

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 11 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20108

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌に対するDNA修復機構を標的とした新規治療戦略

研究課題名(英文) A new treatment strategy targeting to DNA repair pathway of castration resistant prostate cancer

研究代表者

小林 裕章 (Kobayashi, Hiroaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：10598428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではドセタキセル抵抗性ヒト去勢抵抗性前立腺癌細胞株C4-2AT6を用いてDNA修復経路に関連するPARP阻害剤の有効性について検討した。PARP阻害剤とドセタキセルの併用はC4-2AT6に対し高いアポトーシス誘導効果を示した。また、C4-2AT6を用いて作成したマウス皮下腫瘍モデルにおいてもPARP阻害剤とドセタキセルとの併用は抗腫瘍効果を示した。これらの結果は、PARP阻害剤がドセタキセル抵抗性前立腺癌におけるドセタキセル抵抗性改善に寄与する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored the efficacy of a PARP inhibitor for docetaxel resistant prostate cancer cell line: C4-2AT6. C4-2AT6 cells revealed combined administration of PARP inhibitor and docetaxel had a significant and synergistically high apoptosis inducing effect. In a castrated mice xenograft model, combined PARP inhibitor and docetaxel also showed high anti-tumor effect. These results suggested that inhibition of DNA repair pathway was able to overcome docetaxel resistance in human docetaxel resistant prostate cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 ドセタキセル抵抗性 PARP阻害剤 DNA修復機構

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌有転移症例では主にアンドロゲン遮断療法 (Androgen Deprivation Therapy: ADT) が施行され、8 割の症例で奏効するものの次第にアンドロゲン非依存性増殖能を獲得し ADT 抵抗性を示す、去勢抵抗性前立腺癌 (Castration-resistant prostate cancer: CRPC) となる。現在 CRPC に対する有用性が証明されている抗癌剤は少なく、本邦における実臨床ではドセタキセル (DTX) を用いた化学療法が広く行われているがその効果は限定的であり、進行性前立腺癌に対する新規治療戦略の確立は急務である。

DNA は様々な要因により損傷を受け、損傷を受けた細胞は PARP-1 (Poly ADP-ribose polymerase) による塩基切断修復を介した DNA1 本鎖損傷修復経路 (SSB) と BRCA-1/2 (Breast cancer susceptibility gene) による相同組み換え (homologous recombination; HR) を介した DNA2 本鎖損傷修復経路 (DSB) の 2 種類の正確な DNA 修復機構によりゲノム恒常性を維持している。正常細胞で PARP-1 を阻害すると修復経路が HR や NHEJ 経路へ移行し DNA 修復は可能であるが、BRCA1/2 変異陽性細胞では HR 経路が進まず遺伝子不安定性を生じ、DNA 損傷が蓄積され家族性乳癌や卵巣癌、前立腺癌等を引き起こす。近年、BRCA1/2 機能不全の状態では PARP 機能を特異的に阻害することで合成致死 (Synthetic Lethal) となりアポトーシスが誘導されることが証明され、乳癌や卵巣癌の領域で PARP 阻害剤が新たな分子標的治療薬として注目されるようになった (Figure 1.)。前立腺癌も遺伝的に PARP 阻害剤に感受性を持つ可能性が示唆されているが、腫瘍細胞増殖を抑制する明確なメカニズムの解明には至っていない。

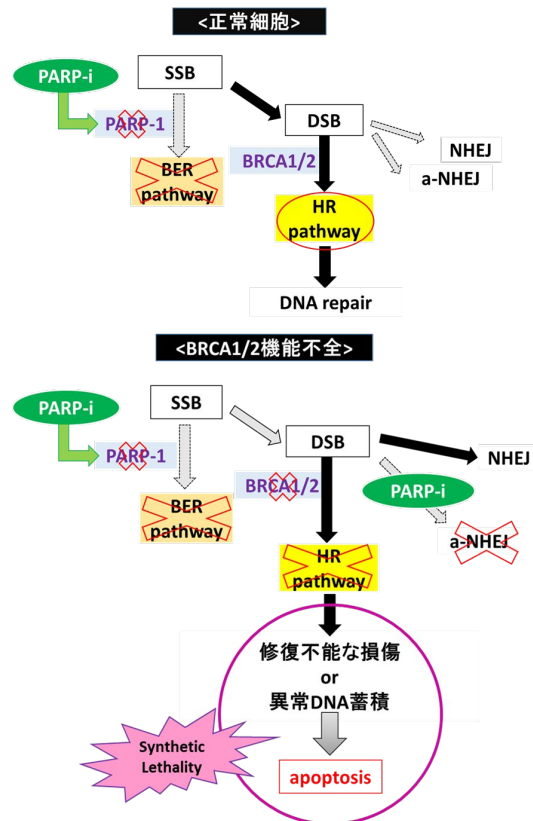


Figure 1. Synthetic Lethality

当教室では、シグナル伝達の変化に着目し CRPC における Docetaxel 抵抗性の獲得機序を解析してきた。CRPC の 30% に癌抑制遺伝子 PTEN の欠損を認め、前立腺癌の増殖における最大の原因遺伝子と考えられている。PTEN の欠損は Rad51 の転写を抑制し DNA 修復異常を引き起こすため、CRPC では BRCA1/2 が正常でも BRCA1/2 機能不全と類似の病態を引き起こし PARP-1 の阻害が Synthetic Lethal を誘導できる可能性が考えられる。以上より CRPC の増殖において DNA 修復経路の関与が強く示唆され、同経路の機序の解明及び制御が新たな治療戦略を確立する上で重要である。

2. 研究の目的

他癌種において PARP 阻害剤単独投与及び PARP 阻害剤と各種抗癌剤との併用療法による抗腫瘍効果の相乗効果が報告されているが、CRPC での報告は極めて少ないのが現状である。当教室ではヒト CRPC 細胞株 : C4-2

をアンドロゲン除去下で培養継続し、独自に実臨床の癌の進展プロセスと類似した DTX 抵抗性 CRPC 株：C4-2AT6 を樹立し (Kosaka et al. J urol,2010) 既に C4-2AT6 を用い幾つかの研究結果を報告してきた。

本研究では、DNA 修復機構における HR 経路と AR 経路、Akt-mTOR 経路等の相互メカニズムを解明し、DNA 修復経路の制御による CRPC の新規治療戦略の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1)ヒト CRPC 細胞株：C4-2AT6 を研究対象とした。PARP 阻害剤としては Olaparib を使用し、Olaparib 単剤、DTX 単剤、DTX + Olaparib 併用の各群における腫瘍細胞の増殖抑制効果を WST assay 法を用いて検討した。

(2)フローサイトメトリーを用い、各群におけるアポトーシスの有無を TUNEL 法にて評価した。

(3)Castration を施行した BALB-C ノードマウス (6-8 週齢) を用いて C4-2AT6 皮下腫瘍モデルを作成し、コントロール群、DTX 単剤投与群、Olaparib 単剤投与群、DTX + Olaparib 併用投与群の 4 群に分け、腫瘍径の経時変化を調べることで DTX と Olaparib の抗腫瘍効果を検討した。

4. 研究成果

(1)WST assay 法を用いて Olaparib の殺細胞効果を評価した。C4-2AT6 に DTX、Olaparib 単剤投与を行っても低～中濃度では有効な殺細胞効果は認めなかった。一方、低濃度 DTX に Olaparib を併用投与すると両薬剤とも低濃度であっても相乗効果により有意な殺細胞効果を認めるといった結果が得られた (Figure 2.)

(2)フローサイトメトリーを用いて TUNEL 法によるアポトーシスの評価を行っ

た。C4-2AT6 の Control 群、DTX 及び Olaparib 単剤投与群ではアポトーシス領域に細胞は認めなかった。一方、DTX + Olaparib 併用投与群ではアポトーシス領域に存在する細胞が確認された (Figure 3.)

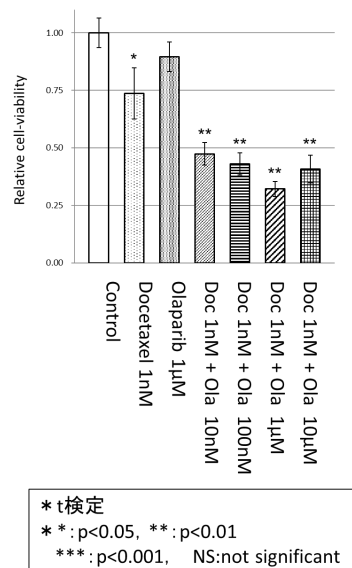


Figure 2. C4-2AT6 Docetaxel+Olaparib併用投与

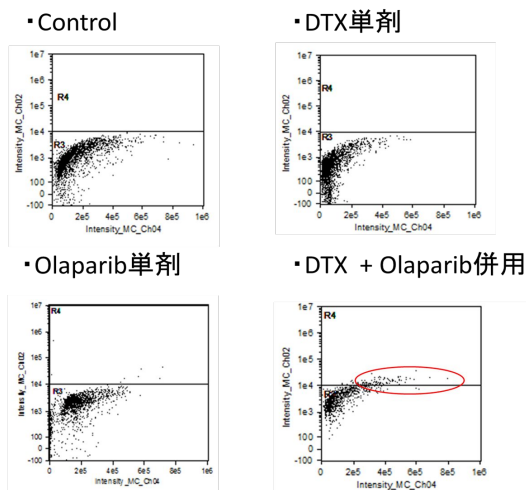


Figure 3. C4-2AT6におけるアポトーシスの評価

(3)Castration を施行した BALB-C ノードマウスを用いて C4-2AT6 皮下腫瘍モデルを作成した。皮下腫瘍のサイズが 100cm³ 程度となった時点で コントロール群、DTX 投与群、Olaparib 投与群、DTX + Olaparib 併用投与群の 4 群に分け腫瘍径の推移を評価した。DTX と Olaparib 併用群においてのみ

腫瘍径はコントロール群に比し有意に小さく、腫瘍増殖抑制効果が示唆された。

現在までに得られた結果を踏まえ、今後は In vitro では Western-blot 法を用いた DNA 修復機構を含めた各シグナル伝達経路の相互作用の検討，細胞蛍光免疫染色によるアポトーシスの評価等を行っていく必要がある。また、In vivo では薬剤濃度別の抗腫瘍効果の評価を検討していくとともに、マウス皮下腫瘍切片を用いた免疫染色による抗腫瘍効果やアポトーシスの評価を行っていく必要がある。

5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6．研究組織

(1)研究代表者

小林 裕章 (KOBAYASHI HIROAKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10598428

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし