

令和 元年 5 月 13 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16816

研究課題名(和文) 難治性前立腺癌に対するタキサン系抗癌剤とNF- κ B阻害剤を用いた新規治療戦略開発

研究課題名(英文) Development of new treatment strategy for castration-resistant prostate cancer using a novel nuclear factor kappaB inhibitor

研究代表者

平澤 陽介 (HIRASAWA, Yosuke)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：10725310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規NF- κ B阻害剤を使用して、去勢抵抗性前立腺癌細胞株DU145に対する殺細胞効果を確認し、同細胞株を用いたマウスの皮下腫瘍モデルにおいて、同薬剤による腫瘍増殖抑制効果を確認した。多くの癌腫で強力な転写活性を有し、癌の増殖に重要な働きがあることが示唆されていたFuse-Binding Protein (FBP)をトランスフェクション法でノックダウンすることで、前立腺癌増殖抑制効果を認めた。FBPとNF- κ Bが共に去勢抵抗性前立腺癌細胞においても治療標的になり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

去勢抵抗性前立腺癌の予後は不良で、主にアンドロゲン遮断療法が施行されるが、次第にアンドロゲン非依存性増殖能を獲得し、治療抵抗性を示すいわゆる去勢抵抗性前立腺癌となる。ドセタキセルなどタキサン系抗がん剤は有用性が示されているが、予後改善の寄与度はわずか3か月-6か月程度であり、骨髄抑制など有害事象も無視できず新規治療戦略の確立は急務である。今回我々は、FBPとNF- κ Bが共に去勢抵抗性前立腺癌細胞においても治療標的になり得ることを確認し、合成した新規NF- κ B阻害剤による新たな治療戦略の可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to evaluate the efficacy of the novel NF- κ B inhibitors for castration-resistant prostate cancer, and it showed significant cytotoxic effects on DU145 cells and also proliferation-inhibiting effect against DU145 cells in subcutaneous tumor bearing mouse. The knockdown of Fuse-Binding Protein (FBP) by transfection method, which is well known as one of significant proteins for proliferation of many kinds of cancer, caused the proliferation-inhibiting effect for prostate cancer. It was showed that both of FBP and NF- κ B can be a therapeutic target for prostate cancer.

研究分野：泌尿器腫瘍学、医学

キーワード：前立腺癌 去勢抵抗性前立腺癌 NF- κ B FBP

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

1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌の予後は不良で、その治療は重要な臨床的課題である。前立腺癌有転移症例においては、主にアンドロゲン遮断療法 (androgen deprivation therapy; ADT) が施行される。ADT は 8 割の症例で当初は奏効するものの、次第にアンドロゲン非依存性増殖能を獲得し、ADT に抵抗性を示す、いわゆる去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer; CRPC) となる。CRPC に対してドセタキセルなどタキサン系抗がん剤は有用性が示されているが、予後改善の寄与度はわずか 3 か月-6 か月程度であり、骨髄抑制など有害事象も無視できず新規治療戦略の確立は急務である。

2. 研究の目的

転写因子である NF- κ B が癌細胞で恒常的に発現しており、NF- κ B の活性が高まると、内皮細胞増殖因子 (VEGF) や IL-8、COX-2 などの腫瘍血管の新生に關与する蛋白質の産生が増加し、癌細胞の増殖や転移に關与する。さらに TNF- α や IL-6 等の炎症性サイトカインの産生も制御しており、炎症性免疫応答を介する癌の病態生理に深く關与していることが見出されてきた (Br J Cancer 652-7, 2012, Cancer research 107-110, 2003)。前立腺癌においても、ホルモン抵抗性を獲得した前立腺癌株である PC-3 と DU-145 においてより高い NF- κ B 活性を認め、ホルモン感受性の前立腺癌細胞株 LNCaP よりドセタキセルに対して抵抗性を示した (Clin Cancer Res 12, 2006)。さらに NF- κ B の阻害薬である PS-1145 をドセタキセルと併用することにより、細胞内の NF- κ B 活性は抑制され、IL-6 などの炎症性サイトカインの低下を認め、ドセタキセルの抗腫瘍効果を増強したと報告された (Clin Cancer Res 12, 2006)。カバジタキセルは同じタキサン系の新規抗がん剤であり、NF- κ B 阻害剤を併用することにより同様の抗腫瘍効果の増強作用が期待される。本研究は、カバジタキセルと NF- κ B 阻害剤との併用による難治性前立腺癌に対する抗腫瘍効果の機序を明らかにし、新規治療戦略の確立を目指す。

NF- κ B に關与する可能性のある上流因子として Fuse-Binding Protein (FBP) に着目した。c-myc 遺伝子の転写開始部位の 1.5kb も上流のわずか百数十 base の部位が c-myc 遺伝子の転写に極めて重要であることが示され、Far Upstream Element (FUSE) と名付けられ、FUSE に結合する蛋白質を調べたところ FBP が同定された。この FBP が多くの癌腫で強力な転写活性を有し、重要な働きがあることが示唆されていた。予後不良なホルモン不応性前立腺癌細胞株において、FBP が治療標的となるかを合わせて検討した。

3. 研究の方法

前立腺癌細胞株である DU145, PC3, LNCAP などを 96 well microplate に 10(4)個の細胞を播種し、24 時間 preincubation を行う。新規 NF- κ B 阻害剤 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ M を作用させ経時的に殺細胞効果を測定する。殺細胞効果は Alamar Blue を細胞培養液に加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、湿度 90% で 3 時間インキュベーションし、570nm および 600nm の吸光度を測定することにより施行した。また、既存の抗癌剤であるドセタキセルを使用して、新規 NF- κ B 阻害剤と併用して同様の invitro の実験を行い、相乗効果の有無を検証した。更には前立腺癌細胞株 DU145 の 10(6)個を BALB/c ヌードマウス(6 週雄)の背部皮下に移植し、皮下腫瘍モデルを作成した。作成したマウスをコントロール群 (生理食塩水)、薬剤投与群 (4mg/kg)、薬剤投与群 (8mg/kg) の 3 群に分け、腫瘍を認めた時点で薬剤の腹腔内投与を連日行った。3 回/週で経時的に腫瘍径や体重を測定した。

NF- κ B に關与する可能性のある上流因子として Fuse-Binding Protein (FBP) に着目した。前

膵臓癌細胞株 DU145 における FBP の発現を siRNA 法により抑制させ、コントロール群と比較して、細胞形態の変化や、細胞増殖能の変化を測定した。また、siRNA 法により FBP がノックダウンされているかを Western blot 法にて確認した。新規 NF- κ B 阻害剤により、FBP がノックダウンされていることを同様に Western blot 法により確認した。

4. 研究成果

新規 NF- κ B 阻害剤を *in vitro* にて濃度 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ M で 48 時間、ホルモン不応性前立腺細胞株である PC3 と DU145 に作用させたところ、濃度依存性に細胞障害作用を認めた(図 1-A)。さらに同薬物 50 μ M の濃度で同細胞株に作用させたところ、経時的にも細胞障害作用を認めた(図 1-B)。さらに既存の抗癌剤であるドセタキセルを併用することにより、生存率の有意な低下を認め、相乗効果を確認し得た(図 2)。

図 1-A

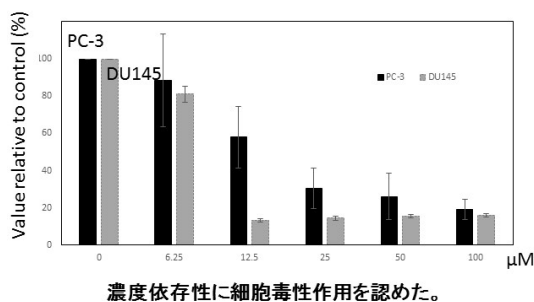


図 1-B

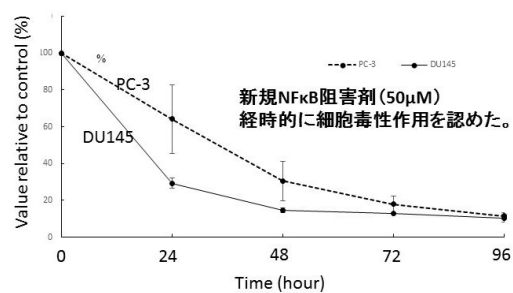
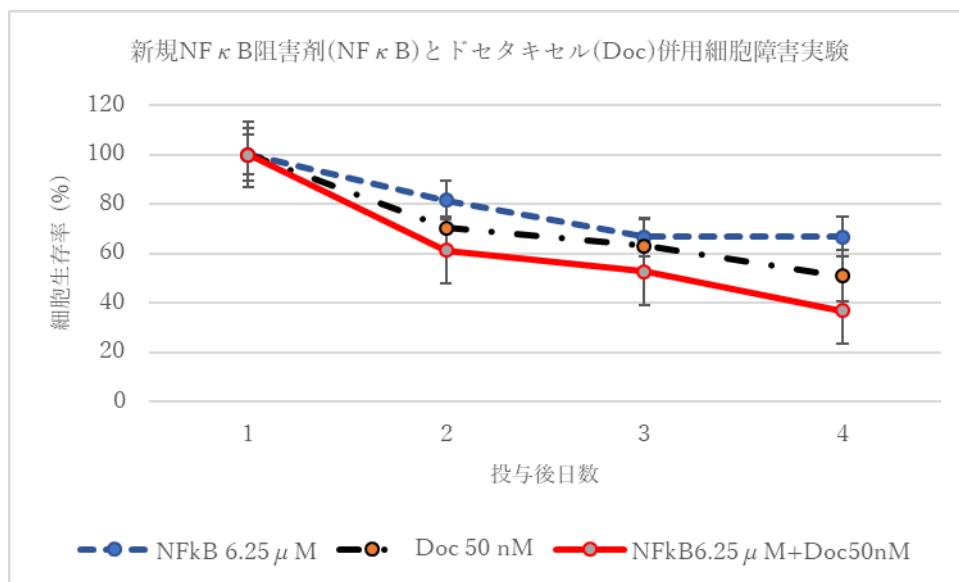
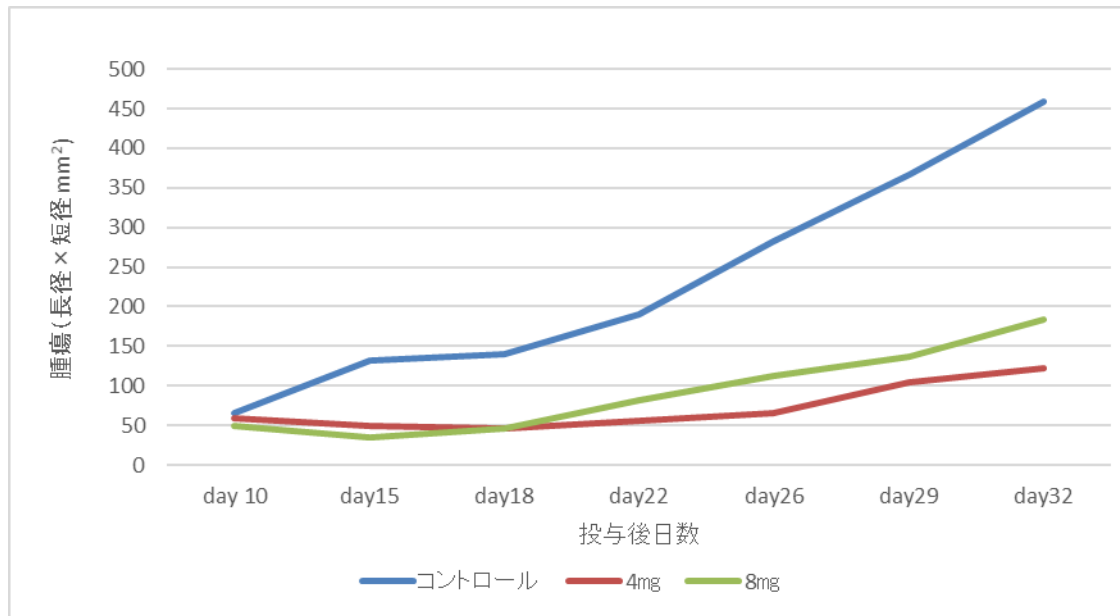


図 2



前立腺癌細胞株 DU145 の 10(6)個を BALB/c ヌードマウス(6 週雄)の背部皮下に移植し、皮下腫瘍モデルを作成し、作成したマウスをコントロール群(生理食塩水)、薬剤投与群(4mg/kg)、薬剤投与群(8mg/kg)の 3 群に分けて *in vivo* の実験を行ったところ、day32 にて腫瘍径は各々 460mm², 122mm², 181mm² となり、新規 NF- κ B 阻害剤による腫瘍の有意な発育抑制効果を認めた(図 3)。しかし、薬剤 8mg/kg による同 4mg/kg と比して用量増加による有意な増殖抑制効果は認めなかった。

図 3



NF B に関与する可能性のある上流因子として FBP に着目し、siRNA を用いてトランスフェクション法にてノックダウンし、細胞形態の変化を確認した。FBP には FBP1 と FBP2 があり、さらに FBP2 には FBP2-1, FBP2-2, FBP2-3 のタンパク結合部位が存在する。今回は siRNA 法によりこの FBP2-1, FBP2-2, FBP2-3 のノックダウンを行い、Western blotting 法にて発現抑制を確認した(図 4)。いずれも細胞形態の変化を認めたが、FBP2-3 でより顕著であった(図 5A, B, C, D)。Alamar blue assay 法により、各々の発現のノックダウンによりいずれも DU145 前立腺癌細胞障害作用を認めたが、FBP2-3 のノックダウンで細胞障害作用は最も大きかった。

今回の実験系統により、前立腺癌細胞株に対する NF B 阻害剤による抗がん作用を見出すことに成功した。さらに FBP が前立腺癌の細胞増殖に重要な働きがある可能性が示され、FBP-NF

B pathway の存在を確認する実験、ならびに FBP-NF B pathway の制御による新規治療戦略の確立を引き続き in-vitro, in-vivo で継続中である。

図 4

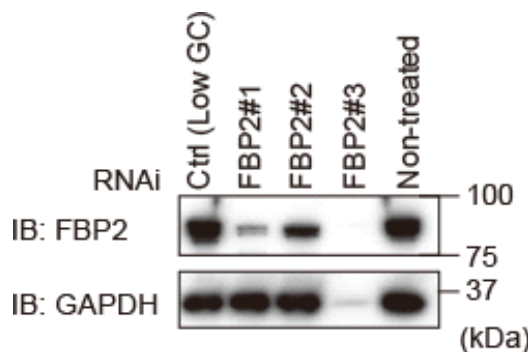


図 5-A DU145 コントロール群

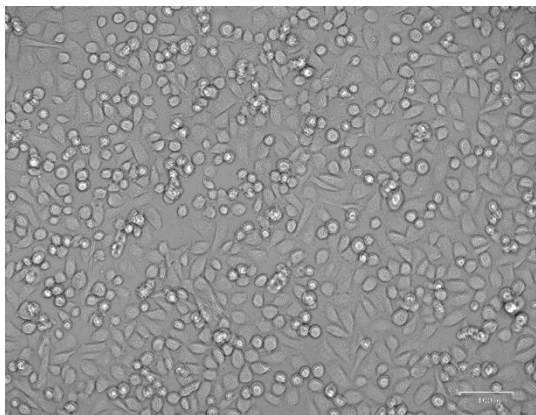


図 5-B DU145 FBP2-1 をノックダウン

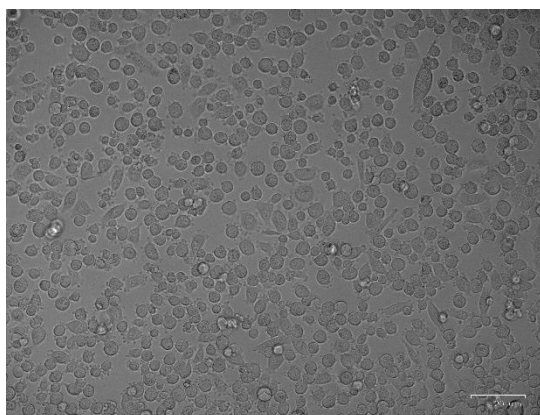


図 5-C DU145 FBP2-2 をノックダウン

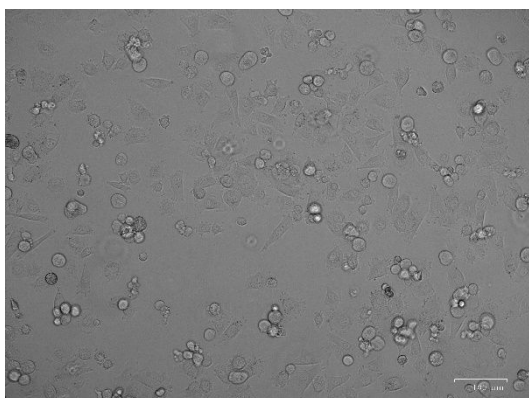
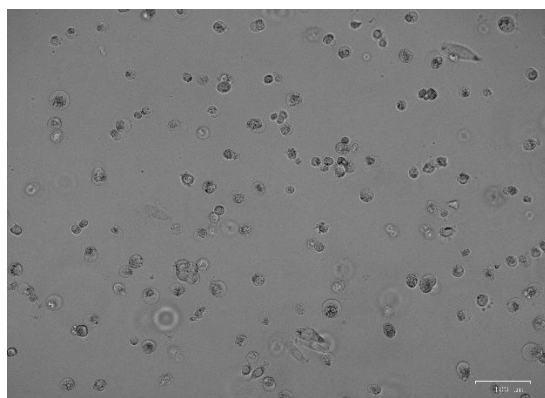


図 5-D DU145 FBP2-3 をノックダウン



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) Kamoda Naohiro, Ohori Makoto, Hirasawa Yosuke, Inoue Rie, Hashimoto Takeshi, Satake Naoya, Gondo Tatsuo, Nakagami Yoshihiro, Nagao Toshitaka, Ohno Yoshio: Prognostic significance of the presence of tertiary Gleason grade 5 in robot-assisted radical prostatectomy specimens in Japanese patients with clinically localized prostate cancer. Japanese Journal of Clinical Oncology 2019:49 276-280 DOI:10.1093/jjco/hyy194 (査読有り)
- (2) Mima Takashi, Ohori Makoto, Hirasawa Yosuke, Mikami Ryuji, Arai Ayako, Hashimoto Takeshi, Satake Naoya, Gondo Tatsuo, Nakagami Yoshihiro, Namiki Kazunori, Tokuyue Koichi, Ohno Yoshio: Salvage radiation therapy for prostate cancer patients after prostatectomy. Japanese Journal of Clinical Oncology 2019:49 281-286 DOI: 10.1093/jjco/hyy195 (査読有り)
- (3) Hashimoto Takeshi, Ohori Makoto, Shimodaira Kenji, Kaburaki Naoto, Hirasawa Yosuke, Satake Naoya, Gondo Tatsuo, Nakagami Yoshihiro, Namiki Kazunori, Ohno Yoshio: Prostate-specific antigen screening impacts on biochemical recurrence in patients with clinically localized prostate cancer. International Journal of Urology 2018:25 561-567 DOI: 10.1111/iju.13563 (査読有り)
- (4) Hashimoto Takeshi, Yoshioka Kunihiro, Gondo Tatsuo, Hasama Kazuki, Hirasawa Yosuke, Nakashima Jun, Tachibana Masaaki, Ohno Yoshio: The Impact of Lateral Bladder Neck Preservation on Urinary Continence Recovery After Robot-Assisted Radical Prostatectomy. Journal of Endourology 2018:32 40-45 DOI: 10.1089/end.2017.0459 (査読有り)

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) Ashita Ono, Yosuke Hirasawa, Syuya Matsubara, et al. NCCN favourable intermediate-risk prostate cancer patients: Do all of them have a good prognosis?

第 34 回 欧州泌尿器科学会（国際学会）2019 年

- (2) 小野 朝、平澤 陽介、松原 修也、徳山 尚斗、橋本 剛、佐竹 直哉、権藤 立男、中神 義弘、並木 一典、中島 淳、大野 芳正：NCCN 予後中間リスク群は全て予後良好か？ 第 107 回 日本泌尿器科学会 2019 年
- (3) Naoto Kaburaki, Yosuke Hirasawa, Taiyo Harada, et al. DEVELOPING A NEW PI-RADS V2-BASED PREOPERATIVE NOMOGRAM FOR PREDICTING THE PROBABILITY OF BIOCHEMICAL RECURRENCE AFTER ROBOT-ASSISTED RADICAL PROSTATECTOMY 第 113 回 米国泌尿器科学会（国際学会）2018 年
- (4) Yosuke Hirasawa, Yuri Ishizawa, Tatsuo Gondo, et al. Integration of neutrophil-to-lymphocyte ratio into the MD Anderson Cancer Center preoperative risk classification of patients with bladder cancer who underwent radical cystectomy. 第 33 回 欧州泌尿器科学会（国際学会）2018 年

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。