

令和元年6月14日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20156

研究課題名(和文) ARスプライスバリエントを標的とした去勢抵抗性前立腺がんに対する治療法の探索

研究課題名(英文) Investigation of the new treatment for castration-resistant prostate cancer targeting AR-splice variants

研究代表者

加藤 実 (KATO, MINORU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：30711684

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)：ドセタキセル耐性株であるLNCaP95-DRを樹立し、まずFL-ARとAR-V7のpathwayをWB, real-time PCRで評価したところ、AR-V7およびその下流分子が発現上昇しており、ドセタキセル耐性とAR-V7 pathwayに関連があることが示唆された。また、カバジタキセルに対する交叉耐性を認め、AR-V7のノックダウンはLNCaP95-DRのドセタキセルおよびカバジタキセルに対する感受性を回復させなかったことからタキサン系抗癌剤とAR-V7の発現に関連はないと考えられた。またAR-N末端阻害剤であるEPIは親株同様LNCaP95-DRにも同様の抗腫瘍効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでCRPCの最終薬剤として使用されてきたタキサン系抗癌剤とAR-V7の間には薬剤感受性の面において関連があるとした報告や、その反面関連はないとする報告が散見され、AR-V7発現の意義に関しては議論が分かれていたが、今回の研究結果により、AR-V7の発現はタキサン感受性と関連を認めず、さらにAR-V7を標的とした薬剤はドセタキセル耐性となった後でも一定の治療効果を有する可能性があることを示すことができた。今回の発見が実臨床の去勢抵抗性前立腺がん治療において一定の影響を及ぼすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed docetaxel-resistant LNCaP95-DR cells. Western blot and real-time PCR analysis showed the increase of the expression levels of AR-V7 and its down-regulated molecules. Cross-resistance to cabazitaxel was also seen in LNCaP95-DR, however, knock-down of AR-V7 did not affect the sensitivity of docetaxel or cabazitaxel in LNCaP95-DR, indicating that there is no significant relevance between taxane sensitivity and AR-V7. Finally, AR-NTD antagonist, EPI compound, suppressed the proliferation of LNCaP95-DR to the same extent of that in parental LNCaP95.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 ARスプライスバリエント

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

1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺がんの原因の 1 つとしてアンドロゲン受容体スプライスバリエーション 7 (AR-V7) の存在が認められているが、アンドロゲン受容体 N 末端阻害剤 (EPI compound) は、野生型 AR のみならず、スプライスバリエーションにも同等に作用し、転写活性を抑制することで抗腫瘍効果を発揮することが知られている (Andersen, R.J., et al. *Cancer Cell*, 2010)。一方、進行性 CRPC の中には癌抑制遺伝子 PTEN の欠失に伴う PI3K/Akt/mTOR シグナルの恒常活性化が認められるものが多く、この経路の inhibitor による前立腺がんの治療効果も *in vitro*, *in vivo* で立証されており、既存の抗アンドロゲン剤との併用療法が現在臨床試験段階である。しかし、PTEN 欠失を伴う前立腺がんの多くは進行性であることから、AR-V の発現が高率に認められることが予想され、エンザルタミドを始めとした既存の抗アンドロゲン剤はリガンド結合部位を標的とするため、同部位に欠損・変異が認められるスプライスバリエーションには効果は期待できない。EPI をはじめとした AR-N 末端阻害剤は AR-V7 を標的とした前立腺がんに対して非常に有用であるが、前立腺がんの進展機構は非常に複雑なことから、薬剤耐性の時期を遅らせるためにも他の重要な分子標的薬との併用療法を試みることは臨床的に非常に重要である。

2. 研究の目的

AR および PI3K/Akt/mTOR pathway の遮断が MAPK および IL-6/STAT3 経路の活性化を引き起こすことを示唆するデータを得たことから、EPI と MAPK 阻害剤あるいは IL-6/STAT3 阻害剤の併用療法による治療効果および作用メカニズムを明らかにし、交叉耐性を回避できる最適な分子標的治療薬の選択に基づいた併用療法を探索することを目標とする。

3. 研究の方法

- (1) 去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) 細胞株において、MEK 阻害剤および Stat3 阻害剤の治療効果を単剤および AR-N 末端阻害剤 (EPI) との併用で検討し、細胞増殖 assay、AR reporter assay、western blot による解析を行う。さらに、バイパスシグナル (AR, PI3K/Akt/mTOR, IL-6/STAT3, Ras/Raf/MAPK など) とのクロストークを western blot で解析し、薬剤交叉反応を評価する。
- (2) 上記の実験を CRPC マウスモデルで再現できるか確認する。得られた腫瘍サンプルから免疫染色および western blot を行い、標的シグナルの下流分子の発現変化を評価する。
- (3) すでに解析が終了した mTOR 阻害剤と比較して、EPI との併用において CRPC に対する最適な分子標的治療薬の選択に基づいた併用療法を目指す。

4. 研究成果

各種前立腺がん細胞株 (PC3, DU145, VCaP, 22Rv1, LNCaP, LNCaP95,) を用いて IL-6/JAK/STAT3 および EGF/MAPK pathway signal の基礎活性状態を Western blot で評価したところ、まず DU145 および LNCaP95 が MAPK の恒常的リン酸化シグナルを有していることを認めたことから、これら 2 種の細胞株に対して選択的 MAPK 阻害剤 (selumetinib, trametinib) を投与した。これら 2 剤はいずれの細胞株においても pMAPK の発現を有意に低下させたが、MTT assay では細胞増殖抑制効果を認めなかった。この結果から、CRPC において MAPK のシグナルは細胞増殖の観点からはこれまでに報告されているほど重要ではないことが示唆された。次に STAT3 のリン酸化シグナルの基礎状態を各細胞で評価したところ、IL-6 の刺激のない状態では DU145 細胞のみが恒常的に pSTAT3 の発現を認めたため、CRPC 株である LNCaP95 と DU145 をそれぞれ IL-6 (50 ng/ml) で刺激し、STAT3 のリン酸化シグナルを活性化することとした。

CRPC 株である LNCaP95 と DU145 に対して STAT3 阻害剤である S31-201, stattic, SH4-54 で治療を行うと、一定濃度以上では細胞が死滅し、治療安全域が非常に狭いことが分かった。これらの中から比較的治療安全域が広い stattic を選択し、同薬剤を用いて AR reporter assay、real time RT-PCR および WB を行ったが AR の転写活性の有意な抑制効果は認められなかった。これらの結果から動物実験に STAT3 阻害剤を使用するには妥当ではないと判断し、前年で確認した MAPK 阻害剤および STAT3 阻害剤による治療は適切でないと判断した。

次に CRPC の原因としてその他報告されている GR、神経内分泌変化についての検討を行った。GR agonist であるデキサメサゾンでは DU145 および LNCaP95 においては治療効果が認められなかった。神経内分泌マーカーである NSE は親株である LNCaP に比較して LNCaP95 では過剰発現が認められたが、治療標的とすることが難しいことおよび GR を標的とすることがむずかしいことにより、ドセタキセル抵抗性去勢抵抗性前立腺癌細胞株の樹立を行う方針とした。

ドセタキセル耐性株である LNCaP95-DR を樹立し、まず FL-AR と AR-V7 の pathway を WB、real-time PCR で評価したところ、AR-V7 およびその下流分子が発現上昇しており、ドセタキセル耐性と AR-V7 pathway に関連があることが示唆された。また、カバジタキセルに対する交叉耐性を認めたが、AR-V7 のノックダウンは LNCaP95-DR のドセタキセルおよびカバジタキセルに対する感受性を回復させなかったことからタキサン系抗癌剤と AR-V7 の発現に関連はないと考えられた。また AR-N 末端阻害剤である EPI は親株同様 LNCaP95-DR にも同様の抗腫瘍効果を認

めた。

これまでCRPCの最終薬剤として使用されてきたタキサン系抗癌剤とAR-V7の間には薬剤感受性の面において関連があるとした報告や、その反面関連はないとする報告が散見され、AR-V7発現の意義に関しては議論が分かれていたが、今回の研究結果により、AR-V7の発現はタキサン感受性と関連を認めず、さらにAR-V7を標的とした薬剤はドセタキセル耐性となった後でも一定の治療効果を有する可能性があることを示すことができた。今回の発見が実臨床の去勢抵抗性前立腺がん治療において一定の影響を及ぼすことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Androgen Receptor Splice Variant 7 Drives the Growth of Castration Resistant Prostate Cancer without Being Involved in the Efficacy of Taxane Chemotherapy. Shimizu Y, Tamada S, Kato M, Hirayama Y, Takeyama Y, Iguchi T, Sadar MD, Nakatani T. J Clin Med. 2018 Nov 16;7(11). pii: E444. doi: 10.3390/jcm7110444. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. ABCB1 およびアンドロゲン受容体 N 末端を標的とした、ドセタキセル耐性 CRPC に対する治療戦略. 清水保臣、加藤実、武山祐士、仲谷達也. 第 28 回泌尿器科分子・細胞研究会. 下関 2019.2.23
2. The effect of androgen receptor splice variant 7 on the growth of castration-resistant prostate cancer and the efficacy of taxane chemotherapy. Yasuomi Shimizu, Minoru Kato, Yuji Takeyama, et al. ASCO-GU 2019. San Francisco, USA (15th Feb, 2019)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。