

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09740

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺がんのアンドロゲン受容体転写協調因子を標的としたポリアミド創薬

研究課題名(英文) Discovery of PI polyamide targeting androgen receptor collaborative transcriptional factor in castration-resistant prostate cancer

研究代表者

高橋 悟 (TAKAHASHI, Satoru)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：50197141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：進行性前立腺がんの治療抵抗性に関与するアンドロゲン受容体協調転写因子を標的とした中分子化合物ピロール・イミダゾールポリアミド(PIP)にアルキル化剤の化学修飾を行う事でより殺細胞効果を高めた改良PIPを開発し、新規前立腺がん治療薬として臨床応用に向けた検討を行った。まず、前立腺癌を含めた複数の癌腫でその増殖抑制効果を検討したところ、前立腺癌に特異的な効果を認めた。続いて、マイクロアレイによるメカニズム解析を行い、さらにヌードマウスを用いたin-vivoにおける去勢抵抗性前立腺癌細胞株の増殖抑制効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行した前立腺癌の初期治療は男性ホルモンを抑制する去勢療法が有効である。しかし、その治療過程で、去勢抵抗性前立腺癌に形質転換することが知られている。去勢抵抗性前立腺癌ではアンドロゲン受容体シグナル経路は低アンドロゲン濃度にもかかわらずアンドロゲン受容体自体を変異させることにより異常活性化している。従来のアンドロゲン抑制療法で用いられる薬剤はアンドロゲン合成あるいはARを対象とし、アンドロゲン受容体の変異により治療抵抗性を示していたのに対し、本化合物はホルモン受容体協調因子を標的とする点に革新性を有する。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel pyrrole imidazole polyamide (PIP) with stronger cytotoxic effect by chemical modification of alkylating agents targeting androgen receptor collaborating transcription factor. In this study, we investigated its clinical application as a novel therapeutic agent for prostate cancer. First, we examined its growth inhibitory effect on several cancer cell-lines, including prostate cancer, and found that it had a specific effect on prostate cancer. We then analyzed the mechanism using microarrays, and further confirmed the growth inhibitory effect on castration-resistant prostate cancer cell lines in-vivo using nude mice.

研究分野：泌尿器科

キーワード：前立腺癌 ピロールイミダゾールポリアミド アルキル化剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺がんの増殖・進展は主に男性ホルモン並びにアンドロゲン受容体(AR)、それに続く AR シグナル経路により制御されている。そのため去勢術あるいは男性ホルモンを抑制する内分泌療法は、前立腺がんに対する有効な治療の一つであるが、多くの症例で耐性が生じ、去勢抵抗性前立腺がん(Castration resistant prostate cancer; CRPC)と呼ばれる難治性がんへと移行する。CRPC では低アンドロゲン環境下でも AR やアンドロゲン代謝経路を変異・活性化させることで、AR シグナル経路を介した増殖が維持されることが、これまでの研究で明らかにされている。これに対して、より強力にアンドロゲンや AR を抑制する新規治療薬が登場したが、奏功期間が数か月と短いことなどの課題が多い。一方 AR を標的としない薬剤すなわちタキサン系抗がん剤は CRPC 症例の 50%以上で有効だが、同様に奏功期間が十分でなく、骨髄抑制等の重篤な副作用のために高齢者に多い前立腺がんには限界がある。以上の背景から、CRPC 新規治療薬剤は去勢抵抗性機構を標的として、優れた長期有効性を有し高齢患者にも安全性が高いものが望まれる。

近年、AR シグナル経路において、AR の活性を調節する転写協調因子群の働きが注目されている。前立腺がんの進行に伴い AR を調節する転写因子群が大きく変化すること、さらに従来 AR 転写協調因子と見なされていなかったがん遺伝子 MYC が CRPC においてのみ AR 転写協調因子として作用することが以前より知られている(Sharma et al. Cancer Cell, 2013)。

我々も同様に転写協調因子 Oct1 ならびに転写因子 COBLL1 が AR の活性を促進し、前立腺がんの進行と治療抵抗性に関与していることを見出した(Obinata et al. Oncogene 2016, Takayama et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2018)。したがって、アンドロゲンや AR 自体ではなく治療抵抗性獲得に重要な AR シグナル経路をピンポイントで阻害することで、有効かつ安全な新規 CRPC 治療薬が開発出来る可能性が示唆される。その有望な候補化合物として、配列特異的に DNA に結合する性質を持つピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)分子に、我々は着目している。PIP は芳香族アミノ酸 N-methylpyrrole(Py) および N-methylimidazole(Im) で構成される中分子化合物であり、DNA に配列特異的に結合する性質を持つ。Im/Py ペアは G・C を、Py/Py ペアは T・A および A・T を認識し、Im/Py と Py/Py の組み合わせ次第で、多様な配列の DNA に結合させることが出来る。

PIP は二本鎖 DNA に配列特異的に結合する性質を持ち、遺伝子プロモーター上の転写因子結合配列を認識するように設計すると、転写因子が結合できないため転写を抑制出来る。さらにこれまでアルキル化剤、ヒストンアセチル化酵素ならびにヒストン脱アセチル化酵素を制御する化合物との PI ポリアミドコンジュゲートが報告されている(Morita et al. J Clin Invest 2017)。これらのうち、アルキル化剤は DNA および細胞内タンパクに結合し、陽性電荷中間体を生成することで核酸の陰性部分をアルキル化し、DNA 本鎖間の架橋構造を形成し DNA 複製および RNA への転写を阻害し、アポトーシスを誘導する抗がん剤である。がん治療に広く適用されているが、前立腺がんには一般的に用いられてはいない。これらの化合物の多くは DNA 配列と非特異的に相互作用することから、深刻な副作用を引き起こす。このアルキル化剤と特定の DNA 配列を認識する PI ポリアミドを結合させることで、腫瘍特異的な変異配列だけを変性させ、腫瘍細胞のみを特異的に殺傷できる副作用の少ない薬剤の開発が可能となると考えられる。

2. 研究の目的

我々は OCT1 が AR 応答遺伝子 ACSL3 の発現を誘導し、この ACSL3 がアンドロゲン合成を促進させ CRPC の増殖に重要な役割を担っていることを明らかにし、これを特異的に抑制する化合物 PI ポリアミド(OCT1-PIP)を開発し、有意な前立腺がん細胞増殖抑制効果を報告している (Obinata et al. Oncogene 2016)。本研究は OCT1-PIP の腫瘍増殖抑制効果をより高めるために DNA アルキル化剤 X を修飾した化合物(OCT1-PIP-Ax)を開発し、複数のがん細胞株への影響を分子生物学的に解析した。

3. 研究の方法

(1) 細胞と細胞培地、材料

用いた細胞株は AR 陽性ホルモン感受性前立腺がん細胞株 LNCaP、AR 陽性去勢抵抗性前立腺がん細胞株 22Rv1、膵がん細胞株 BxPC3、大腸がん細胞株 HCT116、乳腺上皮細胞 MCF-10A である。

(2) PI ポリアミドの合成

OCT1 の結合配列を認識する PI ポリアミド(OCT1-PIP)にアルキル化剤(Ax)を結合した分子(OCT1-PIP-Ax)を設計し合成した。合成はペプチド合成装置 PSSM-8(島津、京都、日本)を用いて、Fluorenyl-Methoxy-Carbonyl(Fmoc)合成法により固相合成し、High Performance liquid Chromatography(HPLC)によって精製して使用した。

(3)細胞増殖能の評価

がん細胞の生存、増殖能に与える影響を WST8 assay にて解析した。各細胞に対し、指定された濃度の OCT1-PIP-Ax、コントロールである Ax、OCT1-PIP を投与し生細胞数を定量化した。さらに 50%の増殖阻害効果を発揮するための薬剤濃度 inhibitory concentration 50 (IC50) を計算し細胞間で比較した。

(4) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)
22Rv1 に OCT1-PIP-Ax、DMSO を投与し、24 時間培養後、細胞より RNA を抽出し、逆転写反応後 cDNA 合成を行った。それらの cDNA を用いて qRT-PCR を行い、ACSL3 の発現レベルを分析した。

(5) マイクロアレイ解析
続いて 22Rv1 細胞に IC50 濃度の OCT1-PIP-Ax、コントロールとして同用量の DMSO を投与し、24 時間後 RNA を抽出しマイクロアレイを行った。DMSO と比較して 1.5 倍以上の発現変動のある遺伝子群を抽出し metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) によるエンリッチメント解析を行った。

(6) Xenograft モデルを用いた腫瘍細胞増殖抑制効果の検討
22RV1 細胞を、ヌードマウスに接種させ、OCT1-PIP-Ax またはコントロールとして DMSO を腹腔内投与し腫瘍の大きさ、体重を投与後 4 週間後まで毎週測定した。その後、動物を解剖して腫瘍組織を回収した。ホルマリン固定した組織をパラフィン包埋した後、切片を作成し、HE 染色および ACSL3、Ki67 および Cleaved caspase 3 抗体を用いた免疫組織染色を行った。腫瘍のサイズや組織学的変化を評価した。

4. 研究成果

(1) OCT1-PIP-Ax による細胞増殖抑制効果の検討
WST8 を用いた細胞増殖アッセイを行い、50%阻害濃度 (IC50) を求めた。OCT1-PIP-Ax は前立腺由来細胞株 (LNCaP, 22Rv1) に対して他の薬剤と比べ高い感受性を呈していた。この中で 22Rv1 における OCT1-PIP-Ax が最も IC50 が低値であった。

(2) OCT1-PIP-Ax の ACSL3 発現量に対する効果
cDNA を用いて qRT-PCR を行い、22Rv1 細胞における ACSL3 の mRNA 発現量を比較検討した。DMSO を対照として検討したところ OCT1-PIP-Ax で ACSL3 の発現が有意に抑制されていた。

(3) 前立腺がん細胞に対する OCT1-PIP-Ax の分子生物学的検討
OCT1-PIP-Ax の前立腺がん細胞に与える分子生物学的検討として IC50 濃度の OCT1-PIP-Ax で 24 時間投与した 22Rv1 細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った。有意な変動を認めている遺伝子のうち、抑制系に働いている遺伝子に対してパスウェイ解析を行ったところ DNA 二本鎖切断修復機構に関与する遺伝子群が最も多く抑制されていた。これら遺伝子群のなかでマイクロアレイ上発現変動が大きかった遺伝子を複数抽出し、対照群である DMSO で処理した検体と比較し mRNA レベルでの発現量減少を確認した。

(4) Xenograft モデルにおける OCT1-PIP-Ax の腫瘍細胞増殖抑制効果の検討
OCT1-PIP-Ax を投与したマウスでは、DMSO に比較し有意に腫瘍増殖が抑制されていた。またこの期間に著しい体重減少など、薬剤投与による明らかな有害事象を認めたマウスはいなかった。腫瘍組織より病理切片を作成し、HE 染色と Ki-67、Cleaved caspase 3 の抗体を用いて免疫組織染色を行った。OCT1-PIP-Ax を投与したマウスの 22Rv1 異種移植片において、腫瘍の内部は線維化している領域が多くを占め、Cleaved caspase 3 の発現は増加し、ACSL3、Ki-67 の発現は減少する傾向にあった。この結果から、OCT1-PIP-Ax 投与により腫瘍組織においてアポトーシスが誘導され、腫瘍増殖が抑制されている可能性が示唆された。

(5) 結論
本研究では、前立腺がん抑制効果が認められている OCT1-PIP に殺細胞効果を付加するために、DNA アルキル化剤であるクロラムブシル (Ax) を修飾した改良 PI ポリアミド (OCT1-PIP-Ax) を開発した。前立腺がん細胞のみならず、他臓器由来のがん細胞株や乳腺上皮細胞を用いて増殖に対する効果を解析し、前立腺がん細胞特異性効果を検証した。分子生物学的検討では OCT1-PIP-Ax が二本鎖 DNA 修復経路に影響を与えていることを同定した。さらに in vivo における去勢抵抗性前立腺がんモデル細胞由来の腫瘍増殖抑制効果を認め、用いたマウスでは体重減少や有害事象は認められなかった。本剤は PI ポリアミドに Ax を修飾することで、前立腺がん細胞に対して著しい増殖抑制効果を発揮する可能性を有し、新規治療剤としての可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Obinata D, Suzuki S, Yamanaka Y, Yoshizawa T, Mochida J, Yamaguchi K, Takahashi S.	4. 巻 52
2. 論文標題 Low reduction of prostate volume is a significant predictor of prostate cancer at subsequent biopsy in patients with dutasteride: A retrospective study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Andrologia	6. 最初と最後の頁 13810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/and.13810.	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 -

1. 著者名 Obinata Daisuke, Lawrence Mitchell G., Takayama Kenichi, Choo Nicholas, Risbridger Gail P., Takahashi Satoru, Inoue Satoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Recent Discoveries in the Androgen Receptor Pathway in Castration-Resistant Prostate Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 581515
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2020.581515	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 船越大吾, 大日方大亮, 高山賢一, 藤原恭子, 高橋悟, 井上聡
2. 発表標題 アルキル化剤を修飾したピロールイミダゾールポリアミドの前立腺癌細胞に対する抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 船越大吾, 大日方大亮, 高山賢一, 藤原恭子, 井上聡, 高橋悟
2. 発表標題 アルキル化剤を修飾したpyrrole-imidazole(PI)ポリアミドの前立腺癌細胞に対する抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船越大吾, 大日方大亮, 山本慎一郎, 高山賢一, 藤原恭子, 井上聡, 高橋悟
2. 発表標題 アルキル化剤で修飾した pyrrole-imidazole (PI) ポリアミドの前立腺がん細胞に対する抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第31回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2022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
研究分担者	大日方 大亮 (OBINATA Daisuke) (20624886)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	
研究分担者	井上 聡 (INOUE Satoshi) (40251251)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長 (82674)	
研究分担者	藤原 恭子 (FUJIWARA Kyoko) (40595708)	日本大学・歯学部・准教授 (32665)	

	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
研究協力者	船越 大吾 (FUNAKOSHI Daigo)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	山本 慎一郎 (YAMAMOTO Shinichiro)		

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		
オーストラリア	Monash University		