

令和元年6月19日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16813

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌のEMTと抗癌剤耐性に関連する遺伝子を標的とした新規治療戦略

研究課題名(英文) Novel treatment strategy for refractory prostate cancer targeting EMT related genes

研究代表者

本郷 周 (Hongo, Hiroshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：10626675

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)：去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)に対して、本邦においてドセタキセルによる化学療法が広く行われてきた。また、近年ではカバジタキセル等の新規治療薬も近年使用され始めているが、その生命予後改善効果はいずれも数か月程度である。申請者はカバジタキセル曝露化に転移性CRPC細胞株を培養し、カバジタキセル耐性株を独自に樹立した。カバジタキセル耐性株においてZEBファミリー、SNAIファミリー等のEMT制御関連遺伝子群が亢進しており、前立腺癌難治性獲得機構への関与が示唆された。前立腺癌症例mRNAデータを用いた解析において、ZEBファミリー及び間質性マーカーであるVIMの高発現は有意な再発リスク因子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カバジタキセル(CBZ)は去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)に有効な新規抗癌剤として効果を期待されたが、数か月の内に耐性を獲得する。CBZ耐性獲得後の予後は極めて不良である。申請者が樹立したCBZ耐性CRPC細胞株は世界でも報告がなく、同モデル細胞の機能解析によるCBZ耐性獲得機構の解明はunmet medical needsに即した波及効果の大きいテーマと考える。申請者はCBZ耐性モデル細胞株の遺伝子発現解析によりEMT関連遺伝子群がタキサン系抗癌剤耐性に関わる可能性を見出した。今後パイオインフォマティクスを応用した薬剤スクリーニングにより、CRPCに対するEMT阻害剤を同定する予定である。

研究成果の概要(英文)：These days, new drugs such as cabazitaxel, abiraterone and enzalutamide are approved for CRPC. However, life prognosis improvement effect is limited to several months and acquired resistance is inevitable. I established cabazitaxel-resistant cell lines by incubating metastatic CRPC cell lines under gradual increasing concentrations of cabazitaxel. Cabazitaxel-resistant cell lines had higher expression of EMT-related genes. Next, I analyzed the correlation between EMT-related genes and prognosis of prostate cancer using next-generation sequencing cohort data. Up-regulation of ZEB1 and VIM are significant risk factor for recurrence of prostate cancer.

研究分野：前立腺癌

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 上皮間葉移行 EMT 抗癌剤耐性

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

1. 研究開始当初の背景

転移性前立腺癌の治療は、アンドロゲン受容体拮抗薬 (Androgen receptor; AR) および LHRH アゴニスト/アンタゴニストによるホルモン療法が中心となる。ホルモン療法により多くの症例で一時的な寛解が得られるが、数年の内にホルモン抵抗性を獲得する。これを去勢抵抗性前立腺癌: Castration Resistant Prostate Cancer; CRPC と表記する。CRPC に対して、本邦においてドセタキセルによる化学療法が広く行われてきた。また、近年ではエンザルタミド、アビラテロン、カバジタキセル等の新規治療薬も近年使用され始めているが、その生命予後改善効果はいずれも数か月程度である。

EMT は以前より各種悪性腫瘍の進展および抗がん剤耐性の獲得に寄与することが報告されており、SNAI ファミリー、ZEB ファミリーなどの EMT に関与する分子は以前より悪性腫瘍の治療標的として注目されてきた。しかしながら、EMT におけるシグナリング調節機構は未だ明らかでなく、各種分子を標的とした創薬も成果は限定的である。当研究室で樹立したドセタキセル (DOC) 耐性 CRPC 細胞株 C4-2AT6 のゲノム解析の結果、Vimentin の amplification および Cadherin ファミリーの deletion を認めており、CRPC における EMT が抗がん剤耐性に関わる可能性が示唆された。

本研究では CRPC における EMT 誘導、および抗がん剤耐性獲得のメカニズムを解明し、EMT に関連する転写因子ネットワークをターゲットとした治療戦略を追求することを目的としている。

2. 研究の目的

申請者は難治性前立腺癌組織内の微小環境において、EMT が亢進していることに着目し、ZEB ファミリー、SNAI ファミリー等の EMT 制御関連遺伝子群が CRPC 進展に関わると考え、以下 4 点を検討項目とした。

- (1) CRPC における EMT に関連する転写因子群の解析
- (2) 前立腺癌における EMT 制御機構と相互依存的なシグナル伝達機構の解明
- (3) EMT ならびに抗がん剤耐性に関連する遺伝子発現プロファイルをターゲットとした新規治療

3. 研究の方法

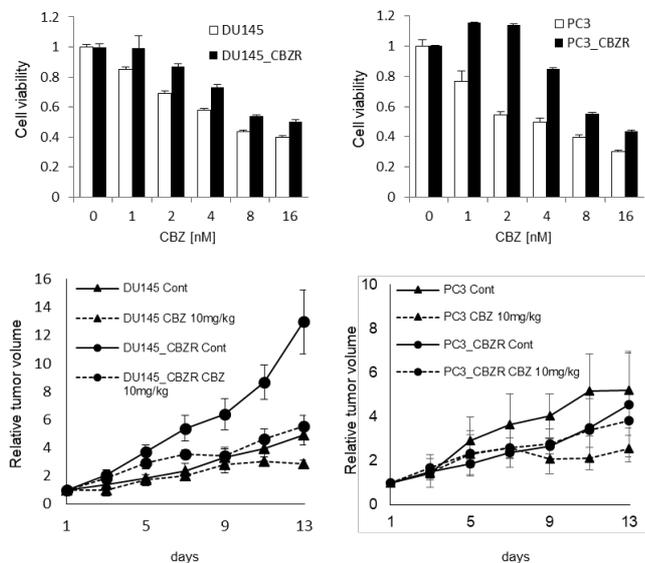
(1) 申請者は新規抗癌剤カバジタキセル (CBZ) の耐性メカニズム解明のため、CBZ 暴露下に前立腺癌細胞株 DU145, PC3 を培養させることにより、CBZ 耐性前立腺癌細胞株 DU145CR, PC3CR を独自に樹立した。CBZ 耐性株の遺伝子・タンパク質発現を解析し、治療抵抗性との関連を解析した。

(2) EMT 関連遺伝子と前立腺癌予後との相関を解析するため、過去に報告された前立腺癌コホートより、RNA sequencing データおよび患者予後データを抽出し、各種遺伝子発現と予後との相関を解析した。

4. 研究成果

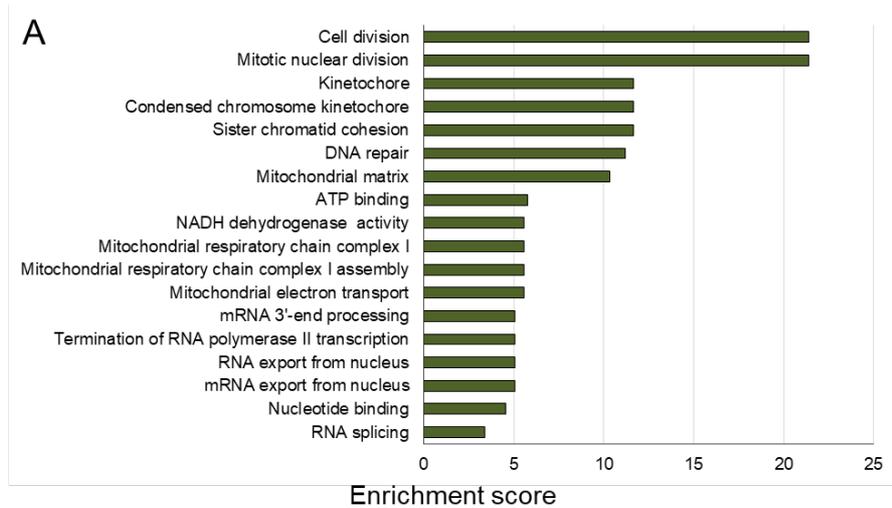
(1) 前立腺癌の CBZ 耐性獲得機構は未解明であり、耐性モデルも存在しない。申請者は前立腺癌細胞株 DU145, PC3 を CBZ 投与下に約 2 年間培養させることにより、CBZ 耐性前立腺癌モデル DU145CR, PC3CR を樹立した。In vitro, in vivo で上記細胞株の CBZ 耐性を確認した(図 1)。

図 1



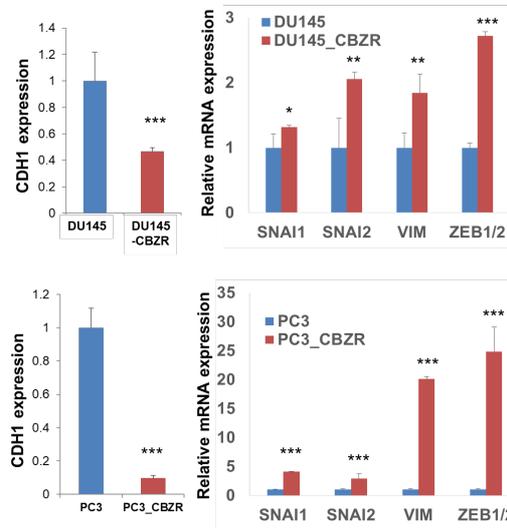
さらに Microarray により遺伝子発現プロファイルを解析した結果、細胞増殖に関わる遺伝子クラスターの亢進を認めた (図 2)。

図 2



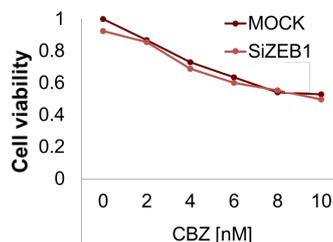
さらに定量 PCR により EMT 関連遺伝子群の発現量を比較した結果、CBZ 耐性細胞株における EMT 関連因子の亢進及び上皮性マーカー CDH1 の抑制を認めた (図 3)。

図 3



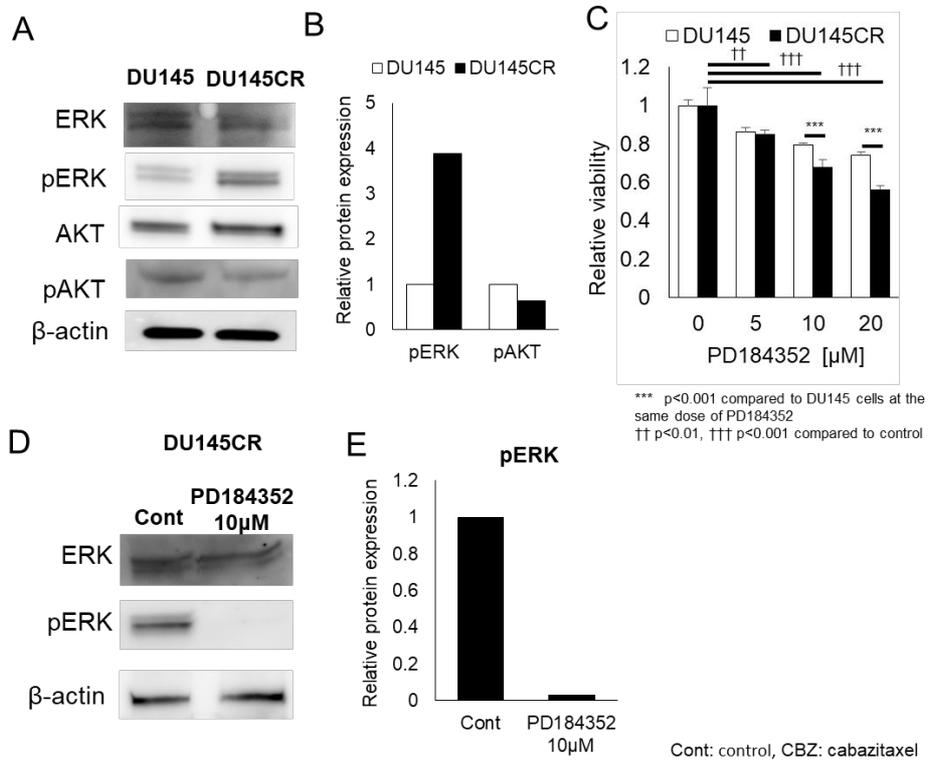
ZEB ファミリーは DU145CR, PC3CR 双方の細胞株で亢進しており、CBZ 耐性との関連が示唆されたため、SiRNA により ZEB ファミリーを Knockdown させた際の CBZ 感受性を検討した。しかしながら、ZEB ファミリーの Knockdown は CBZ 耐性株の感受性を亢進させなかった (図 4)。

図 4



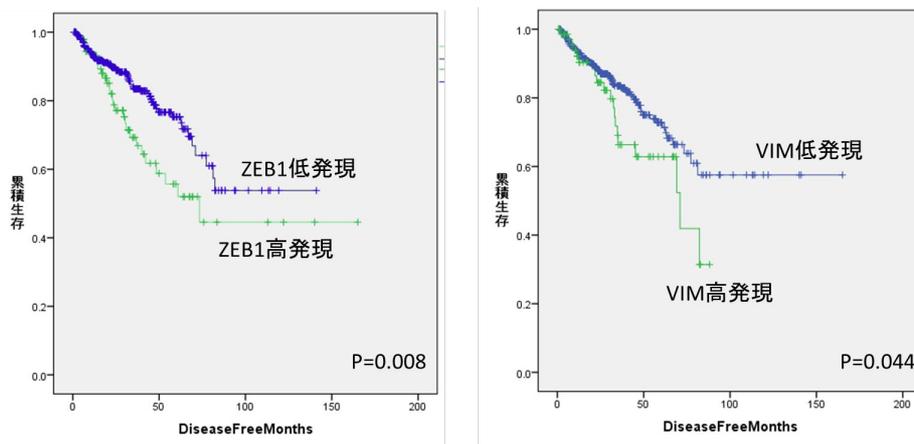
申請は Western blotting によりタンパク質酸化を解析し、CBZ 耐性化に伴うシグナル伝達系の変化を解析した。その結果、DU145CR 中の MEK/ERK pathway の亢進を認めた。さらに、MEK 阻害剤 PD184352 は CBZ 耐性株に有意な抗腫瘍効果を有しており、CBZ 耐性株における MEK/ERK pathway の治療標的としての有用性が示唆された。(図 5)

図 5



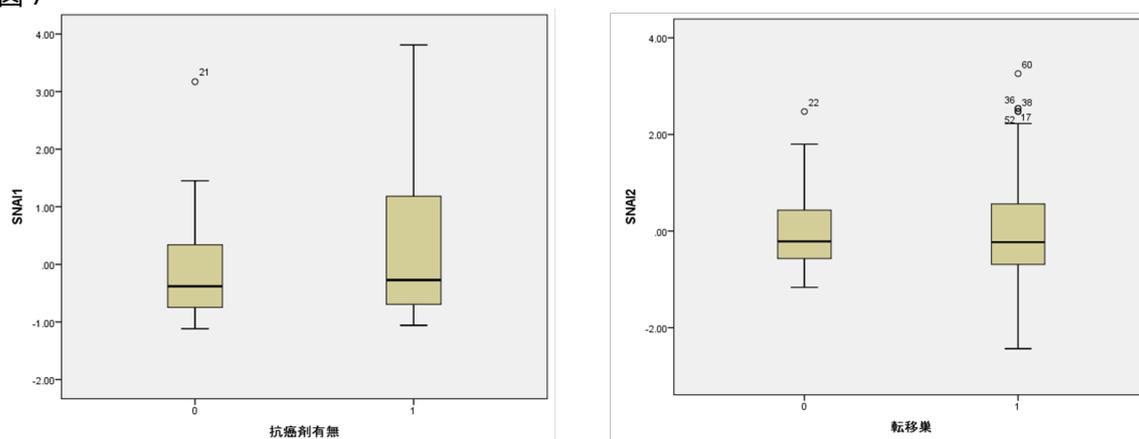
(2) CBZ 耐性モデルにおいて EMT 関連遺伝子の発現亢進を認め、CBZ 耐性との関連が示唆されたが、EMT 関連遺伝子の Knockdown は、CBZ 感受性を回復させなかった。申請者は、EMT 関連遺伝子の臨床的意義を検討するため、過去に報告された前立腺癌次世代シーケンサーコホート (Abeshouse A et al, Cell. 2015) 次世代シーケンサーコホートより、RNA sequencing データおよび各種患者背景を抽出し、EMT 関連遺伝子の発現と予後との相関を解析した。ZEB1 および間質性マーカーである Vimentin の発現亢進は有意な再発リスク因子であった (図 6)

図 6



また、致死性前立腺癌の剖検検体による次世代シーケンサーコホート (Robinson D et al, Cell. 2015) より mRNA データを抽出し再解析した結果、抗癌剤投与後の検体では、抗癌剤未施行例に比べて SNAI1/2 の発現が亢進していた (図 7)

図 7



以上の結果から、EMT 関連因子が抗癌剤耐性に関わり、治療標的となり得る可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. [Hongo H](#), Kosaka T, Oya M. “Analysis of cabazitaxel-resistant mechanism in human castration-resistant prostate cancer. *Cancer Sci.* 2018;109(9):2937-2945. doi: 10.1111/cas.13729. 査読有
2. Yasumizu Y, [Hongo H](#), Kosaka T, Mikami S, Nishimoto K, Kikuchi E, Oya M. “PKM2 under hypoxic environment causes resistance to mTOR inhibitor in human castration resistant prostate cancer.” *Oncotarget.* 2018;9(45):27698-27707. doi: 10.18632/oncotarget.25498. 査読有
3. Kosaka T, [Hongo H](#), Miyazaki Y, Nishimoto K, Miyajima A, Oya M. “Reactive oxygen species induction by cabazitaxel through inhibiting Sestrin-3 in castration resistant prostate cancer.” *Oncotarget.* 2017;8(50):87675-87683. doi: 10.18632/oncotarget.21147. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1. [Hongo H](#), Kosaka T, Yazumizu Y et al “Overcoming cabazitaxel resistance by inhibiting G2/M regulating mechanism in castration-resistant prostate cancer” AUA annual meeting 2019
2. [本郷周](#)、[小坂威雄](#)、[楊井祥典](#)、[安水洋太](#)、[宮崎保匡](#)、[水野隆一](#)、[菊地栄次](#)、[大家基嗣](#) 「G2/M 期制御因子を標的としたカバジタキセル耐性前立腺癌克服薬の In silico screening」第 107 回 日本泌尿器科学会総会 2019
3. [本郷周](#)、[小坂威雄](#)、[安水洋太](#)、[宮崎保匡](#)、[大家基嗣](#) 「カバジタキセル耐性去勢抵抗性前立腺癌の遺伝子発現ネットワークを標的としたリプログラミング薬剤のスクリーニング」第 19 回学術総会 (関東ホルモンと癌研究会) 2019
4. [本郷周](#)、[小坂威雄](#)、[安水洋太](#)、[宮崎保匡](#)、[大家基嗣](#) 「カバジタキセル耐性去勢抵抗性前立腺癌に対する Topoisomerase 阻害剤の有用性」第 5 回学術集会 (泌尿器腫瘍学会) 2018
5. [Hongo H](#), Kosaka T, Yazumizu Y et al “Roles of topoisomerase inhibitors and cisplatin for

CRPC in the post-cabazitaxel setting.” AUA annual meeting 2018

6. 本郷周、小坂威雄、安水洋太、宮崎保匡、大家基嗣 「エンザルタミド/カバジタキセル耐性前立腺癌の遺伝子発現プロファイルを標的としたリプログラミング薬剤のスクリーニング」第 18 回学術総会（関東ホルモンと癌研究会） 2018

7. Hongo H, Kosaka T, Yazumizu Y et al “Correlation between Cabazitaxel resistance and EMT in metastatic castration resistant prostate cancer.” AUA annual meeting 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：カバジタキセル耐性前立腺がんの予防または治療剤

発明者：大家基嗣/小坂威雄/本郷 周

権利者：学校法人慶應義塾

種類：用途特許

番号：特願 2018-007668

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

若手研究のため該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小坂 威雄

ローマ字氏名： KOSAKA, Takeo

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。