

氏名・(本籍)	田中 努 (大阪府)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士第344号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成12年3月27日
学位論文題目	A Novel Form of Prostate-specific Antigen Transcript Produced by Alternative Splicing

(選択的スプライシングによる前立腺特異抗原転写産物の新しい分子種)

審査委員 主査 教授 大久保 岩 男
副査 教授 小笠原 一 誠
副査 教授 岡 田 裕 作

論文内容の要旨

【目的】

前立腺特異抗原 (prostate-specific antigen: PSA) は前立腺癌の診断、病期診断、治療後の経過観察に極めて有用であることが認められている。しかし PSA は腫瘍特異的なマーカーではないために前立腺肥大症 (BPH) でも異常値を示す例があり、PSA 単独での前立腺癌スクリーニングは困難とされている。近年、PSA は血清中において主に protease inhibitor と結合した結合型 PSA (complex PSA) を形成するとともに一部は非結合型 PSA (free PSA) として存在しており、この complex PSA の比率が BPH より前立腺癌で高いことが明らかになってきた。PSA の生化学的、生理学的研究は必ずしも十分にされておらず、このような free および complex PSA の比率が異なる機序は不明である。本研究では、癌と BPH での PSA の分子形態の差を分子生物学と蛋白質解析の手法を用いて検討した。

【方法】

1) RT-PCR 法とダイレクトシーケンス法による PSA mRNA の解析

BPH組織と転移を有する前立腺癌患者の末梢血よりそれぞれ RNA を抽出した後、PSA に特異的なプライマーを作製し、PSA の全 cDNA 配列を決定した。これにより癌由来と BPH 由来のそれぞれの PSA のついて遺伝子変化の有無を検討した。

2) 選択的スプライシングによる新しい PSA mRNA の発現の解析

選択的スプライシングにより生じる新しい PSA に特異的なプライマーを作製し、非癌前立腺組織、前立腺癌組織、転移を有する前立腺癌患者の末梢血における選択的スプライシング PSA mRNA の発現を Nested RT-PCR 法で調べた。この末梢血は前立腺非癌組織の混入がないサンプルとして用いた。

3) PSA タンパク質発現の分析

抗 PSA ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、前立腺組織における選択的スプライシングにより生じる新しい PSA の蛋白質発現について解析した。

【結果】

RT-PCR 法とダイレクトシーケンス法による解析により、選択的スプライシングによる前立腺特異抗原転写産物の新しい形態を発見した。この選択的スプライシングにより45番目のアミノ酸から88番目のアミノ酸が欠失し、その結果糖鎖の結合部位である45番目のアスパラギン酸が欠失していた。

選択的スプライシングにより生じた新しい PSA に特異的なプライマーを用いた Nested RT-PCR では、非癌前立腺組織18例中13例 (72.2%)、前立腺癌組織5例中4例 (80.0%)、転移を有する前立腺癌患者の末梢血12例中3例 (25.0%) に発現が認められた。非癌前立腺組織のグループと転移を有する前立腺癌患者の末梢血のグループとの間で発現率に統計学的有意差を認めた ($p=0.01$)。

選択的スプライシングにより生じる新しい PSA は計算上21071.19ダルトンの分子量であり、Western blotting によっても約 21kDa のバンドを確認することができた。

【考 察】

本研究により、申請者は PSA の新しい分子種を発見した。この分子形態は選択的スプライシングにより45番目のアミノ酸から88番目のアミノ酸が欠失したものである。イントロンの右端の5'末端における配列は GT、3'末端における配列は AG であり、エクソン/イントロン/エクソンの両境界付近には共通配列が存在し正確な位置でスプライシングされるという GT-AG の法則に合致する。また、PSA はその構造中に N 結合型糖鎖 1 本のみを有する糖蛋白質であるが、この選択的スプライシングにより糖鎖が結合している部位である45番目のアスパラギン酸が欠失することがわかった。

PSA の新しい分子種に特異的なプライマーを用いた Nested RT-PCR では、非癌前立腺組織のグループと転移を有する前立腺癌患者の末梢血のグループとの間で発現率に統計学的有意差を認めた ($p=0.011$)。本研究では非癌前立腺組織の PSA 遺伝子が混入する可能性をできるだけ少なくするために、前立腺癌のサンプルとして転移を有する前立腺癌患者の末梢血を用いた。前立腺癌組織では5例中4例に発現を認めたが、前立腺癌組織には癌細胞と非癌細胞とが混在していることが稀でないため、これが高い発現率となった原因かもしれないと推測している。

選択的スプライシングにより生じる新しい PSA は、糖鎖も付かないことより計算上約 21kDa の分子量となるが、Western blotting による解析では 21kDa 付近にバンドを認め、この遺伝子からの蛋白質が実在する可能性が示唆された。

【結 論】

RT-PCR 法とダイレクトシーケンス法による解析により、今まで報告されていなかった選択的スプライシングによる前立腺特異抗原転写産物の新しい分子種を発見した。この選択的スプライシングは前立腺癌より前立腺肥大症に生じることが多い可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、前立腺癌細胞ならびに非癌前立腺細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法、nested PCR 法、およびダイレクトシーケンス法を用いて prostate-specific antigen (PSA) の全コード領域の塩基配列を同定し、前立腺癌細胞由来の PSA と非癌細胞由来の PSA において推定される一次構造の違いについて検討したものである。その結果、1) 今まで知られていなかった PSA の分子種を発見し、それが選択的スプライシングによって生じることを示した。2) このスプライシングされた PSA 分子からは、唯一の糖鎖結合部位を含む44アミノ酸残基が欠失していると推測された。3) この分子種の発現比率は、前立腺癌細胞より非癌細胞で有意に高かった。4) ウェスタンブロッティング法でこのタンパク質と思われるバンドを確認した。以上の研究は、PSA の多様性について新しい重要な知見を与えたものであり、博士(医学)の学位論文に値するものである。

なお、本学位授与申請者は平成12年2月18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。