

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16716

研究課題名（和文）ヘッジホグ経路を介した去勢抵抗性前立腺癌メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of castration-resistant prostate cancer mechanism via hedgehog pathway

研究代表者

伊夫貴 直和（Ibuki, Naokazu）

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：90368100

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：去勢抵抗性前立腺癌に対する薬物療法は近年新薬の登場により発展を遂げている。しかし、その薬剤も最終的には効果がなくなり新しい薬剤の登場が期待されている。今回の我々の研究では、去勢抵抗性前立腺癌に対する薬物療法の一つであるEnzalutamide抵抗性にHedgehog経路が関与している可能性が示唆され、また去勢抵抗性前立腺癌に対する新薬の開発につながるものと考えられた。

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メカニズムおよび去勢抵抗性前立腺癌に対する薬物療法（Enzalutamide）抵抗性のメカニズムを検討するため、癌細胞を用いてHedgehog経路が関与しているかどうかの実験を行った。結果、Hedgehog経路を抑制することで去勢抵抗性前立腺癌およびEnzalutamide抵抗性前立腺癌に対して治療効果が発揮されることを確認した。今後の新薬開発につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Pharmacotherapy for castration-resistant prostate cancer has been developing in recent years with the advent of new drugs. However, the drug will eventually become ineffective and new drugs are expected to appear.

Our study suggests that the Hedgehog pathway may be involved in Enzalutamide resistance, one of the drug therapies for castration-resistant prostate cancer, and will lead to the development of new drugs for castration-resistant prostate cancer. It was considered.

研究分野：前立腺癌

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 Enzalutamide Hedgehog

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)のメカニズムには、アンドロゲンレセプターを介した経路および他の成長因子の関与が考えられている。ヘッジホグ経路と前立腺癌の関連については報告が散見されるが、そのメカニズムに関しては、腫瘍自身の (autocrine) によるものか、他の間質細胞 (腫瘍微小環境) が関与している (paracrine) か明確には解明されていない。我々は、ヘッジホグ経路が CRPC への進展に関与し、そのメカニズムは paracrine model で、ヘッジホグ経路の抑制が CRPC への進行を遅らせることを報告している。我々は CRPC 発症、および、アンドロゲン標的薬抵抗性の獲得メカニズムを解明することにより新規治療開発を目標として研究を開始した。

### 2. 研究の目的

我々は、前立腺癌における Hedgehog 経路の働きに注目しそのメカニズムについての研究を行った。まず、前立腺癌組織での Shh および Dhh の発現量を検討した。結果、Shh は未治療前立腺癌組織に比べ内分泌療法を施行した前立腺癌組織で発現量が増加する傾向があり、去勢抵抗性前立腺癌組織では有意に発現量が増加していた。また、Shh は Androgen receptor (AR) の活性に関与しており前立腺癌の癌細胞の性質の変化に関与していると考えられた。

in vitro では、ホルモン感受性前立腺癌細胞株 (LNCaP) にヘッジホグ経路阻害剤 (Smo-inhibitor : TAK441) を投与しても細胞増殖の抑制効果は認めなかった。しかし、in vivo ではヌードマウスに LNCaP を皮下移植し TAK441 の経口投与を行ったところ対照群に比べ著明な腫瘍縮小効果、PSA 値の下降を認めた。

次に取り出した腫瘍組織から RNA を抽出し、ヒトおよびマウスの probe を用いてヘッジホグ経路の下流である Gli1、Gli2 および Ptch1 の発現量を RT-PCR で検討したところ対照群に比べヒトの probe では対照群および治療群では差は認めなかった。しかし、マウスの probe では対照群に比べ治療群で有意に Gli1、Gli2 および Ptch1 の発現量は低下していた。つまり、腫瘍自体への影響 (autocrine) ではなく腫瘍間質を介した経路 (paracrine) での治療効果が発現していたことが明らかとなった。(Ibuki et.al Int J Cancer 2013)

今回、我々は同様の手法を用いて去勢抵抗性および Enzalutamide 抵抗性前立腺癌におけるヘッジホグ経路の働きおよびヘッジホグ経路を抑制することによる治療効果を確認し、その治療効果が autocrine もしくは paracrine のいずれのメカニズムであるかの解明を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) Enzalutamide 抵抗性前立腺癌細胞株の作成

Enzalutamide 抵抗性前立腺癌細胞株を作成するため 6~8 週の male athymic nude mice に  $1 \times 10^6$  個の LNCaP を皮下移植する。その後、週に 1 度の PSA 採血を行い PSA 値が 50mg/ml を超えた段階で去勢を行い、腫瘍が再度増殖し PSA 値が上昇した段階 (去勢抵抗性) で、Enzalutamide (10mg/Kg, PO) を投与する。一旦、腫瘍増殖が抑制されたのち再増殖してくる腫瘍を、再度別の mouse に皮下移植し同様の治療を繰り返す。この過程を計 3 回繰り返し最終的に増殖した腫瘍を摘出し Enzalutamide 抵抗性前立腺癌細胞株を作成する。

#### (2) in vitro での去勢抵抗性前立腺癌および Enzalutamide 抵抗性前立腺癌におけるヘッジホグ経路の影響の検討

去勢抵抗性前立腺癌細胞株 (PC3、Du145) および Enzalutamide 抵抗性前立腺癌細胞株におけるヘッジホグのリガンド (Shh および Dhh) の発現量を検討する。

各細胞株は、RPMI1640 に 10% FBS、1% penicillin/streptomycin (Life Technologies 社) を添加した培養 medium を用い、 $37^{\circ}\text{C}$ ・5%CO<sub>2</sub> インキュベーターを使用する。各細胞から蛋白を抽出し、rabbit monoclonal primary antibodies targeting Shh (Abcam)、および rabbit polyclonal Dhh and Ihh (Santa Cruz Biotechnology) の抗体を用いて Western blotting を行う。

PC3、DU145 および Enzalutamide 抵抗性前立腺癌細胞株を単独および前立腺間質細胞 (PrEC (Lonza)) と共培養し細胞増殖を、MTT cell growth assay kit (Millipore 社) を用い測定する。次に、各細胞に対してヘッジホグ経路阻害剤 (TAK441:smo inhibitor、Cyclopamine) をそれぞれ TAK441 は 5nM、Cyclopamine は 10 $\mu\text{M}$  投与し、腫瘍単独および PrEC との共培養 (直接細胞同士を混合する場合と Transwell plate を用いて細胞間の接着を無くす場合とそれぞれで行う) での腫瘍増殖抑制効果を MTT cell growth assay kit (Millipore 社) を用い測定する。

また、ヘッジホグ経路の下流である Gli1、Gli2、および Ptch1 が抑制されているかを anti-Gli1 and anti-Gli2 rabbit polyclonal Ab (Cell Signaling)、anti-Ptch1 rabbit polyclonal Ab (Abcam) を用いて Western blotting を行う。アポトーシス誘導の有無についても、アポトーシス細胞を APO Percentage™ apoptosis assay kit (Biocolor Ltd) を用いて染色し、BioZero BZ-8000 で観察する。

in vivo におけるヘッジホグ経路阻害による治療効果の確認およびメカニズムの解析

6 ~8 週の male athymic nude mice の側腹部に、2%イソフルレン吸入麻酔下で、 $1 \times 10^6$  個の PC3、DU145 および Enzalutamide 抵抗性前立腺癌細胞株を皮下移植する。腫瘍の体積が、 $100\text{mm}^3$  に到達した段階で 1 日 1 回の  $10\text{mg/kg}$  の TAK-441 および vehicle の経口投与を行う。Enzalutamide 抵抗性前立腺癌細胞株を皮下移植した mice では、治療と同時に castration を行う。腫瘍体積は、 $\text{length} \times \text{width} \times \text{depth} \times 0.5236(\text{mm}^3)$  で算出し、週 2 回の腫瘍体積の計測を行う。最終治療効果判定時には、腫瘍を摘出し組織学的診断を行う。摘出した腫瘍組織は、増殖系マーカーの Ki67 を免疫染色で検討する。

また、腫瘍より RNA を抽出し、human (腫瘍 autocrine) および mouse (間質 paracrine) の probe ( human Gli1 (Hs00171790\_m1), mouse Gli1 (Mm00494645\_m1), human Gli2 (Hs01119974\_m1), mouse Gli2 (Mm01293111\_m1), human Ptch1 (Hs00181117\_m1) and mouse Ptch1 (Mm00436026\_m1) ) を用いて qPCR を行い、ヘッジホグ経路の下流である Gli1、Gli2、Ptch1 についてどちらが抑制されているかを確認する。

#### 4. 研究成果

##### (1 年目)

(1) 去勢抵抗性前立腺癌細胞株 (PC3、DU145) における Hedgehog 経路の Ligand (Shh、Dhh および Ihh) の発現について、各細胞から蛋白を抽出し rabbit monoclonal primary antibodies targeting Shh (Abcam), および rabbit polyclonal Dhh and Ihh (Santa Cruz Biotechnology) の抗体を用いて Western blotting を行った。結果、PC3 においても DU145 においても Ligand の発現量は正常前立腺細胞に比べて亢進していた

(2) 去勢抵抗性前立腺癌細胞株 (PC3、DU145) を単独で培養し、そこにヘッジホグ経路阻害剤 (TAK441:smo inhibitor、Cyclopamine) をそれぞれ TAK441 は  $5\text{nM}$ 、Cyclopamine は  $10\ \mu\text{M}$  投与し、MTT cell growth assay kit (Millipore 社) を用い細胞増殖抑制効果を確認した。いずれの細胞においても単独の培養条件では両薬剤いずれも腫瘍細胞の増殖抑制効果を認めなかった。また、両薬剤投与後のそれぞれの細胞において蛋白レベルでのヘッジホグ経路の下流である Gli1、Gli2、および Ptch1 が抑制されているかを anti-Gli1 and anti-Gli2 rabbit polyclonal Ab (Cell Signaling)、anti-Ptch1 rabbit polyclonal Ab (Abcam) を用いて Western blotting を行ったが、下流の経路も抑制されていなかった。

今回の研究で判明したことは、去勢抵抗性前立腺癌においてもホルモン感受性前立腺癌同様に、Hedgehog 経路は腫瘍自身において直接作用 (autocrine) していないことが判明した。

##### (2 年目)

昨年度までの実験系で、in vitro における単培養での去勢抵抗性前立腺癌細胞株での Hedgehog 経路の Ligand (Shh、Dhh および Ihh) の発現が亢進していることを確認した。

また、単培養では去勢抵抗性前立腺癌細胞株に対して Hedgehog 経路阻害剤を投与しても直接抗腫瘍効果を認めないことを確認している。

次年度では、in vivo での抗腫瘍効果を確認するため Enzalutamide 抵抗性前立腺癌細胞皮下移植モデル (去勢抵抗性前立腺癌細胞株 (PC3、DU145) および Enzalutamide 抵抗性前立腺癌細胞皮下移植モデル) に対する Hedgehog 経路阻害剤 (TAK-441、Cyclopamine) の抗腫瘍効果を確認した。

まず、Enzalutamide 抵抗性前立腺癌細胞株を皮下移植し去勢を行ったモデルに対して Hedgehog 経路阻害剤を投与した。腫瘍の体積が、 $100\text{mm}^3$  に到達した段階で 1 日 1 回の  $10\text{mg/kg}$  の TAK-441 および vehicle の経口投与を行う。腫瘍体積は、 $\text{length} \times \text{width} \times \text{depth} \times 0.5236(\text{mm}^3)$  で算出し、週 2 回の腫瘍体積の計測を行う。本モデルでは、vehicle 群では腫瘍は増殖を続けたが、TAK-441 を投与したモデルでは腫瘍増殖が抑制された。つまり、in vivo のモデルでは Enzalutamide 抵抗性前立腺癌皮下移植モデルにおいて Hedgehog 経路阻害剤は治療効果を認めた。

今後、採取した腫瘍より RNA を抽出し、ヘッジホグ経路の下流である Gli1、Gli2、Ptch1 が抑制されているかを確認する。

##### (3 年目)

Enzalutamide 抵抗性前立腺癌細胞株を皮下移植し去勢を行ったモデルに対して Hedgehog 経路阻害剤を投与した結果、vehicle 群では腫瘍は増殖を続けたが、TAK 441 を投与したモデルでは腫瘍増殖が抑制された。つまり、in vivo のモデルでは Enzalutamide 抵抗性前立腺癌皮下移植モデルにおいて Hedgehog 経路阻害剤は治療効果を認めた。

採取した腫瘍においてヘッジホグ経路の下流である Gli1、Gli2、Ptch1 が抑制されているかを確認するため、腫瘍より RNA を抽出し、qPCR において Probe を、human

(腫瘍 autocrine) および mouse (間質 paracrine) のものの 2 種類で調べることによって、メカニズムの検討を行った。その結果、対照群に比べヒトの probe では対照群および治療群では差は認めなかった。しかし、マウスの probe では対照群に比べ治療群で有意に Gli1、Gli2 および Ptch1 の発現量は低下していた。

つまり、腫瘍自体への影響 (autocrine) ではなく腫瘍間質を介した経路 (paracrine) での治療効果が発現していたことが明らかとなった。

今後は、他の去勢抵抗性前立腺癌細胞株（PC3、Du145）における同様の治療効果を確認する必要があるため、今後同細胞の皮下移植モデルを用いて、Hedgehog 経路阻害剤の抗腫瘍効果を確認する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Komura K, Fujiwara Y, Uchimoto T, Saito K, Tanda N, Matsunaga T, Ichihashi A, Tsutsumi T, Tsujino T, Yoshikawa Y, Nishimoto Y, Takai T, Minami K, Taniguchi K, Tanaka T, Uehara H, Hirano H, Nomi H, Ibuki N, Takahara K, Inamoto T, Azuma H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Comparison of Radiographic Progression-Free Survival and PSA Response on Sequential Treatment Using Abiraterone and Enzalutamide for Newly Diagnosed Castration-Resistant Prostate Cancer: A Propensity Score Matched Analysis from Multicenter Cohort.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Clin. Med.	6. 最初と最後の頁 1251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm8081251.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Komura K, Hashimoto T, Tsujino T, Muraoka R, Tsutsumi T, Satake N, Matsunaga T, Yoshikawa Y, Takai T, Minami K, Taniguchi K, Uehara H, Tanaka T, Hirano H, Nomi H, Ibuki N, Takahara K, Inamoto T, Ohno Y, Azuma H.	4. 巻 26
2. 論文標題 The CANLPH Score, an Integrative Model of Systemic Inflammation and Nutrition Status (SINS), Predicts Clinical Outcomes After Surgery in Renal Cell Carcinoma: Data From a Multicenter Cohort in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 2994-3004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-019-07530-5. Epub 2019 Jun 25.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inamoto T, Uehara H, Akao Y, Ibuki N, Komura K, Takahara K, Takai T, Uchimoto T, Saito K, Yoshikawa Y, Minami K, Hirano H, Nomi H, Kato R, Hayashi T, Azuma H.	4. 巻 2018
2. 論文標題 A Panel of MicroRNA Signature as a Tool for Predicting Survival of Patients with Urothelial Carcinoma of the Bladder.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Disease Markers	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/5468672. eCollection 2018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Komura K, Yoshikawa Y, Shimamura T, Chakraborty G, Gerke TA, Hinohara K, Chadalavada K, Jeong SH, Armenia J, Du SY, Mazzu YZ, Taniguchi K, Ibuki N, Meyer CA, Nanjangud GJ, Inamoto T, Lee GM, Mucci LA, Azuma H, Sweeney CJ, Kantoff PW.	4. 巻 128
2. 論文標題 Inhibition controls aggressive prostate tumors deficient in Y-linked histone demethylase KDM5D.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 2979-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI96769. Epub 2018 Jun 4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ibuki N, Inamoto T, Ichihashi A, Uehara H, Komura K, Hirano H, Nomi H, Azma H.
2. 発表標題 Treatment outcome of dose reduction of enzalutamide against CRPC?
3. 学会等名 AUA 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊夫貴 直和、稲元輝生、内本泰三、辻野拓也、南 幸一郎、光野絢子、高木 志寿子、木下将宏、徳永雄希、土井 由紀子、中森啓太、木山 賢、東 治人。
2. 発表標題 プラチナ抵抗性尿路上皮癌に対するPembrolizumabの治療効果予測因子の検討
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊夫貴 直和、稲元輝生、小村和正、上原博史、平野 一、能見勇人、東 治人。
2. 発表標題 当施設における腎細胞癌に対するpresurgical therapyの臨床的検討
3. 学会等名 日本泌尿器腫瘍学会 第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊夫貴 直和、稲元輝生、西本優大、内本泰三、光野絢子、藤川正弘、土井 亘、宮下 由紀恵、木村亮輔、小山耕平、木山 賢、和辻利和、東 治人.
2. 発表標題 ハイリスクホルモン感受性転移性前立腺癌に対するAbiraterone acetateとPrednisolone併用療法の治療効果
3. 学会等名 第69回日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原博史、平野 一、岡部知太、木村孝平、寺本昌司、高倉一平、西村一希、木下将宏、徳永雄希、中森啓太、市橋 淳、谷口俊理、小林大介、堤 岳之、小村和正、伊夫貴 直和、稲元輝生、能見勇人、東 治人.
2. 発表標題 生体腎移植前のドナー検査において腫瘍性病変が指摘され、根治的治療が可能であった3症例
3. 学会等名 第53回日本臨床腎移植学会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------