

令和元年5月30日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16814

研究課題名(和文) 難治性前立腺癌におけるMUC1を中心としたシグナル伝達の制御による新規治療戦略

研究課題名(英文) Targeting MUC1 improve the docetaxel resistance and increase the sensitivity for ferroptosis in castration resistant prostate cancer

研究代表者

長谷川 政徳 (HASEGAWA, Masanori)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：50383823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：MUC1発現はLNCap<C4-2<C4-2AT6であった。MUC1の発現上昇とともにPI3K/AKT経路においてp-AKTの発現上昇、およびアンドロゲン受容体の発現上昇を認めた。次に、C4-2AT6においてsiRNAを用いてMUC1をノックダウンしたところ、p-AKTの発現を低下させ、ドセタキセルの殺細胞効果が増強され薬剤耐性が改善されることを確認した。GPX4阻害剤投与により、C4-2においてはフェロトーシス誘導による殺細胞効果を認めなかったのに対し、C4-2AT6においては著明な殺細胞効果を認め、MUC1をノックダウンすることで、さらに殺細胞効果が増強された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MUC1を標的とし制御することは、ドセタキセル感受性を回復させ、MUC1依存性が高い状態においてフェロトーシスが誘導されやすく、MUC1は新規治療戦略の対象として期待された。前立腺癌についてはMUC1の詳細な機能については検討されておらず、フェロトーシスについての報告は見受けられない。現在、臨床において治療に苦慮している去勢抵抗性、抗癌剤耐性前立腺癌を対象とする本研究は、将来的に臨床応用の可能性が期待できる研究課題であると考えている。また、本研究の中でフェロトーシスという新しい細胞死のメカニズムに可能性に着目した点がユニークであり、これまでの思考とは一線を画していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The protein expression levels of Mucin 1 (MUC1) and androgen receptor were higher in C4-2AT6 as comparing with C4-2 or LNCap. In previous report, C4-2AT6 cells shows the resistance to docetaxel (DTX) through the activation of PI3K/AKT pathway. In this study, the PI3K/AKT pathway was activated in C4-2AT6, and knockdown of MUC1 using siRNA impaired p-AKT expression. The DTX sensitivity was recovered in C4-2AT6 by silencing MUC1. The glutathione peroxidase 4 (GPX4) converts lipid hydroperoxidase to lipid alcohols, and prevents the iron dependent formation of lipid ROS. Inhibition of GPX4 by RSL3 or ML210 led to increase lipid ROS and induced ferroptosis. No cytotoxic effects by RSL3 or ML210 was observed in C4-2. On the other hands, C4-2AT6 cells shows high sensitivity for RSL3 or ML210, and knockdown of MUC1 increased the sensitivity for GPX4 inhibition.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：去勢抵抗性 前立腺癌 フェロトーシス MUC1 GPX4 ドセタキセル

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

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性の去勢抵抗性前立腺癌に対する標準治療はタキサン系抗癌剤であるドセタキセル (DTX)、カバジタキセルが中心であるが、治療の過程で抗癌剤耐性となる。しかし、前立腺癌における抗癌剤耐性機序、もしくは次の治療法の可能性に関しては未だ深く考察されていないのが現状である。

(2) 2012 年に新しくフェロトーシスという細胞死の概念が提唱された (Dixon et al. Cell, 2012)。フェロトーシスは既知の細胞死メカニズムとは全く異なり、鉄依存的な活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) の発生と過酸化した脂質の蓄積によって細胞死をきたす機序である。細胞内の鉄のみに依存する機構であり、他の金属類には依存しない特徴を有する。

(3) 近年、各癌種において膜結合型ムチン 1 型 (MUC1) が癌増殖能を促進する癌蛋白であることが報告され (Kufe et al. Oncogene, 2013)、研究代表者は先行研究で乳癌において、MUC1 が酸化物質である GSH のもととなるシスチンを細胞内に取り込むシスチン/グルタミン酸交換輸送体である xCT を安定化させ、細胞内 ROS 環境を整えることでフェロトーシスを抑制していることを報告した (Hasegawa et al. Oncotarget, 2016)。

## 2. 研究の目的

前立腺癌では MUC1 の分子メカニズムについては未解明で、MUC1 に関する治療耐性獲得機序やフェロトーシスについての検討は研究代表者らが調べた限り報告されていない。研究代表者は、去勢抵抗性前立腺癌においても MUC1 が細胞の増殖能を制御し、DTX 耐性獲得に寄与しているのではないかと考え、本研究では MUC1 蛋白を標的とし、さらにフェロトーシスに着目した新規治療戦略を確立させることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ホルモン感受性前立腺癌細胞株 LNCap、去勢抵抗性前立腺癌細胞株 C4-2、そしてチャコール処理した FBS で 6 か月間培養を継続することで樹立した DTX 耐性前立腺癌細胞株 C4-2AT6 の 3 種類の細胞株を使用した。目的遺伝子の mRNA の確認に q-PCR 法を、目的蛋白の確認に Western Blot 法を用いて確認した。殺細胞効果の確認には WST1-assay 法を用いた。

### (1) MUC1 抑制によるタキサン系抗癌剤耐性の克服

これまでに他癌において MUC1 は AKT 経路を活性化させることが報告されている。一方で、DTX の耐性機序として AKT 経路の活性化が一因として認識されている。これまでに我々は C4-2AT6 において AKT 経路が活性化されていることを確認しており、本検討では siRNA を用いて MUC1 を knock down することで、タキサン系抗癌剤に対する抵抗因子である AKT 経路や抑制されるか検討した。

siRNA による MUC1 の抑制はタキサン系抗癌剤による殺細胞効果を増強するか検討した。

### (2) MUC1 抑制 フェロトーシス誘導による治療抵抗性の克服

それぞれの細胞株に対して、グルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) 阻害剤でフェロトーシスを誘導する ML210 と RSL3 による殺細胞効果について検討し、去勢抵抗性、DTX 耐性細胞株でフェロトーシス感受性が上昇しているか確認した。

逆に GPX4 カスケードの下流でフェロトーシスを抑制する脂質抗酸化剤である ferrostatin-1、lipoxstatin-1、リポキシゲナーゼ阻害剤である PD146176、鉄キレート剤 DFO 等を併用し、増強したフェロトーシス感受性が再度低下するか検討した。

また、アポトーシス等の他の経路の関与がないことを証明するため、カスパーゼ阻害薬 Z-VAD-FMK を併用し、感受性が変化しないことを確認した。

前述のように、研究代表者は他癌において MUC1 はフェロトーシスから細胞を保護していることを確認している (Hasegawa et al. Oncotarget, 2016)。MUC1 の knock down は細胞内 ROS を上昇させ、ML210 と RSL3 によるフェロトーシス誘導は殺細胞効果を増強させるか検討した。

## 4. 研究成果

(1) MUC1 発現は LNCap < C4-2 < C4-2AT6 であった。MUC1 の発現上昇とともに PI3K/AKT 経路において p-AKT の発現上昇、およびアンドロゲン受容体の発現上昇を認めた。次に、C4-2AT6 において siRNA を用いて MUC1 をノックダウンしたところ、p-AKT の発現低下を認めた。また、MUC1 をノックダウンした C4-2AT6 の DTX 感受性を検討したところ、DTX の殺細胞効果が増強され、薬剤耐性が改善されることを確認した。

(2) RSL3、ML210 を投与すると、C4-2 においては ferroptosis 誘導による殺細胞効果を認めなかったのに対し、C4-2AT6 においては著明な殺細胞効果を認めた。MUC1 をノックダウンすることで、さらに殺細胞効果が増強された。

(3)ML210により誘導された細胞死は、ferrostatin-1、Iiproxstatin-1、PD146176、DFにより抑制され、Z-VAD-FMKでは抑制されなかったことから、ML210による細胞死はフェロトシスによるものと考察された。

MUC1を標的とし制御することは、DTX耐性を有した前立腺癌細胞に対してDTX感受性を回復させ、MUC1依存性が高い状態においてferroptosisが誘導されやすく、MUC1は新規治療戦略の対象として期待された。

現在、フェロトシスと癌のバイオロジーについて大きな注目を集めており、High impact journalでの報告が相次いでいる。2012年に新規の細胞死の機序として報告され、xCT阻害によるフェロトシス誘導に加え、近年になり鉄代謝との関連、メバロン酸経路、脂肪酸代謝との連絡等が報告され、フェロトシスへの関心が非常に高いことが示唆される。また、MUC1は以前より、癌との関連について多くの知見が集積されており、研究代表者はこれまでに他癌においてMUC1やフェロトシスに関する基礎研究につき複数の論文を執筆している。現在、臨床において治療に苦慮している去勢抵抗性、抗癌剤耐性前立腺癌を対象として、MUC1制御およびフェロトシス誘導による新規治療法の構築に挑戦する本研究は、将来的に臨床応用の可能性が期待できる研究課題であると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

### 1. 2019年 第28回泌尿器分子・細胞研究会

去勢抵抗性前立腺癌における膜結合型ムチンタンパク1(MUC1)を標的とした新規治療戦略  
長谷川政徳 茂田啓介 菊地栄次 大家基嗣 宮嶋哲

### 2. 2018年 第34回前立腺シンポジウム

難治性前立腺癌におけるMUC1を中心とした分子ネットワーク制御による新規治療戦略  
長谷川政徳 小坂威雄 茂田啓介 宮嶋哲 大家基嗣

〔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。