

令和 5 年 4 月 9 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09518

研究課題名（和文）アポトーシス経路をターゲットとした新規前立腺癌治療法の開発

研究課題名（英文）Targeting apoptosis pathway as novel therapeutic strategy for prostate cancer

研究代表者

新井 誠二（Arai, Seiji）

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10636210

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）：薬剤スクリーニングから同定したミトコンドリア標的薬について、2種類の前立腺癌細胞 in vivoモデルにおいて、アポトーシスを介した腫瘍縮小効果を確認した。Western blot、プロテオーム解析から、ミトコンドリア標的薬によって、前立腺癌細胞の生存に重要な役割を果たす蛋白の低下を確認した。これらの蛋白のアポトーシスへの関与に関して解析を行なっている。ミトコンドリア標的薬の治療効果および耐性メカニズムの解明のため、ミトコンドリア標的薬の耐性株を作成した。現在、親株と耐性株との間での遺伝子変化（DNA、RNA）の解析を行っている。以上の結果について、論文にまとめ、誌面発表を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、複数の前立腺癌細胞に対してアポトーシスを誘導できる薬剤を同定することができた。この薬剤は、マウスゼノグラフトモデルでも同様にアポトーシスを誘導することを確認できた。これらの結果は、前立腺癌に対する新規薬剤の可能性を示唆するものと考えられた。今回同定した薬剤の治療効果メカニズム・耐性メカニズムをさらに解明すること、さらにマウスモデルを用いて最適な投与方法（特に投与間隔）を見出すことで、臨床応用への道が開かれる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：With a small-scale screening of the mitochondria-targeted drug library, we identified one mitochondria-targeted drug that could induce apoptosis and shrinkage in prostate cancer xenograft models. We have revealed that the drug decreased several essential proteins in western blot and immunohistochemistry in vitro and in vivo. We have developed the drug-resistant prostate cancer cell line to identify the drug efficacy and resistance mechanisms. We use this model to compare the genetic and transcriptional differences between parental and resistant cells by whole exome sequence and RNA sequence. We expect to publish the paper based on this result this year.

研究分野：前立腺癌、尿路上皮癌

キーワード：アポトーシス 前立腺癌

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では約 1 割の男性が生涯で前立腺癌に罹患する。そのうち約 5%を占める転移性前立腺癌は、数年以内に去勢治療への耐性を獲得する(去勢抵抗性前立腺癌、Castration Resistant Prostate Cancer: CRPC)。これら CRPC に対する既存治療の奏効期間は限られており、新たな前立腺癌治療法の開発が臨床の現場で強く求められている。

CRPC の治療抵抗性の一因として、ミトコンドリアに局在する抗アポトーシス BCL2 ファミリー蛋白の発現増加が報告されている。これら発現増加した抗アポトーシス蛋白は、前立腺癌患者がホルモン治療や抗がん剤治療などを受けた際に、同様にミトコンドリアに存在するアポトーシス促進蛋白の機能を阻害する。その結果、前立腺癌細胞のアポトーシス誘導をブロックすることから、前立腺癌の治療抵抗性獲得に寄与すると考えられる。

申請者は、抗アポトーシス蛋白のうち、MCL1 および BCLXL の両者をノックダウンあるいは阻害することで、短時間のうちに前立腺癌細胞にアポトーシスが誘導されることを明らかにした。重要なことに、マウスに作成した MCL1 ノックアウト前立腺癌の xenograft が、BCLXL 阻害剤の短期投与で、完全に消失することを発見した (Arai S et al. Clin Cancer Res 2018)。

しかし、その後の研究で、MCL1 阻害剤と BCLXL 阻害剤を同時に使用した場合、マウスに対して骨髄抑制など強い副作用を起こすことが判明し、これら阻害剤の併用療法を臨床的に応用することが現時点では困難である、という問題点が明らかとなった。そこで、申請者は、MCL1 阻害剤または BCLXL 阻害剤との併用で、前立腺癌細胞にアポトーシスを誘導する新たな治療標的を確立し、それをマウスモデルで検証することができれば、副作用の少ない、強力な CRPC 治療法を開発できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、抗アポトーシス蛋白阻害剤との併用で前立腺癌細胞にアポトーシスを誘導する新たな治療標的を確立し、マウスモデルでその有効性と安全性を検証することである。特に、アポトーシスはミトコンドリアで生じることからミトコンドリアを標的とする薬剤との併用に着目する。さらに、ミトコンドリア標的薬単剤で効果を示す薬剤を認めた場合には、その薬剤についてもマウスモデルで検証する。

## 3. 研究の方法

### 1) 薬剤スクリーニングによるアポトーシス誘導薬剤の検討

薬剤スクリーニングには、ミトコンドリアを標的とする 84 種類の薬剤ライブラリー (Targetmol 社) を使用した。96 well plate に前立腺癌細胞を播き、抗アポトーシス蛋白阻害剤 (S63845 あるいは ABT-263、100 nM) とスクリーニング薬剤 (各 10 μM) を投与し、24 時間後の細胞生存を MTS assay により確認した。効果を示した薬剤については、さらに低濃度 (1 μM) との併用で、同様に実験を行った。

### 2) 抗アポトーシス蛋白 MCL1 のプロテアソームを介する蛋白分解についての検討

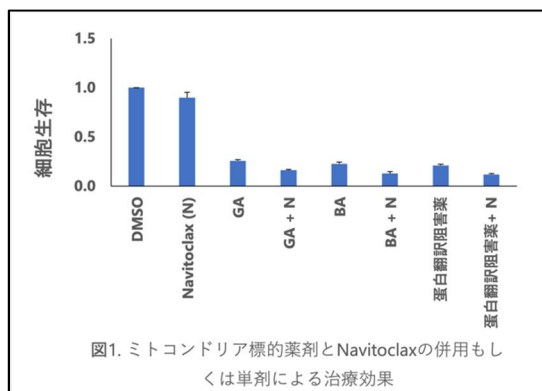
アポトーシス阻害に重要な役割を果たす抗アポトーシス蛋白 MCL1 について、前立腺癌における分解機構の検討を行った。申請者は、チロシンキナーゼ阻害剤が前立腺癌細胞において、MCL1 の分解を促進することをすでに見出しており、これまで論文で報告されていた E3 コピキチンリガーゼのうち、どれがこの分解に関与するのかについて、siRNA を用いた knockdown による検討を行った。

## 4. 研究成果

### 1) 薬剤スクリーニング

薬剤スクリーニングの結果、単剤でも前立腺細胞に対して治療効果を示す薬剤を見出した(図

1)。その中でも、蛋白翻訳阻害薬に着目した。蛋白翻訳阻害薬は、複数の前立腺癌細胞 (LNCaP、RV1、VCaP、PC3、DU145) に対して、細胞生存を低下させることがわかった。さらに、Caspase Glo を用いた検討により、蛋白翻訳阻害薬はアポトーシスを誘導していることがわかった。Western blot、プロテオーム解析から、ミトコンドリア標的薬により前立腺癌の生存に重要な役割を果たす AR、MYC、MCL1 蛋白等の低下を確認した。また、ミトコンドリア標的薬の治療効果および耐性メカニズムの解明のため、ミトコンドリア標的薬の耐性株を作成した。以上の成果について、論文報告を予定している。

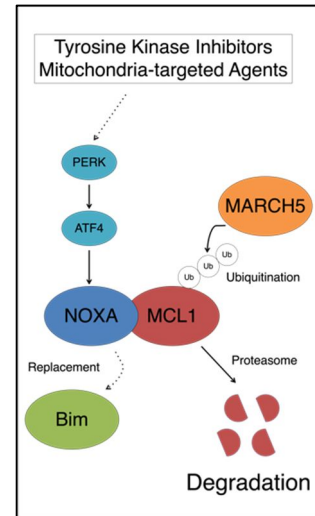


## 2) 抗アポトーシス蛋白 MCL1 のプロテアソームを介する蛋白分解についての検討

これまで報告されていた E3 ユビキチンリガーゼについて、それぞれ siRNA による knockdown を行った。その結果、ミトコンドリア外膜に存在する MARCH5 の knockdown 下では、前立腺癌細胞におけるチロシンキナーゼ阻害剤による MCL1 の低下作用が消失することを発見した。MARCH5 を CRISPR/CAS9 で knockout した前立腺癌細胞を作成し、同様にチロシンキナーゼ阻害剤による MCL1 低下が生じないことを確認した。さらに、チロシンキナーゼ阻害剤が統合的ストレス応答を引き起こし、その結果、増加した NOXA が MCL1 と複合体を形成することにより、MCL1 の分解を引き起こしていることを見出し、論文報告を行った。

## 3) AR、MYC とアポトーシスの関連性

蛋白翻訳阻害薬が低下させる AR と MYC に関して、アポトーシス誘導の関連性について検討を行った。その一部について、論文報告を行った。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Einstein David J., Arai Seiji, Calagua Carla, Xie Fang, Voznesensky Olga, Capaldo Brian J., Luffman Christina, Hecht Jonathan L., Balk Steven P., Sowalsky Adam G., Russo Joshua W.	4. 巻 5
2. 論文標題 Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Remains Dependent on Oncogenic Drivers Found in Primary Tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCO Precision Oncology	6. 最初と最後の頁 1514 ~ 1522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1200/P0.21.00059	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 該当する
1. 著者名 Guo Haiyang, Wu Yiming, Nouri Mannan, Spisak Sandor, Russo Joshua W., Sowalsky Adam G., Pomerantz Mark M., Wei Zhao, Korthauer Keegan, Seo Ji-Heui, Wang Liyang, Arai Seiji, Freedman Matthew L., He Housheng Hansen, Chen Shaoyong, Balk Steven P.	4. 巻 12
2. 論文標題 Androgen receptor and MYC equilibration centralizes on developmental super-enhancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27077-y	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 Liang Jiaqian, Wang Liyang, Poluben Larysa, Nouri Mannan, Arai Seiji, Xie Lisha, Voznesensky Olga S., Cato Laura, Yuan Xin, Russo Joshua W., Long Henry W., Brown Myles, Chen Shaoyong, Balk Steven P.	4. 巻 519
2. 論文標題 Androgen receptor splice variant 7 functions independently of the full length receptor in prostate cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 172 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.07.013	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 該当する
1. 著者名 Ma Fen, Arai Seiji, Wang Keshan, Calagua Carla, Yuan Amanda R., Poluben Larysa, Gu Zhongkai, Russo Joshua W., Einstein David J., Ye Huihui, He Meng Xiao, Liu Yu, Van Allen Eliezer, Sowalsky Adam G., Bhasin Manoj K., Yuan Xin, Balk Steven P.	4. 巻 82
2. 論文標題 Autocrine Canonical Wnt Signaling Primes Noncanonical Signaling through ROR1 in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1518 ~ 1533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-21-1807	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 該当する

1. 著者名 Arai Seiji, Varkaris Andreas, Nouri Mannan, Chen Sen, Xie Lisha, Balk Steven P	4. 巻 9
2. 論文標題 MARCH5 mediates NOXA-dependent MCL1 degradation driven by kinase inhibitors and integrated stress response activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1, 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.54954	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 Wang Keshan, Ma Fen, Arai Seiji, Wang Yun, Varkaris Andreas, Poluben Larysa, Voznesensky Olga, Xie Fang, Zhang Xiaoping, Yuan Xin, Balk Steven P.	4. 巻 83
2. 論文標題 WNT5a Signaling through ROR2 Activates the Hippo Pathway to Suppress YAP1 Activity and Tumor Growth	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1016 ~ 1030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-22-3003	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 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 大津晃、新井誠二、澤田達宏、鈴木和浩
2. 発表標題 MCL1 阻害剤とミトコンドリア標的薬の併用療法は前立腺癌細胞のアポトーシスを誘導する
3. 学会等名 2020年日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Seiji Arai, Akira Ohtsu, Tatsuhiro Sawada, Kazuhiro Suzuki
2. 発表標題 Mitochondria E3 Ubiquitin Ligase MARCH5 Mediates StressInduced and NOXA-Dependent MCL1 Degradation
3. 学会等名 2020年日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新井誠二、大津晃、鈴木和浩
2. 発表標題 Combination therapies with BH3 mimetic drugs for prostate cancer
3. 学会等名 2020年日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>The Balk Lab's research collaborators  <a href="https://www.bidmc.org/research/research-by-department/medicine/hematology-oncology-research/research-faculty-and-labs/steven-balk-lab/collaborators">https://www.bidmc.org/research/research-by-department/medicine/hematology-oncology-research/research-faculty-and-labs/steven-balk-lab/collaborators</a></p>
---

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		
米国	Beth Israel Deaconess Medical Center		