

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18571

研究課題名(和文) 抗癌剤耐性前立腺癌の微小管ネットワークを標的とした新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishing a new therapeutic strategy targeting the microtubule network of anticancer drug resistant prostate cancer

研究代表者

渡邊 佳太郎 (Watanabe, Keitaro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：20836390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は抗癌剤耐性となった去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)モデル細胞株中の遺伝子発現ネットワーク解析により、Kinesin-like protein superfamily (KIFs)遺伝子の発現亢進を見出し、さらに薬剤のスクリーニングにより、数種の薬剤(KWH01-06)において遺伝子の性質を抗癌剤耐性から抗癌剤感受性へ再プログラム化する作用を持つとの結果を得た。生体外実験でのスクリーニングによりKWH-05は抗腫瘍効果有し前立腺癌細胞株のをKIFs遺伝子の発現を抑制した。今後はマウス皮下腫瘍モデルへの投与実験にて効果を検証する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌の罹患率は上昇している。腫瘍マーカーPSAを用いた検診により前立腺癌の早期発見が可能となった一方で、約20%の症例では転移を伴って発見される。転移性前立腺癌の治療は、ホルモン療法が主であるが数年の内にホルモン抵抗性を獲得し、難治性である去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)へ発展する。CRPCにはドセタキセルやカバジタキセルといった抗癌剤治療が行われるがその生命予後改善効果は数か月程度であり、上記抗癌剤耐性CRPCに有効な治療法は存在しない。そのため新規治療戦略が喫緊の課題である。本研究における新規薬剤は抗癌剤耐性CRPCに対する新規治療の一つとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The applicant found an upregulation of the Kinesin-like protein superfamily (KIFs) genes by gene expression network analysis in a castrate-resistant prostate cancer (CRPC) model cell line that became resistant to anticancer drugs. (KWH01-06) was found to have the effect of reprogramming the properties of genes from anticancer drug resistant cancer to sensitive cancer. By screening in an in vitro experiment, KWH-05 had an antitumor effect and suppressed the expression of the KIFs genes in the prostate cancer cell line. In the future, the effect will be verified by administration experiments to mouse subcutaneous tumor models.

研究分野：去勢抵抗性前立腺癌

キーワード：抗癌剤耐性前立腺癌 KIFs 遺伝子再プログラム化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の罹患数は、全世界において 10 万人当たり 20 人程度と言われており、男性の全癌の中で 10%を占める。高齢化及び食習慣の欧米化に伴い、近年本邦における前立腺癌による死亡数は増加傾向であり、厚生労働省の予測前立腺癌罹患率は 2016 年に肺癌を抑えて男性の 1 位に上昇した。前立腺癌に対する腫瘍マーカー PSA を用いた検診により、前立腺癌の早期発見が可能となった一方で、約 20%の症例では転移を伴って発見される。転移性前立腺癌の治療は、アンドロゲン受容体 (Androgen receptor; AR) 拮抗薬および 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寛解が得られるが、数年の内にホルモン抵抗性を獲得し、難治性である去勢抵抗性前立腺癌: Castration Resistant Prostate Cancer; CRPC へ発展する。CRPC にはドセタキセル(DOC)による化学療法が行われ、近年新規抗癌剤であるカバジタキセル(CBZ)も登場したが、その生命予後改善効果は数か月程度であり、CBZ 耐性 CRPC に有効な治療法は存在しない。このため、抗癌剤耐性 CRPC の克服は差し迫った課題である。申請者は、当教室で樹立した抗がん剤耐性 CRPC モデル細胞株の解析から細胞極性および微小管ネットワークのリモデリングと抗癌剤耐性メカニズムとの関連を見出し、そのドライバー候補遺伝子として Kinesin family および Aurora kinase family を同定した。本研究では、上記遺伝子を標的とした CBZ 耐性克服薬のスクリーニングと機能解析を目的としている。

2. 研究の目的

当教室では以前より AR axis, PI3K/Akt/mTOR axis と相互依存的なシグナル経路がドセタキセル(DOC)耐性 CRPC への進展に寄与すると報告してきた (Kosaka T. et al. Prostate 2010, Yasumizu et al. J. Urol. 2014)。また申請者らは CBZ 耐性細胞株 DU145CR、PC3CR を独自に樹立することに成功した。(Hongo H et al, Cancer Sci. 2018)

DOC 耐性 CRPC モデル C4-2AT6 および CBZ 耐性 CRPC モデル DU145CR, PC3CR の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより解析した結果、細胞増殖関連因子および微小管ネットワーク関連因子が亢進していた。抗癌剤耐性 CRPC モデルの細胞形態及び微小管ネットワークをレーザー共焦点顕微鏡で解析した結果、抗癌剤耐性モデル細胞株におけるネットワークのリモデリングおよび細胞極性の低下を認めた。申請者は微小管ネットワークと細胞極性のリモデリングが抗癌剤耐性に関わると考え、DOC/CBZ 耐性 CRPC における各種遺伝子発現を定量 PCR で検討した結果、Kinesin-like protein family (KIFs), Aurora kinase (AURK) family およびその調節因子である PLK の発現亢進を認めた (図 1)。KIF/AURK family は難治性前立腺癌の新たな治療標的となり得ると考えられたが、前立腺癌に承認された薬剤は存在せず、臨床応用に高い壁があると考えられた。

申請者は当施設で確立したバイオインフォマティクスによる独自の薬剤スクリーニング手法 (Kosaka T et al, Cancer Sci. 2013) を応用し、DOC 耐性 CRPC 細胞株 C4-2AT6 および CBZ 耐性 CRPC 細胞株 DU145CR, PC3CR のマイクロアレイデータを用いて、*in silico* にて化合物スクリーニング (Connectivity map analysis) 抗癌剤耐性 CRPC

モデル細胞株に対する *in vitro* スクリーニングを行い、その結果、数種の薬剤 (開発コード YMS01-06) において抗癌剤耐性前立腺癌の遺伝子プロファイルを、抗癌剤感受性の遺伝子プロファイルへ再プログラム化する作用を持つとの解析結果を得た。

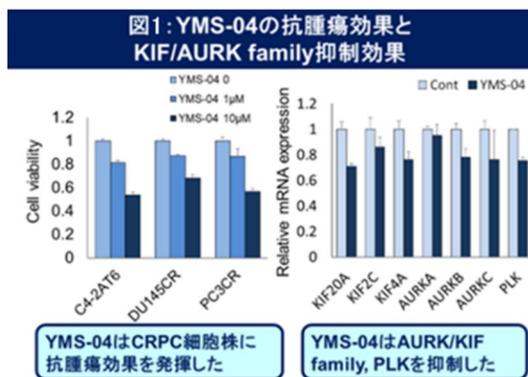
抗癌剤耐性 CRPC モデル細胞株に対する *in vitro* スクリーニングの結果、YMS-04 は DOC 耐性 CRPC および CBZ 耐性 CRPC 双方に有意な抗腫瘍効果を示し、YMS-04 により CBZ 耐性モデルの KIF/AURK family, PLK の発現が抑制された。これらから YMS-04 は微小管ネットワーク・細胞極性リモデリング機構を標的とした抗癌剤耐性 CRPC 克服薬として有用であると考えられた。

当教室の先行研究で PI3K/AKT/mTOR axis および MAPK/ERK axis が CRPC の抗癌剤耐性に関わることを報告している (Yasumizu Y et al, J Urol 2014, Hongo H et al, Cancer Sci 2018)。本研究において YMS-04 の機能解析を行う。また当教室の先行研究で PI3K/AKT/mTOR axis および MAPK/ERK axis が CRPC の抗癌剤耐性に関わることを報告している (Yasumizu Y et al, J Urol 2014, Hongo H et al, Cancer Sci 2018)。これら遺伝子と KIF/AURK family, PLK との相互依存的な制御機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 抗癌剤耐性 CRPC 発展における微小管ネットワーク・細胞極性の解析

LNCaP, C4-2AT6, DU145, DU145CR, PC3, PC3CR に DOC, CBZ を投与し、微小管ネットワーク・細胞極性の变化をレーザー共焦点顕微鏡で観察する。さらに Western blotting により



KIF/AURK family および PLK 発現量の変化を解析する。

Focal Adhesion Kinase (FAK)はインテグリンや growth factor signal を調節し、細胞接着・遊走に重要な役割を果たすため、細胞極性のマーカーとして用いられている。また、FAK は Cell cycle 調節に関わり、抗癌剤耐性に寄与するとの報告もある (Aoudjit F et al, Chemother Res Pract. 2012)。FAK 阻害剤 BI85320 を各種細胞株に投与した際の細胞極性の変化をレーザー共焦点顕微鏡で解析するとともに、Cell cycle の各 phase における FAK 局在の変化を Flow cytometry により解析する。

(2) KIF family, AURK family と PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK axis との相互依存的な制御機構の解明

申請者らは、PI3K/AKT/mTOR axis および MAPK/ERK axis が CRPC の抗癌剤耐性に関わり、治療標的となり得ることを報告してきた (Yasumizu Y et al, J Urol 2014, Hongo H et al, Cancer Sci 2018)。しかしながら各種 PI3K/AKT 阻害剤、MAPK/ERK 阻害剤の臨床試験において単剤で前立腺癌に効果を認めたものは存在しない。各種 CRPC 細胞株に対して PI3K 阻害剤 BEZ235, MEK 阻害剤 PD184352, KIF20A 阻害剤 Paprotrain, pan AURK 阻害剤 AMG900 を投与した場合の細胞増殖抑制効果を比較検討し、さらにそれぞれの細胞株における PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK axis および KIF/AURK family, PLK 発現の変化を Western blotting で解析する。

LNCaP, DU145, PC3 に対して、リポフェクション法により KIF20A, KIF2C, KIF4A および AURKA/B を過剰発現させた際の PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK axis および細胞周期の変化を Western blotting, Flow cytometry で解析する。また KIF/AURK 過剰発現による PI3K 阻害剤、MEK 阻害剤の感受性の変化を WST assay により解析する。

(3) Drug repositioning による抗癌剤耐性克服薬のスクリーニング

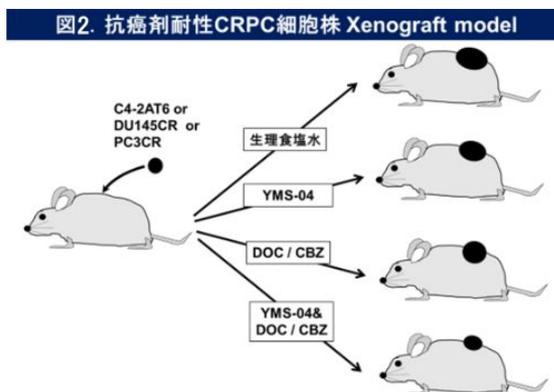
申請者は抗癌剤耐性 CRPC モデルのマイクロアレイデータを用いた薬剤スクリーニングにより、抗癌剤耐性関連遺伝子ネットワークを再プログラム化する候補薬剤として YMS01-06 を同定した。抗癌剤耐性克服候補薬の内、YMS-04 は各種抗癌剤耐性モデル細胞に抗腫瘍効果を認めるとともに、KIF20A, KIF2C, KIF4A および AURKA/B の抑制効果を有していた。YMS-04 各種前立腺癌細胞株に投与した際の微小管ネットワーク・細胞極性の変化をレーザー共焦点顕微鏡で解析する。また、PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK axis の変化を Western blotting, Flow cytometry で解析する。さらに YMS-04 と DOC, CBZ を併用投与した際の各種細胞株における DOC, CBZ 感受性の変化を WST で解析し、Apoptosis および細胞周期の変化を Flow cytometry で解析する。

(4) 臨床検体を用いたバイオマーカー探索

臨床応用を見据え、CRPC 治療における YMS-04 の位置づけを明確にするため、臨床検体を用いたバイオマーカー探索を行う。当教室では倫理委員会の承認 (承認番号 20150242, 20150285) および患者さんの同意の下、抗癌剤治療前後の CRPC 腫瘍生検、血液検体を保管している。免疫染色法により抗癌剤治療前後の KIF family, AURK family の発現量の変化を比較検討する。また、リキッドバイオプシーによる Precision medicine への応用を見据え、血液検体より回収した Circulating tumor cell (CTC), Cell free DNA (cfDNA)における KIF family, AURK family の Copy Number Alteration (CNA) および mRNA 発現量を Droplet Digital PCR により解析し、抗癌剤奏効率、生存率との相関を検討する。

(5) マウス皮下腫瘍モデルを用いた YMS-04 の抗腫瘍効果の検討

去勢を施行した 6~8 週齢の雄の nude BALB/C mice に 1×10^6 個の細胞を背部に皮下注射し、抗癌剤耐性 CRPC 細胞株 C4-2AT6, DU145CR, PC3CR を用いた xenograft model を作成する。尚この際、約 95% 以上の接種部位での腫瘍形成を既に確認している。C4-2AT6 / DU145CR/PC3CR xenograft model を 4 群に分け、それぞれに 生理食塩水、YMS-04 単剤、DOC/CBZ 単剤、YMS-04 および DOC/CBZ を投与する (図 2)。4 日毎に腫瘍径を測定し、腫瘍体積を計算する。腫瘍体積が $80 \sim 100 \text{mm}^3$ になったところ (約 30 日) で皮下腫瘍を採取する。体重及び腫瘍体積についてプロットし、4 群間での腫瘍増大速度を比較する。皮下腫瘍の採取



とともに、血中サイトカイン、CTC cfDNA を回収する。皮下腫瘍中の KIF family, AURK family 発現量および細胞極性の変化を Flow cytometry により解析する。CTC cfDNA 中の KIF family, AURK family の CNA, mRNA 発現量を Droplet Digital PCR で解析する。

4. 研究成果

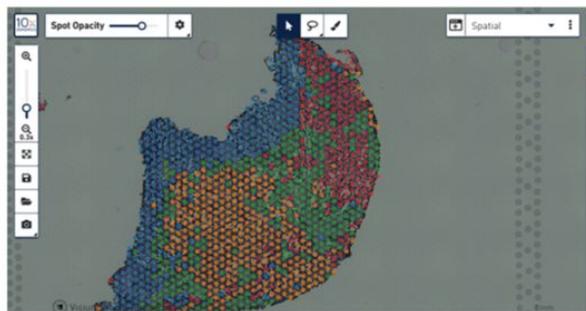
(1) 前項(4)(5)について、血液循環細胞(circulating tumor cell; CTC)の希少性から遺伝子情報を取得するためには、シングルセルレベルで血液中から分離する技術の登場を待つ必要があった。申請者は図3に示すような次世代の新規CTC回収システムに着目し、教室に導入した。本システムは専用のマイクロ流路チップを利用して、流体力学に基づきCTCがサイズ依存性に他の血球成分と分離され、抗体を用いることなくラベルフリーでCTCが濃縮可能なシステムである。人工的な影響が最小限で回収以降の解析や培養が可能で、上皮性マーカーの発現が乏しいがんにおいてもCTCが効率よく回収でき、他のシステムに比して有利で独自性があり、既に臨床応用している。CTC、Cell free DNA (cfDNA)における KIF family, AURK family について、CTC シングルセル RNA シークエンスとシングルセル copy number variant (CNV) 解析を行う予定である。

図3



(2) 前項(5)について、今後最新の空間的遺伝子発現解析システム (Visium 空間的遺伝子発現ソリューション) を用いて腫瘍組織内の不均一性 (intratumor heterogeneity; ITH) の解析を行っている。本システムはスライドガラス上にポリ T のオリゴ配列を並べ、分子バーコードを付与した塩基を使って RNA 解析する画期的な技術である。図4のように腫瘍検体切片における全トランスクリプトームを空間的な位置情報を保ったままマッピングすることで、組織切片上で活性化している遺伝子の地図が入手可能である。これを用いて KIF family, AURK family など標的分子を最新の免疫多重染色機 (Vectra Polaris) を用いて蛋白レベルで発現解析し、分子病理学的バイオマーカーの導出と、癌免疫微小環境の特徴を解明する。遺伝子発現の活性化情報と蛋白発現を空間的に視覚化し、オミックスデータを統合し多層性ビッグデータとして解析する予定である。

図4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------