

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：34318

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11032

研究課題名(和文)新規ドセタキセル結合タンパクの前立腺癌におけるタキサン系抗癌剤耐性獲得機序の解明

研究課題名(英文) A study on novel docetaxel-binding protein to clarify the molecular mechanism how to develop taxane-resistance in prostate cancer

研究代表者

高羽 夏樹 (TAKAHA, Natsuki)

明治国際医療大学・医学教育研究センター・准教授

研究者番号：80294081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究で前立腺癌細胞株DU145よりドセタキセル結合タンパクとして精製・同定したbaso-nuclin-1 (BNC1)のドセタキセル耐性株におけるmRNA発現量は感受性株の約20%である。siRNAでBNC1の発現抑制をした状態でドセタキセル感受性株を用いてドセタキセルを添加して細胞増殖アッセイを行ったが、ドセタキセル感受性の低下は確認できなかった。siRNAを用いたBNC1発現抑制による遺伝子発現変化をcDNAマイクロアレイで解析した。転写因子ZNF540の発現はドセタキセル非存在下で変化しないが、ドセタキセル存在下で増強しており、ドセタキセル耐性獲得過程に関与する可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗癌剤結合性を有する転写因子の中には、その発現量の抑制のみでは癌細胞の抗癌剤に対する感受性に影響を及ぼさないが、抗癌剤の存在下においてのみその発現が抑制されることにより他の遺伝子の発現量に変化を及ぼす場合があることを見出した。抗癌剤耐性獲得に関する新しい分子生物学的および薬理学的機序となる可能性があり、この観点からの基礎研究の発展が前立腺癌の抗癌剤治療成績の改善や治療アルゴリズムの決定に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Our previous study using docetaxel-resistant prostate cancer subcell line has revealed that the relative expression level (docetaxel resistant/sensitive) of baso-nuclin-1 (BNC1), which was purified and identified as docetaxel-binding protein expressed in prostate cancer cell line DU145, is about 20%. The cell growth assay in the presence of various concentrations of docetaxel could not confirm that knock-down of BNC1 in docetaxel-sensitive subcell line reduced the sensitivity to docetaxel. The gene expression profile caused by knock-down of BNC1 was examined by cDNA microarray analysis. The expression level of transcription factor ZNF540 was not changed in the absence of docetaxel, but was increased in the presence of docetaxel suggesting that such gene expression change might be involved in the development of docetaxel-resistance.

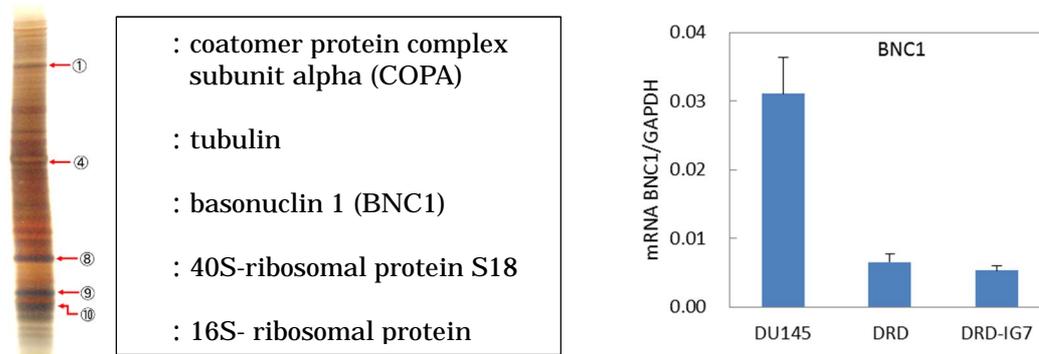
研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前立腺癌 抗癌剤耐性 ドセタキセル ケミカルバイオロジー 薬剤結合タンパク マイクロアレイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビカルタミドを中心とした内分泌治療を導入した後、それが無効となった去勢抵抗性前立腺癌 (castration resistant prostate cancer; CRPC) の現行の標準治療のひとつとしてタキサン系抗癌剤のドセタキセルが使用されている。我々はこれまでに高齢者の前立腺癌患者に対するドセタキセル療法の有効性と安全性について報告した (Takaha N et al Urol Int. 2011)。この中で、約 4 割の症例において 50%以上の PSA 下降がみられることを報告した。一方、ドセタキセル不応のもしくは抵抗性となった CRPC に対する有効な治療法はなかったが、第 Ⅲ 相臨床試験によりカバジタキセルの有効性が示され、ドセタキセル抵抗性症例の約 4 割において 50%以上の PSA 下降がみられることが報告された (Lancet 2010)。ドセタキセル、カバジタキセルともにタキサン系抗癌剤であり、作用機序のひとつは微小管機能阻害による G2-M 期の停止である。両薬剤には類似点が多いにもかかわらず、上記のごとく治療効果に違いがあることより、これらの薬剤の分子機構を解析・比較し、それらの結果に基づいた治療戦略 (治療予測因子やバイオマーカーの同定や、それらに基づいた適応症例の選択) を構築したり、新たな治療方法を開発したりすることが去勢抵抗性前立腺癌の治療成績向上のためには重要であると考えられる。この様な観点から、我々は先行研究 (平成 24 年-26 年度科研費 基盤研究(C) 課題番号:24592405) でドセタキセル抵抗性獲得に關与する候補分子として、前立腺癌細胞株のドセタキセル感受性株と抵抗性株において発現量が異なるようなドセタキセル結合タンパクの精製・同定を試みた。ナノ磁性ビーズを用いたケミカルバイオロジーの手法により、薬剤や毒性蛋白が直接結合する蛋白を探索し、その結合蛋白から種々の薬剤、毒性蛋白の作用機序の解明が報告されていた (Nat. Biotechnol. 2000) が、我々も同様の手法で前立腺癌細胞株 DU145 より 5 個のドセタキセル結合タンパクを精製し、下図の通り質量分析で同定を行った。ドセタキセルの直接の標的分子である tubulin が精製・同定できたことより、ドセタキセル結合タンパク精製の方法としては適切で有用であることが確認できた。ドセタキセル耐性獲得に關与する新規の non-ubiquitous protein の同定を目的とするため、同定したタンパクのうち COPA と BNC1 について、定量 PCR により、DU145 の親株 (ドセタキセル感受性株) とドセタキセル耐性株 (DRD、DRD-1G7) における mRNA 発現量を比較した。相対的 RNA 発現量 (耐性株/感受性株) は、COPA 約 100%、BNC1 約 20%であり、BNC1 がドセタキセル耐性獲得に關与する可能性があると考えられた。また、BNC1 は zinc finger protein であることから、転写因子としてドセタキセル感受性に關与する分子の発現を制御していることも推測された。



以上の背景より、我々が新規のドセタキセル結合タンパクとして精製・同定した BNC1 を分子生物学的に解析することで、前立腺癌におけるドセタキセル耐性獲得に關与する分子生物学的作用機序の解明につなげることを着想した。

2. 研究の目的

新規のドセタキセル結合タンパク BNC-1 がどのようにして、前立腺癌におけるドセタキセル耐性獲得やドセタキセル感受性の変化に關与するかを分子生物学的に解明することにより、CRPC の治療方法のアルゴリズムの決定および治療成績向上に貢献することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 細胞株:

他施設より譲渡された、アンドロゲン非感受性前立腺癌細胞株 DU145 の親株 (ドセタキセル感受性株) と、DU145 をドセタキセル存在下に継続培養することにより樹立した 2 個の DU145 ドセタキセル耐性株 (DRD、DRD-1G7) を本研究で使用した。

(2) BNC1 特異的 siRNA による発現抑制の効果を定量 RT-PCR で評価する

前立腺癌細胞を confluency 40-50%程度まで培養した後に、Lipofectamine を用いて 2 個の異なる BNC1 特異的 siRNA (si-BNC1_5, si-BNC1_6) とコントロールとして非特異的配列 siRNA (si-control) をトランスフェクションし、その 3 日後に total RNA を抽出。抽出した RNA を用いて、定量 RT-PCR を行い各サンプルの BNC1 の mRNA の定量を行い (各サンプルの GAPDH 発現量で補正) si-BNC1_5 および si-BNC1_6 による発現抑制効果を評価した。

(3) BNC1 発現抑制によるドセタキセル感受性変化を細胞増殖アッセイで評価する

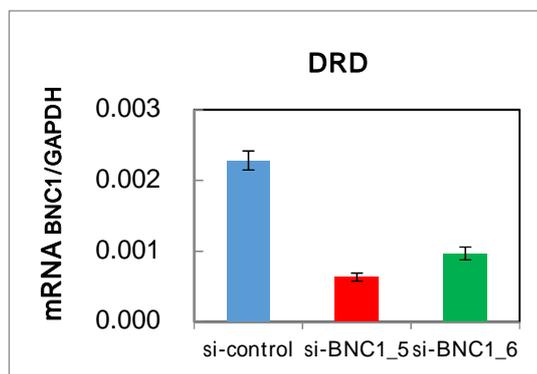
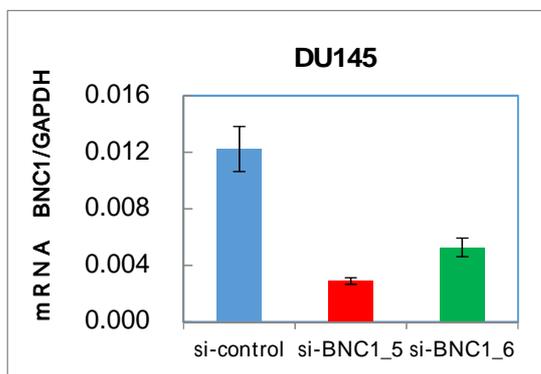
DU145 親株 (ドセタキセル感受性株) に BNC1 特異的 siRNA およびコントロールとして非特異的配列 siRNA をトランスフェクションし、その 3 日後に 96 well plate に細胞を播種。細胞を播種した翌日に異なる濃度のドセタキセルを添加し、その 1, 3, 5 日後に細胞増殖アッセイ (WST-8) を行った。BNC1 の発現を抑制した状態で、癌細胞のドセタキセルに対する感受性に有意な変化が生じるかを評価した。

(4) BNC1 の発現抑制による遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイで解析する

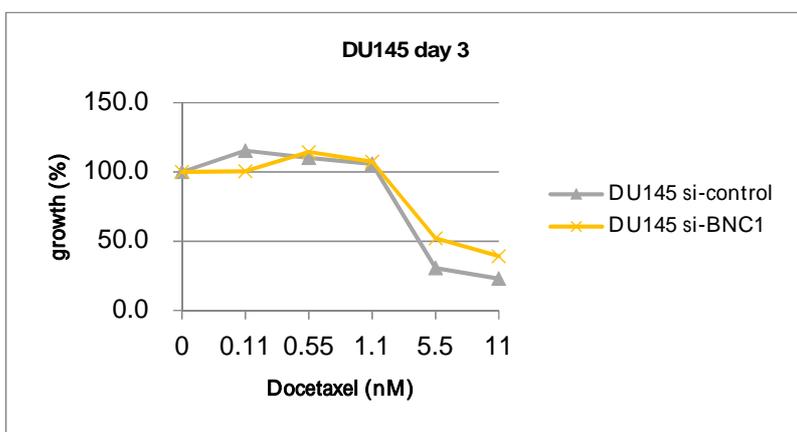
前立腺癌細胞株 DU145 の親株 (ドセタキセル感受性株) をドセタキセル非存在下に control siRNA および BNC1 特異的 siRNA で処理した後に cDNA microarray を行い、BNC1 の発現抑制による多数の遺伝子の発現変化を網羅的に解析した。また、BNC1 が転写因子であり、かつドセタキセル結合タンパクであることを考慮し、同様の処理をドセタキセル存在下にも行い 4 つの条件で遺伝子発現を比較した。

4. 研究成果

(1) BNC1 特異的に設計された 2 個の異なる siRNA (si-BNC1_5, si-BNC1_6) の発現抑制効果を定量 RT-PCR で評価した。ドセタキセル感受性株の DU145 (親株)、ドセタキセル耐性株の DRD、DRD-1G7 のいずれにおいても、BNC1 特異的に設計された siRNA si-BNC1_5 および si-BNC1_6 は BNC1 の発現を有意に抑制していることが確かめられた。また、DU145、DRD、DRD-1G7 のいずれにおいても siRNA si-BNC1_5 の方がより BNC1 の発現を抑制していたことから、以降の実験では si-BNC1_5 を BNC1 特異的 siRNA として使用した。DU145 を si-BNC1_5 で処理した場合の BNC1 mRNA 発現量は、非特異的配列 siRNA (si-control) で処理した場合の約 24% であった。ドセタキセル耐性株 (DRD、DRD-1G7) における BNC1 mRNA 発現量がドセタキセル感受性株 (DU145 親株) の約 20% であることより、si-BNC1_5 により十分な発現抑制が得られていると判断した。



(2) BNC1 特異的 siRNA の処理でドセタキセル感受性株における BNC1 の発現を低下させた状態で、種々の濃度のドセタキセルを添加し細胞増殖アッセイを行ったところ、control siRNA で処理した場合に比べ、高濃度ドセタキセル存在下での細胞増殖が高く、BNC1 の発現低下がドセタキセル抵抗性獲得に関与することが示唆された。



しかし、上記実験の至適条件を決め再現性を確認すべく、色々な条件で実験を重ねたが、実験結果の再現性が得られなかった。

(3) BNC1 発現抑制による遺伝子発現変化を網羅的に解析し、その中からドセタキセル感受性に関わるもしくは癌の進展に関わる遺伝子を同定することを考え、DU145 を control siRNA および BNC1 特異的 siRNA で処理した後に cDNA microarray を行った。また、BNC1 が転写因子であり、かつドセタキセル結合タンパクであることをより、ドセタキセルの非存在下と存在下とでは、BNC1 の転写因子としての機能が変化する可能性があるのではないかと推測し、同様の処理をドセタキセルの非存在下と存在下にも行い、以下の 4 つの条件で遺伝子発現を比較した；

siControl_Doc(-)、siBNC1_Doc(-)、siControl_Doc(+)、siBNC1_Doc(+)

多くの遺伝子において、BNC1 発現抑制による遺伝子発現変化はドセタキセル非存在下と存在下ではほぼ同様であった。しかし、ZNF540 に関しては、ドセタキセル非存在下では BNC1 発現抑制により発現量はほぼ変化しないのに対して、ドセタキセル存在下では、6.92 倍と著明に発現増強がみられた。BNC1 がドセタキセル結合タンパクであり、かつ転写因子であることを考えると、ドセタキセルに結合する状態でかつ発現量が変化することで直接的もしくは間接的に ZNF540 の発現に関与したことが推測される。抗癌剤の存在下でアポトーシスを回避し、癌細胞が抗癌剤耐性を獲得することを考えると、上記の様なドセタキセル存在下のみでの遺伝子発現の変化は抗癌剤耐性獲得過程に関与している可能性があるかと推察する。

我々は本研究の中で、抗癌剤結合性を有する転写因子の中には、その発現量の抑制のみでは癌細胞の抗癌剤に対する感受性に影響を及ぼさないが、抗癌剤の存在下においてのみその発現が抑制されることにより他の遺伝子の発現量に変化を及ぼす場合があることを見出した。抗癌剤耐性獲得に関する新しい分子生物学的および薬理学的機序となる可能性があり、この観点からの基礎研究の発展が前立腺癌の抗癌剤治療成績の改善や治療アルゴリズムの決定に貢献する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	納谷 佳男 (NAYA Yoshio) (80639881)	明治国際医療大学・医学教育研究センター・客員教授 (34318)	
研究分担者	浮村 理 (UKIMURA Osamu) (70275220)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	上田 紗弥(伊藤紗弥) (UEDA Saya) (90534511)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員 (24303)	
研究分担者	本郷 文弥 (HONGO Fumiya) (80291798)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	
研究分担者	藤原 敦子 (FUJIHARA Atsuko) (20457980)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	
研究分担者	邵 仁哲 (SOH Jintetsu) (40305587)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員教授 (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上田 崇 (UEDA Takashi) (50601598)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師 (24303)	
研究分担者	大石 正勝 (OISHI Masakatsu) (90405316)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師 (24303)	