 48 時間), 変異体 AR のタンパク質を大量に発現させた. 回収した細胞を 20 ml の緩衝液 (20 mM Hepes-KOH (pH 7.9), 10% glycerol, 100 mM KCl, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM dithiothreitol) に懸濁し, 超音波ホモゲナイザーを用いて均質化した. 均質化した抽出液を 15,000 rpm, 4 °C で 20 分間遠心し, 上清を細胞抽出液として結合実験および競合実験に用いた.

## 2 結合実験及び競合実験

### 結合実験

結合実験には細胞抽出液を調整して 1 反応あたり 100  $\mu$ g の AR タンパク質を用いた. リガンドには

0.2-16 nM の [<sup>3</sup>H] Mibolerone (PerkinElmer™) を用いた. 結合反応は 20 mM Hepes-KOH (pH 7.9), 10% glycerol, 100 mM KCl, 10 mM sodium phosphate, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM dithiothreitol を含む 100  $\mu$ l の反応系で 4 °C, 8 時間行った.

反応液を 200  $\mu$ l の hydroxyapatite (バイオゲル HT, BIO-RAD) と混合し, レセプターと結合した [<sup>3</sup>H] Mibolerone をフィルター (Whatman GF/C filter) で回収した. 反応液に 0.1% Triton X-100 を含んだ洗浄液 5 ml でフィルターを 3 回洗浄し, 乾燥後, 5 ml の液体シンチレーター (OCS, Amersham) を用いて [<sup>3</sup>H] を計測した.

非特異的結合は反応系にラベルされていない Mibolerone をそれぞれの反応系の [<sup>3</sup>H] Mibolerone の 1,000 倍の濃度で競合させて測定した.

### 競合実験

競合実験は 5 nM の [<sup>3</sup>H] Mibolerone を用いて, 結合実験と同様の方法で反応液に濃度の異なるリガンドを加えて行った. 競合させるリガンドには dihydrotestosterone (SIGMA), testosterone (SIGMA),  $\beta$ -estradiol (SIGMA), progesterone (SIGMA), cortisol (SIGMA), dexamethasone (SIGMA), hydroxyflutamide (日本化薬より供与) を使用した (Fig. 1B). 競合曲線から EC50 を測定し, 数式

$$K_i = EC_{50} / (1 + [radioligand] / K_d)$$

により  $K_i$  値を計算した. 実験は 3 回施行し, データ統計処理には解析ソフト Prism 3 for Macintosh ver. 3.0a (GraphPad Software, Inc.) を使用した.

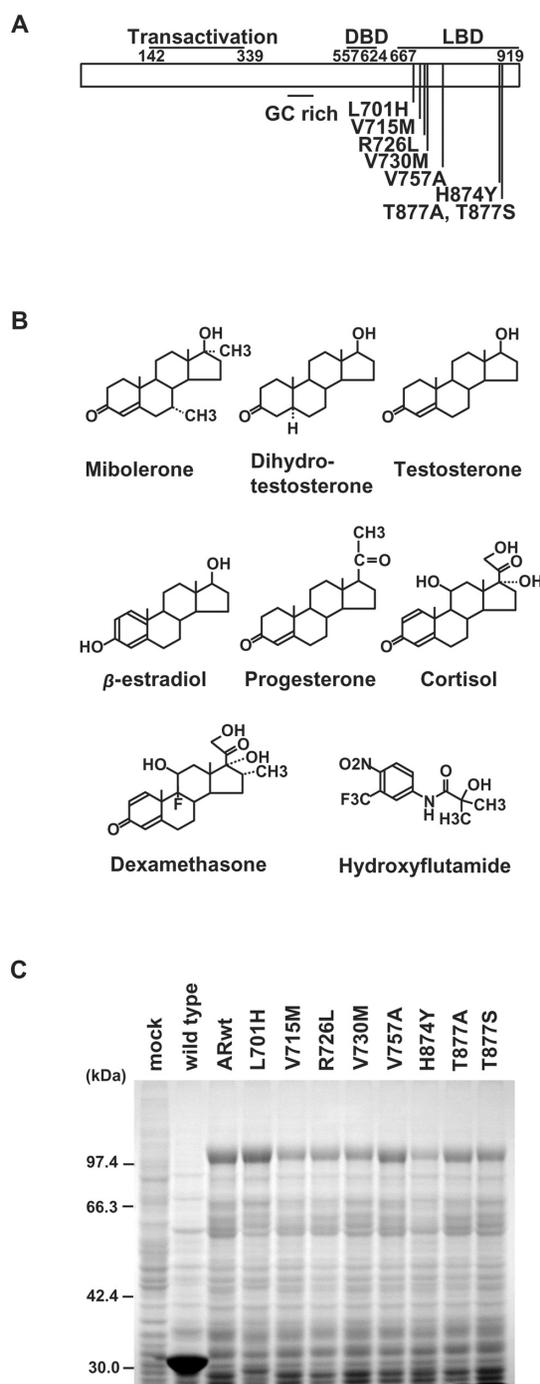
### AR リガンド結合部位の立体構造の解析

NCBI Structure のホームページ (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>) から AR のリガンド結合部位の立体構造をダウンロードし, 今回作製した変異体の変異の位置と結合ポケットとの関係を図示した (Fig. 3A). 立体構造は Sackら<sup>14)</sup> の報告の DHT とリガンド結合部位との結合したモデルを用いた. 解析ソフトは Cn3D 4.0 を同ホームページからダウンロードして使用した. 構造は結合ポケットがわかるように 12 $\alpha$ -ヘリックスを取り除き, 今回作製した変異体の変異部位を明示した (Fig. 3B).

## 結 果

### 1 変異体 AR の作製と発現

8 種類の AR 変異体をバキュロウイルスのタンパク質発現系を用いて HF 細胞で過剰発現させ SDS-PAGE 後, CBB 染色を行ってその発現を確認した (Fig. 1C) (mock は非感染の HF 細胞, wild type は AR を含まない本来のバキュロウイルスを感染させ



**Fig. 1.** A. Location of AR mutants, The AR contains structural three major domains: N-terminal domain involved in transcriptional regulation, DNA-binding domain, and C-terminal ligand-binding domain. The all AR mutations examined in this study were located in the ligand-binding domain as indicated. B. Ligands used in the binding assay. C. Expression of AR mutants in insect cell, AR was overexpressed in insect cell by using baculovirus expression system. High Five cells infected the recombinant AR viruses were cultured at 27 °C for 48 hours.

たもの), 野生型 AR のバキュロウィルスを感染させた HF 細胞において, 100 kDa の大きさに過剰発現した AR のバンドを認めた. また, すべての変異体で野生型と同様の AR の過剰発現を認めた. このため結合実験はクルードの細胞抽出液を用いて, HF 細胞の内因性タンパク質の影響を受けることなく実施できた.

## 2 変異体 AR とリガンドとの結合

### 結合実験及び競合実験

以下に示すように結合実験と競合実験を行うことでラジオアイソトープでラベルされていないリガンドに対しても解離定数を決定することができた. まず, [<sup>3</sup>H] Mibolerone を用いて結合実験を行い (Fig. 2A), Mibolerone との解離定数 (Kd 値) を求めた (Table 2). 作製した 8 種類の変異体すべてが [<sup>3</sup>H] Mibolerone と結合することを確認した. 対照実験は HF 細胞に  $\beta$ -galactosidase を過剰発現させた細胞抽出液を用いて行った. フィルターで回収された [<sup>3</sup>H] は AR の細胞抽出液を用いた実験の 1/100 以下だった.

次に dihydrotestosterone, testosterone,  $\beta$ -estradiol, progesterone, cortisol, dexamethasone, hydroxyflutamide の合計 7 種類のリガンドを [<sup>3</sup>H] Mibolerone に競合させ (Fig. 2B), 競合曲線で得られた EC50 からそれぞれの解離定数 (Ki 値) を計算した (Table 2). また解離定数の 95% の信頼区間の値をカッコ内に示し, 値が野生型 AR と比較して有意に低いものを強い結合, 高いものを弱い結合とした.

1 アミノ酸の変異にもかかわらず, 作製した 8 種類中 L701H, V715M, V757A, H874Y, T877A, T877S の 6 種類の変異体でリガンドとの結合に有意な変化がみられた. L701H は cortisol, dexamethasone と, V715M は  $\beta$ -estradiol, progesterone, cortisol と, H874Y は progesterone, cortisol, dexamethasone, hydroxyflutamide, T877A, T877S は  $\beta$ -estradiol, progesterone, cortisol, dexamethasone, hydroxyflutamide と強い結合を認め特異性が失われていた.

また, DHT との結合は野生型 AR (Ki=10.0 nM) と比較して L701H では減弱 (Ki=47.0 nM) していた. V715M は全体的に結合が強くなった. V757A は全体的に結合が弱くなった. R726L と V730M はすべてのリガンドに対して野生型 AR とほぼ同様の結合を示し特異性の変化はみられなかった. このようにリガンド結合部位の 1 アミノ酸の変異により特異性の失われるもの, 全体的に結合の強くなるもの, 弱くなるもの, ほとんど変化しないものと多様な変化がみられた.

### 抗アンドロゲン薬 hydroxyflutamide との結合

アンドロゲンと競合することで働くとされる抗アンドロゲン薬の hydroxyflutamide は野生型 (Ki=342 nM) と比較して H874Y (Ki=58 nM), T877A (Ki=14

nM), T877S ( $K_i=29$  nM) と強く結合した。

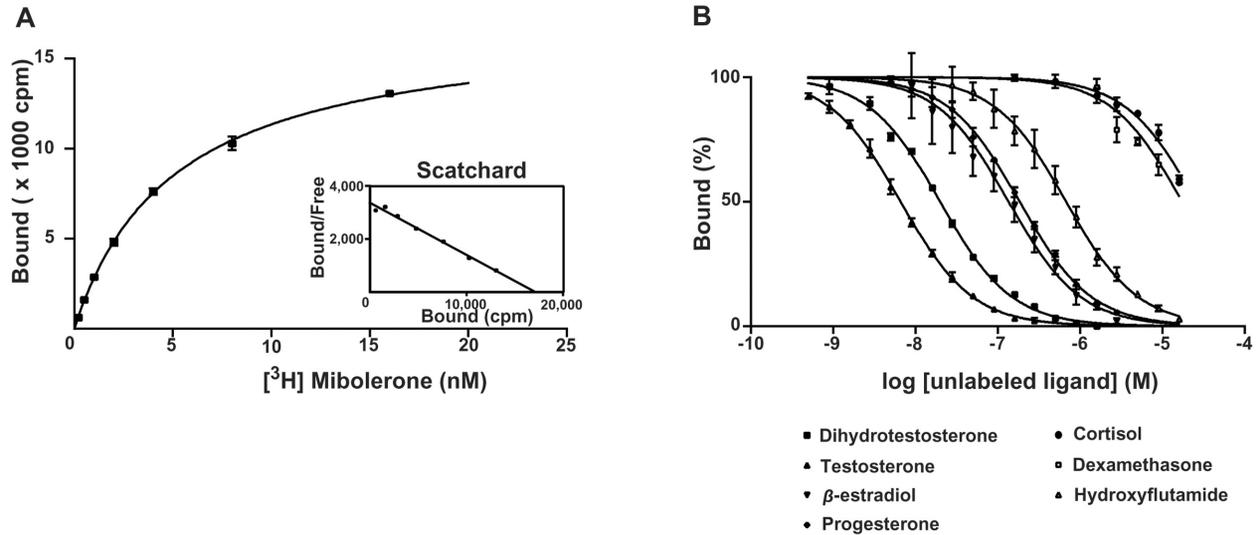
また, L701H は結合が減弱 ( $K_i=4,440$  nM) していた。

## 考 察

### リガンドに対する特異性

前立腺癌はアンドロゲン依存性の腫瘍であり, 内分

泌療法では主としてアンドロゲンの作用を阻害することによって抗腫瘍効果を得ている. 前立腺癌が治療抵抗性となる機序として, AR を介した増殖の経路が他の刺激により活性化されている可能性と AR を介さない経路により腫瘍が増殖している可能性が考えられる. 進行性の前立腺癌でみられる発現量の増加や変



**Fig. 2.** A. Saturation binding experiments of ARwt, Saturating binding assay was performed using 0.2 - 16 nM  $[^3\text{H}]$  Mibolerone. All AR mutants bound to  $[^3\text{H}]$  Mibolerone and the dissociation constants were calculated by using Graphpad Prism 3. B. Competitive binding experiments of ARwt, Competitive binding assay was carried out using 5 nM  $[^3\text{H}]$  Mibolerone and increasing concentration of unlabeled ligands. EC50 were worked out from the competitive binding curve.

**Table 2.** The dissociation constants (Kd) of AR mutants to the ligands

AR	$[^3\text{H}]$ Mibolerone	DHT	Testosterone	$\beta$ -estradiol	Progensterone	Cortisol	Dexa-methasone	Hydroxy-flutamide
ARwt	5.1 (4.5 - 5.6)	10.0 (9.0 - 11.2)	3.3 (2.9 - 3.8)	68 (38 - 123)	93 (79 - 110)	13110 (10816 - 15900)	8831 (6365 - 12250)	342 (245 - 478)
L701H	6.6 (5.5 - 7.6)	47.0** (44.1 - 50.2)	5.5 (2.6 - 11.6)	115 (87 - 152)	139** (119 - 163)	30* (28 - 33)	951* (775 - 1168)	4440** (3539 - 5571)
V715M	4.5 (3.4 - 5.5)	3.6* (3.4 - 3.9)	2.6 (1.4 - 4.8)	22* (18 - 27)	27* (23 - 32)	4946* (4335 - 5642)	6693 (4895 - 9151)	152* (137 - 169)
R726L	5.3 (4.0 - 6.6)	9.8 (8.2 - 11.8)	3.2 (2.9 - 3.6)	136 (98 - 188)	115 (89 - 147)	14100 (12200 - 16290)	14500 (11680 - 17990)	459 (399 - 527)
V730M	5.2 (4.2 - 6.2)	8.0* (7.4 - 8.7)	3.6 (3.0 - 4.3)	112 (94 - 133)	86 (76 - 97)	13340 (11370 - 15640)	11390 (8335 - 15560)	552** (482 - 631)
V757A	7.9** (7.0 - 8.8)	16.1** (14.0 - 18.6)	6.3** (5.5 - 7.1)	174** (139 - 219)	184** (130 - 259)	16640 (13160 - 21040)	29450** (20450 - 42410)	749** (667 - 841)
H874Y	20.0** (15.2 - 24.8)	22.1** (18.5 - 26.4)	15.5** (13.1 - 18.4)	81 (40 - 164)	33* (24 - 45)	2648* (2136 - 3282)	4258* (3359 - 5397)	58* (48 - 71)
T877A	3.2* (2.8 - 3.6)	6.1* (5.6 - 6.6)	2.6 (1.9 - 3.4)	22* (17 - 29)	6* (4.9 - 6.8)	926* (824 - 1041)	754* (593 - 960)	14* (13.1 - 15.5)
T877S	2.3* (2.0 - 2.6)	3.4* (3.0 - 3.7)	1.7* (1.6 - 1.9)	18* (13 - 26)	7* (5.7 - 7.9)	1911* (1480 - 2468)	928* (749 - 1150)	29* (23.2 - 35.8)

\* indicates significantly lower Kd or Ki than that of ARwt

\*\* indicates significantly higher Kd or Ki than that of ARwt

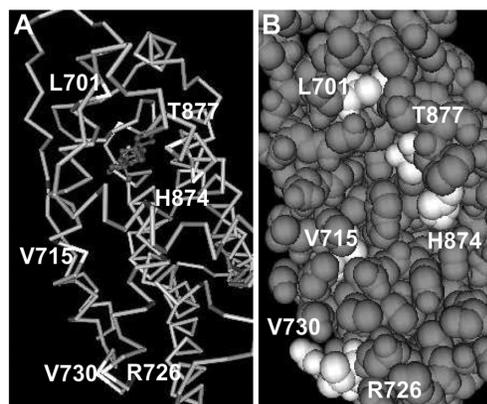
異体の出現といったARの異常が前者の可能性を示唆している。変異体のいくつかはアンドロゲン以外のリガンドの刺激に対して反応することが知られているが、変異の部位によるリガンドとの結合の変化を定量化して比較した報告はない。今回の結果で、リガンド結合部位では1アミノ酸の変異によってリガンドとの結合に多様な変化が生じることがわかる。このことからリガンド結合部位の中で結合に強く影響を与えるアミノ酸(ホットスポット)が存在し、リガンドに対する特異性を決定していると推測される。ARではリガンドとの結合ポケット(Fig. 3)は主として3, 5, 11  $\alpha$ -ヘリックスで形成されている<sup>14)</sup>。今回作製した8種類の変異体ARのうち5種類(Table 1)がこれらの $\alpha$ -ヘリックスにおける変異体であり(L701H, V715Mが3  $\alpha$ -ヘリックス, H874Y, T877A, T877Sが11  $\alpha$ -ヘリックス)、かつ、これらはリガンドとの結合の特異性を失っていた。逆にこれ以外の部位の変異では結合に大きな変化はみられない。以上から3, 11  $\alpha$ -ヘリックスにホットスポットが存在すると推測できる。このような特異性を失った変異体ARが種々のリガンドと結合することで腫瘍増殖に働く可能性があり、このことが内分泌治療抵抗性の原因の一つであると考えられる。

また、今回作成した変異体がそうであるように、ARの変異は早期の前立腺癌よりも進行癌で多く認められる<sup>15)</sup>ことから、変異体が内分泌治療により選択を受けて優勢となっていると考えられる。

### 抗アンドロゲン薬と変異体ARの結合

Hydroxyflutamideはアンドロゲンと競合することによりアンドロゲンの作用を阻害し抗腫瘍効果を導いている。antiandrogen withdrawal syndromeでは、H874Y, T877A, T877Sなどの変異体ARがその要因として考えられている。今回の結果でこれらの変異体ARでは野生型と比較してhydroxyflutamideとの結合が有意に強くなっていた。この結果は抗アンドロゲン薬と結合した状態でのARの構造が野生型と変異体とで同一である場合と異なる場合の二通りに分けて考えられる。すなわち、構造が同一であり共に弱い活性を持つ場合と、構造が異なり変異体では強い活性が得られる場合とである。構造が同一の場合、抗アンドロゲン薬の血液中の濃度が同じであっても、解離定数の低い変異体では弱いながらも活性を持つARの割合が高くなり腫瘍の増殖に働くと考えられる。後者では変異体の強い活性により腫瘍の増殖が促進され得ると説明できる。この点に関しては、今後、抗アンドロゲン薬と結合したARの構造解析を行うことで明らかになると考えられる。

なお、L701Hではhydroxyflutamideとの結合は野生型と比較して有意に弱い。このことからL701Hで



**Fig. 3.** The 3D structural model of AR ligand binding domain that bound to DHT A. The locations of all mutant ARs used in this study were indicated. B. The 12  $\alpha$ -helix of AR ligand binding domain was deleted in order to see the ligand binding pocket in which L701, H874 and T877 were located.

は同薬剤で十分な治療効果を得ることは困難であると考えられる。

### 結合力と活性

リガンドとの結合力とその活性は相関する傾向がある。結合の特異性が失われている変異体AR(L701H, H874Y, T877A, T877S)をみると、強い結合を認めた $\beta$ -estradiol, progesterone, cortisol, hydroxyflutamideなどでは活性の増強が報告されている<sup>7, 9, 10)</sup>。結合実験の結果からすべての変異体ARがアンドロゲンに結合すること、L701H<sup>16)</sup>やT877A<sup>14)</sup>のリガンド結合ポケットは変異部位以外は野生型とほぼ同一の3次元構造であることから、どの変異体ARも野生型と同様にポケット構造を形成していると考えられる。一方、レセプターとリガンドとの結合は、水素結合、イオン結合、疎水結合、ファンデルワールス力の4つの分子レベルの結合の総和と考えることができる。これらの分子レベルの結合の中に構造変化、機能変化を引き起こし活性を左右する結合が存在すると推測される。レセプターとリガンドとが強く結合している場合は、活性を左右する分子レベルの結合が含まれている可能性が高いため、リガンドとの結合力と活性の相関傾向が生じると考えられる。

### 結論

前立腺癌で報告されているリガンド結合部位の変異体を8種類作製し、リガンドに対する解離定数を決定した。リガンド結合部位の一アミノ酸の変異によりリガンド結合の特異性に多様な変化を生じた。特異性を失った変異体ARは種々のリガンドの刺激により腫瘍の増殖に影響していると考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、直接御指導、御教示頂きました埼玉医科大学分子生物学教室久武幸司助教授に深謝致します。また貴重な御助言を頂きました同教室禾泰壽教授、泌尿器科学教室出口修宏教授に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Kelly WK, Scher HI. Prostate specific antigen decline after antiandrogen withdrawal: the flutamide withdrawal syndrome. *J Urol* 1993;149:607-9.
- 2) Small EJ, Srinivas S. The antiandrogen withdrawal syndrome. Experience in a large cohort of unselected patients with advanced prostate cancer. *Cancer* 1995;76:1428-34.
- 3) Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinänen R, Palmberg C, et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 1995;9:401-6.
- 4) Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, et al. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res* 1997;57:314-9.
- 5) Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Cato AC, Hittmair A, Radmayr C, et al. Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol Endocrinol* 1993;7:1541-50.
- 6) Gaddipati JP, McLeod DG, Heidenberg HB, Sesterhenn IA, Finger MJ, Moul JW, et al. Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. *Cancer Res* 1994;54:2861-4.
- 7) Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, et al. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* 1995;332:1393-8.
- 8) Buchanan G, Greenberg NM, Scher HI, Harris JM, Marshall VR, Tilley WD. Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:1273-81.
- 9) Zhao XY, Boyle B, Krishnan AV, Navone NM, Peehl DM, Feldman D. Two mutations identified in the androgen receptor of the new human prostate cancer cell line MDA PCa 2a. *J Urol* 1999;162:2192-9.
- 10) Krishnan AV, Zhao XY, Swami S, Brive L, Peehl DM, Ely KR, et al. A glucocorticoid-responsive mutant androgen receptor exhibits unique ligand specificity: therapeutic implications for androgen-independent prostate cancer. *Endocrinology* 2002;143:1889-900.
- 11) Berrevoets CA, Veldscholte J, Mulder E. Effects of antiandrogens on transformation and transcription activation of wild-type and mutated (LNCaP) androgen receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;46:731-6.
- 12) Suzuki H, Akakura K, Komiya A, Aida S, Akimoto S, Shimazaki J. Codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancer: relation to antiandrogen withdrawal syndrome. *Prostate* 1996;29:153-8.
- 13) Suzuki H, Sato N, Watabe Y, Masai M, Seino S, Shimazaki J. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;46:759-65.
- 14) Sack JS, Kish KF, Wang C, Attar RM, Kiefer SE, An Y, et al. Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4904-9.
- 15) Marcelli M, Ittmann M, Mariani S, Sutherland R, Nigam R, Murthy L, et al. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 2000;60:944-9.
- 16) Matias PM, Carrondo MA, Coelho R, Thomaz M, Zhao XY, Wegg A, et al. Structural basis for the glucocorticoid response in a mutant human androgen receptor (AR(ccr)) derived from an androgen-independent prostate cancer. *J Med Chem* 2002;45:1439-46.