

令和元年6月18日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10601

研究課題名(和文)酸化ストレス防御因子を標的とする抵抗性前立腺癌治療薬の開発

研究課題名(英文)Oxidative stress-related factor as a novel target for drug-resistant prostate cancer

研究代表者

井口 和弘 (Iguchi, Kazuhiro)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10295545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌の薬物療法に対する治療抵抗性を獲得する機序を明らかにすることを目的とした。本研究では、酸化ストレスに関係する因子に着目して抵抗性獲得機序の解明を試み、アルデヒド解毒酵素(aldo-keto reductase (AKR)1C3)が関与していることを見出した。すなわち、AKR1C3が前立腺癌細胞(LNCaP細胞、22Rv1細胞)の抗アンドロゲン剤抵抗性の獲得に伴い発現上昇し、その発現量が抗アンドロゲン剤の効果に関与することを示した。またAKR1C3阻害剤が、前立腺癌細胞の抗アンドロゲン剤に対する抵抗性を克服することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各種前立腺癌細胞株を用いた薬剤抵抗性獲得モデルにおいて、酸化ストレス防御因子であるアルデヒド還元酵素の一つが関与していることを突き止めた。本研究結果は、治療抵抗性を獲得した前立腺癌に対してアルデヒド還元酵素が標的となり得ることを示しており、新たな治療戦略として期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：To find factors associated with drug-resistant prostate cancer, we here focused on oxidative stress and showed that aldo-keto reductase (AKR)1C3 is a potential target. Namely, AKR1C3 expression was increased in the cells resistant to anti-androgens, and the extent of growth inhibition by antiandrogens was associated with its expression level. Furthermore, AKR1C3 inhibitors increased the growth inhibition by antiandrogens in the drug-resistant prostate cancer cells.

研究分野：泌尿器科学、薬局薬学

キーワード：前立腺癌 治療抵抗性 アルデヒド還元酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌における薬剤抵抗性は、主としてホルモン療法による低アンドロゲン環境下でのアンドロゲン受容体の異常な活性化に起因する。その機序として、恒常的に活性化されたスプライシングバリエーションの出現やアンドロゲン受容体以外の増殖シグナルの活性化などが明らかにされ、去勢抵抗性前立腺癌に対するこれらの因子に着目した新たな治療法の開発が進められている。また、酸化ストレスを抑制する因子の前立腺癌の去勢抵抗性への関与が示され、それを標的とした治療の有効性が示唆されている。多くの場合、抗癌剤による化学療法や放射線療法を用いた癌治療は酸化ストレスを惹起し、癌を細胞死に導く。しかし、持続的な酸化ストレスの誘導は、細胞内の酸化ストレス防御因子の恒常的な活性化を招き、これにより癌細胞死が回避されて薬剤抵抗性に繋がると考えられている。また、抗アンドロゲン剤の連続投与による前立腺癌の去勢抵抗性の誘導にも持続的な酸化ストレスが関与することが示されている。これらの知見より、酸化ストレス防御能の亢進は、癌細胞が化学療法に打ち勝ち、薬剤抵抗性を獲得するための生存戦略であると予測される。すなわち、薬剤抵抗性を獲得してしまった前立腺癌に対し、恒常的に活性化している酸化ストレス防御因子を抑制することは治療標的の一つである。

2. 研究の目的

前立腺癌の薬剤抵抗性につながる酸化ストレス防御因子を明らかにし、その抵抗性克服標的因子としての可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

各細胞は 37℃, 5% CO₂ 条件下の炭酸ガスインキュベーター内で培養し、3 日毎に培地を交換して 7 日毎に継代維持した。増殖培地として、10% FBS, 100 U/mL ペニシリンおよび 100 μg/mL ストレプトマイシンを含む RPMI1640 を用いた。接着細胞の剥離には 0.25% トリプシンおよび 0.02% EDTA を含む DPBS (pH7.4) を用いた。

(2) 抗アンドロゲン剤長期処理による耐性株の作製

各細胞をフルタミド、ピカルタミドもしくはエンザルタミド含有 RPMI1640 にて、維持することにより耐性細胞株を樹立した。培地中に添加したフルタミド、ピカルタミドもしくはエンザルタミド濃度は 3 継代ごとに段階的に増加させ、耐性細胞を作製した。

(3) 細胞生存率の測定

細胞生存率は WST-1 アッセイにより評価した。増殖培地に懸濁した細胞を 96 穴プレート中に 2×10^4 cells/200 μL ずつ播種し、CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。抗生物質のみを含む血清不含培地に交換して 2 時間培養後、培地中に試料を添加してさらに 24 時間培養した。対照群として、培地のみ (blank) と DMSO を添加した細胞 (100% control) を調製した。次に、5 mM WST-1 および 0.2 mM 1-Methoxy PMS を含む 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 溶液 10 μL を添加して 37℃, 3 時間培養した後、マイクロプレートリーダー Model680 (Bio Rad) を用い、測定波長 415 nm および対照波長 655 nm の吸光度を測定した。細胞生存率 (%) を以下の式により算出した。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = (S-A)/(B-A) \times 100$$

S : 試料および細胞を添加した well の吸光度

A : 培地のみを添加した well の吸光度 (blank)

B : DMSO および細胞を添加した well の吸光度 (100% control)

(4) ウェスタンブロット

調製したサンプルを sample buffer で還元、加熱処理し、Laemmli の方法に従って SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE 後のゲル上タンパク質を PVDF 膜へ転写する方法は、Towbin らの方法を用いた。検出は ECL enhanced chemiluminescence detection kit による化学発光法にて行った。タンパク質バンドのデントメトリー分析には、Fuji-Film Multi Gauge ソフトウェアを使用した。

(5) RT-PCR

全 RNA は TRIzol 試薬を用いて抽出した。すなわち、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix kit を用いて、37℃, 60 分間インキュベートすることにより、全 RNA から一本鎖 cDNA を調製した。調製した cDNA を鋳型とし、特異的プライマーを用いて DNA Engine Dyad Cycler (Bio-Rad) にて PCR を行った。増幅した PCR 産物を 1%または 1.5%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV 照射下にて検出した。

(6) ヒドロキシノネナル (HNE) 還元活性の測定

HNE 還元活性は、以下の反応系における補酵素 NADPH の減少速度を分光光学的 (340 nm) に測定することにより算出した。反応系は、0.1 M リン酸カリウム (pH 7.4), 0.1 mM NADPH, 10 μM HNE および細胞抽出液を含む全量 2 mL とした。また、酵素活性 1 unit は 25℃において 1 分間に 1 μmol の NADPH を酸化する酵素量とし、モル吸光度係数 ($\epsilon = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を用いて算出した。なお、AKR1C3 の HNE 還元活性は、40 μM トルフェナム酸を添加した反応系における活性の差より算出した。

(7) ドットブロット法

細胞内の HNE 結合タンパク質量は、Dot blotter (サンブラテック) を用いたドットブロットにより評価した。調製した試料 100 μg を PVDF 膜に固定して 0.5%BSA を含む TBS 中でブロッキング処理後、膜を一次抗体 (抗 HNE ポリクローナル抗体) および二次抗体を含む TBST と順次反応させた。検出は ECL enhanced chemiluminescence detection kit による化学発光法にて行った。

4. 研究成果

(1) 薬剤耐性前立腺癌細胞株の樹立および各種酸化ストレス防御因子の発現変動

アンドロゲン受容体陽性前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞および 22Rv1 を用いて、各種抗アンドロゲン剤 (フルタミド、ピカルタミド、エンザルタミド) に対して耐性を示す細胞株を得た。これらの細胞株について、アンドロゲン受容体および酸化ストレス防御因子の遺伝子発現量を RT-PCR 法により測定した。その結果、各抗アンドロゲン剤耐性株はそれぞれの親株に比べ、アンドロゲン受容体の発現量の上昇が認められた。さらに、耐性株において、アルデヒド解毒酵素 (aldo-keto reductase (AKR)1C サブファミリー酵素 AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3)、ヘムオキシゲナーゼ (HO1)、NAD(P)H キノン還元酵素 (NQO1) が発現変動を来していることを観察した。また、ウェスタンブロット法により、酸化ストレス防御因子の発現制御に関わる転写因子 Nrf2 が核に移行していることが確認され、Nrf2 が恒常的に活性化していることが示唆された。すなわち、抗アンドロゲン剤耐性獲得により Nrf2 の恒常的活性化が引き起こされ、各種酸化ストレス防御因子の発現上昇に至ったことが推察された。

発現変動が観察された酸化ストレス防御因子の中で、アルデヒド解毒酵素の一つである AKR1C3 のみが、各耐性前立腺癌細胞株で共通して発現上昇していた。また、AKR1C1, AKR1C2 および AKR1C3 の阻害剤である 3-bromo-5-phenyl-salicylic acid、ウルソデオキシコール酸およびトルフェナム酸の存在下で、22Rv1 細胞における各抗アンドロゲン剤に対する感受性を調べたところ、AKR1C1 と AKR1C3 の阻害剤添加時は感受性亢進が観察された。これに対し、AKR1C2 阻害剤はその感受性に影響を及ぼさなかった。AKR1C3 は細胞内の抗酸化酵素としての役割だけでなく、アンドロゲン合成経路に関与していることから、本酵素の抗アンドロゲン薬耐性化に伴う発現上昇は大きな意義を持つと推測される。そのため、以降の検討では、AKR1C3 に着目して行った。

次に、各種耐性細胞株における抗酸化能をそれぞれの親株と比較したところ、反応性アルデヒドの還元活性 (抗酸化活性) (HNE 還元活性および HNE 結合タンパク質量で評価) が耐性細胞において亢進していることを見出し、さらに、反応性アルデヒド暴露によって誘導される各耐性細胞の細胞障害が増強されることを示した。この結果は、各種耐性前立腺癌細胞株において、AKR1C3 が反応性アルデヒドを介した細胞障害に関与し、その耐性化において重要な意義を持つことを示している。

(2) 抗アンドロゲン剤による細胞増殖効果に対する AKR1C3 過剰発現もしくは発現抑制の影響

前立腺癌細胞株 (LNCaP 細胞および PC-3 細胞) に AKR1C3 を一過性に過剰発現させた場合、抗アンドロゲン剤による細胞増殖抑制効果は減弱傾向を示すことを明らかにした。すなわち、AKR1C3 を過剰発現させた細胞では、ベクターのみを導入した対照細胞と比較して、感受性が有意に低下した。さらに、22Rv1 細胞についても同様に AKR1C3 を過剰発現させた場合、各種抗アンドロゲン剤 (フルタミド、ピカルタミド、エンザルタミド) による細胞増殖抑制を顕著に減弱させることを示した。また、これらの細胞株において、AKR1C3 siRNA を用いて発現抑制させた場合、抗アンドロゲン剤の細胞増殖抑制効果の増強が観察された。すなわち、酸化ストレス防御因子の一つである AKR1C3 の発現量の多寡は、前立腺癌細胞株の抗アンドロゲン剤による細胞増殖抑制作用に影響することが示唆された。

(3) 抗アンドロゲン剤による細胞増殖効果に対する AKR1C3 阻害剤の影響

各種抗アンドロゲン剤耐性 22Rv1 細胞における様々な薬剤に対する感受性、および AKR1C3 阻害剤の効果について検討した。

フルタミドに対し抵抗性を示す 22Rv1 細胞において、ピカルタミドやエンザルタミド、ドセタキセルをそれぞれ作用させた場合、抵抗性を示さない 22Rv1 細胞での増殖抑制効果に比べて効果減弱が観察された。また、フルタミド抵抗性をもつ 22Rv1 細胞の各種薬剤の増殖抑制効果は、AKR1C3 阻害剤 (トルフェナム酸、バッカリン誘導体) 存在下において、非存在下に比べ有意な作用増強が観察された。すなわち、フルタミドに対して抵抗性を獲得した細胞は、他の薬剤においても一定の感受性低下を引き起こすが、この感受性の低下は AKR1C3 阻害剤により一部克服できると考えられた。同様の効果は、ピカルタミドもしくはエンザルタミドによる増殖抑制に対し抵抗性を示す 22Rv 細胞においても認められ、AKR1C3 阻害剤は抗アンドロゲン剤に抵抗性を示す前立腺癌細胞に対し、様々な抗がん剤の感受性の増強を期待できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Matsunaga T, Suzuki A, Kezuka C, Okumura N, Iguchi K, Inoue I, Soda M, Endo S, El-Kabbani O, Hara A, Ikari A. Aldo-keto reductase 1B10 promotes development of cisplatin resistance in gastrointestinal cancer cells through down-regulating peroxisome proliferator-activated receptor- α -dependent mechanism. Chem. Biol. Interact, 査読有, 25, 2016, 142-153, DOI: 10.1016/j.cbi.2016.07.008.

Matsunaga T, Saito H, Endo S, Iguchi K, Soda M, El-Kabbani O, Hara A, Ikari A. Roles of aldo-keto reductases 1B10 and 1C3 and ATP-binding cassette transporter in docetaxel tolerance. Free Radic. Res. 査読有, 50, 2016, 1296-1308, DOI: 10.1080/10715762.2016.1236373.

[学会発表](計9件)

松永俊之, 奥村奈央子, 井口和弘, 遠藤智史, 五十里彰. 大腸がん細胞のイリノテカン耐性化におけるアルドケト還元酵素 1C3 と ABC トランスポーターB1 の意義, 第 91 回日本生化学会大会, 2018 年 9 月 24 日~9 月 26 日, 京都.

大久保沙知, 奥村奈央子, 山地由希子, 堺千紘, 横山聡, 伊野陽子, 井口和弘, 五十里彰, 松永俊之. 前立腺癌細胞株における抗アンドロゲン剤の細胞増殖抑制作用への抗酸化酵素の関与, 第 63 回日本薬学会東海支部大会, 2017 年 7 月 8 日, 岐阜.

堀之内美智, 松永俊之, 斎藤晴陽, 井口和弘, 遠藤智史, 五十里彰. 乳癌細胞のバクリタキセル耐性化におけるアルドケト還元酵素 1C3 と ABC トランスポーターB1 の意義, ConBio2017 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会), 2017 年 12 月 6 日~12 月 9 日, 神戸.

大久保沙知, 井口和弘, 松永俊之, 加藤美咲, 五十里彰. 前立腺癌の去勢抵抗性獲得における抗酸化酵素の発現変動とその意義, 第 8 回育薬・創薬研究センター教育フォーラム, 2017 年 2 月 18 日, 岐阜.

斎藤晴陽, 松永俊之, 奥村奈央子, 鎌瀬今日子, 井口和弘, 遠藤智史, 五十里彰. ドセタキセル耐性癌細胞におけるアルドケト還元酵素と ABC トランスポーターの高発現の意義, 第 80 回日本生化学会中部支部例会, 2016 年 5 月 21 日, 三重.

柏木映理子, 松永俊之, 川端沙織, 井口和弘, 遠藤智史, 五十里彰. 消化器癌の 5-フルオロウラシル耐性化におけるアルドケト還元酵素の高発現, 第 80 回日本生化学会中部支部例会, 2016 年 5 月 21 日, 三重.

松永俊之, 奥村奈央子, 毛塚ちひろ, 鈴木綾香, 遠藤智史, 井口和弘, 五十里彰. 消化器癌細胞のシスプラチン耐性化に伴うアルドケト還元酵素 1B10 とペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 の発現変動. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 2015 年 12 月 1 日~12 月 4 日, 神戸.

山地由希子, 松永俊之, 加藤美咲, 森川嘉文, 井口和弘, 遠藤智史, 五十里彰. 肺癌細胞のシスプラチン耐性化機序の解明 - 酸化窒素とアルドケト還元酵素の関与 -, 第 61 回日本薬学会東海支部大会, 2015 年 7 月 4 日, 名古屋

加藤美咲, 松永俊之, 山地由希子, 井口和弘, 遠藤智史, 五十里彰. フルタミド耐性前立腺癌細胞におけるアルドケト還元酵素の発現上昇とその意義, 第 79 回日本生化学会中部支部例会, 2015 年 5 月 23 日, 松本.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 松永 俊之

ローマ字氏名:(MATSUNAGA, Toshiyuki)

所属研究機関名: 岐阜薬科大学

部局名: 生命薬学大講座・生化学研究室

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 80306274

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。