

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22822

研究課題名（和文）難治性前立腺癌の細胞極性リプログラミングと新規治療戦略

研究課題名（英文）Reprogramming of cell polarity in refractory prostate cancer

研究代表者

本郷 周（HONGO, Hiroshi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：10626675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：去勢抵抗性前立腺がん（CRPC）に対する有効な治療は少なく、新規抗癌剤カバジタキセル等も近年使用され始めているが、その生命予後延長効果は数か月程度である。がん細胞の微小管ネットワーク・細胞極性のリモデリングは、発がんおよびがんの浸潤転移に関わると考えられてきたが、近年、抗がん剤耐性機構にも寄与する可能性が示唆されている。本研究では、抗がん剤耐性前立腺がん細胞株において微小管・細胞極性のリモデリングを認めることに着目し、微小管ネットワーク・細胞極性調節機構をターゲットとした新規治療戦略を、バイオインフォマティクスを応用した薬剤スクリーニングにより導出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移性前立腺癌の治療はホルモン療法が中心となる。ほぼ全ての症例で一時的な寛解が得られるが、数年の内にホルモン抵抗性を獲得し、去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）となる。CRPCに有効な治療は少なく、近年新規抗癌剤カバジタキセルも使用されているが、生命予後延長効果は数か月程度と限定的であり、カバジタキセル耐性前立腺癌は極めて予後不良であるため、新規治療戦略の開発は喫緊の課題である。申請者はカバジタキセル耐性前立腺癌の微小管ネットワークリモデリングを見出し、バイオインフォマティクスを応用した薬剤スクリーニングにより微小管ネットワークを標的とした新規薬剤を同定した。

研究成果の概要（英文）：There are few effective treatments for castration-resistant prostate cancer (CRPC), and although novel anticancer agents such as cabazitaxel have begun to be used in recent years, their prognostic value is limited to a few months. Remodeling of microtubule network and cell polarity in cancer cells has been considered to be involved in carcinogenesis and invasive metastasis of cancer, and recently, it has been suggested that it may also contribute to the mechanism of anticancer drug resistance. In this study, we focused on the finding of microtubule and cell polarity remodeling in anticancer drug-resistant prostate cancer cell lines, and derived novel therapeutic strategies targeting microtubule network and cell polarity regulation mechanisms by screening drugs using bioinformatics.

研究分野：前立腺癌

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 微小管ネットワーク バイオインフォマティクス 薬剤スクリーニング 細胞極性

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

転移性前立腺癌の治療は、アンドロゲン受容体拮抗薬 (Androgen receptor; AR) 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一時的な寛解が得られるが、数年の内にホルモン抵抗性を獲得する。これを去勢抵抗性前立腺癌: Castration Resistant Prostate Cancer; CRPC と表記する。CRPC に対して、本邦においてドセタキセルによる化学療法が広く行われてきた。また、近年ではエンザルタミド、アピラテロン、カバジタキセル (CBZ) 等の新規治療薬も近年使用され始めているが、その生命予後改善効果はいずれも数か月程度である。今までの当教室における先行研究において、前立腺癌微小環境で PI3K/Akt シグナル経路が亢進しており、PI3K/Akt シグナルと AR との相互依存的な活性化機構を有していることを発見し、相互依存的な活性化機構をターゲットとした新規治療戦略の可能性について報告してきた。さらに申請者らは CBZ 耐性 CRPC モデル細胞株を独自に樹立し、CBZ 耐性 CRPC における PI3K/AKT/mTOR axis, MEK/ERK axis の亢進が治療標的になり得ることを報告した (Hongo H. et al, Cancer Sci. 2018) が、前立腺癌に承認された PI3K/AKT/mTOR axis, MEK/ERK axis の阻害剤は存在せず、新規治療戦略の確立は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

申請者らは、転移性 CRPC 細胞株 DU145, PC3 へ CBZ を投与し続けることにより、CBZ 耐性 CRPC モデル DU145CR, PC3CR を樹立した (Hongo H et al, Cancer Sci. 2018)。CBZ 耐性 CRPC モデル細胞株は世界でも報告がなく、当教室独自のモデルである。CBZ 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微小管ネットワークのリモデリング・細胞極性の低下を発見した。本研究では、CRPC における微小管ネットワークのリモデリングを通じた抗癌剤耐性獲得メカニズムを学術的「問い」とし、抗癌剤耐性 CRPC の新規治療戦略を追求することを目的としている。

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・細胞極性の変化をレーザー共焦点顕微鏡で観察した。Western blotting により KIF/AURK family の発現を解析した。

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

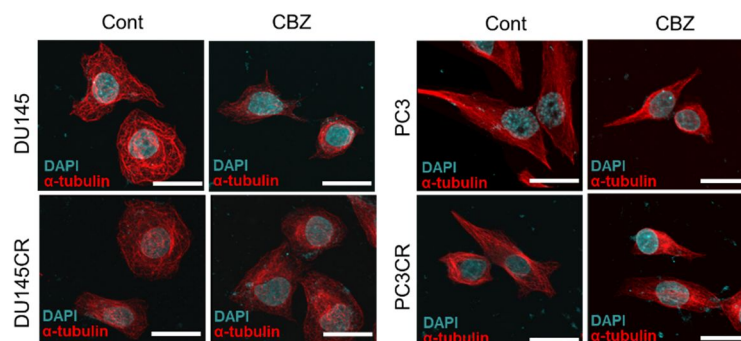
申請者は当施設で確立したバイオインフォマティクスによる独自の薬剤スクリーニング手法 (Kosaka T et al, Cancer Sci. 2013) を応用し、DOC 耐性 CRPC 細胞株 C4-2AT6 および CBZ 耐性 CRPC 細胞株 DU145CR, PC3CR のマイクロアレイデータを用いて、in silico にて化合物スクリーニング (Connectivity map analysis) を行った。その結果、数種の薬剤 (KWH01-06) において抗癌剤耐性前立腺癌の遺伝子プロファイル、抗癌剤感受性のプロファイルへ再プログラム化する作用を持つとの解析結果を得た。今回 in silico で同定した候補薬剤を CBZ 耐性モデル細胞株に投与し、抗腫瘍効果を解析した。

4. 研究成果

(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

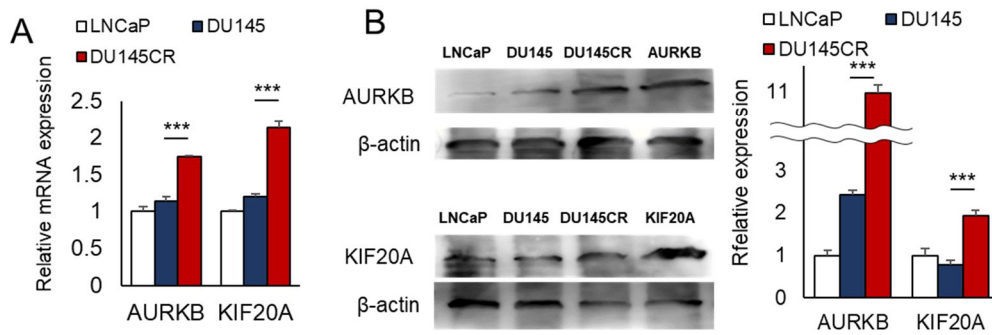
CBZ 感受性株・耐性株の微小管ネットワークをレーザー共焦点顕微鏡で解析した結果、微小管ネットワークのリモデリングを認めた (図 1)。さらに各種前立腺癌細胞株の KIF/AURK ファミリー構成因子の発現を解析したところ、CBZ 耐性前立腺癌細胞株において KIF20A, AURKB の発現が上昇していた (図 2)。

図1: CBZ感受性/耐性細胞株のMicrotubule network



CBZ感受性株: CBZ投与により微小管の密度が下がり、方向も不均一となる。
CBZ耐性株: CBZ投与による影響を受けない。細胞の突起が目立たなくなり、球形に近づいている?

図2: CBZ耐性前立腺癌におけるAURKB/KIF20A亢進

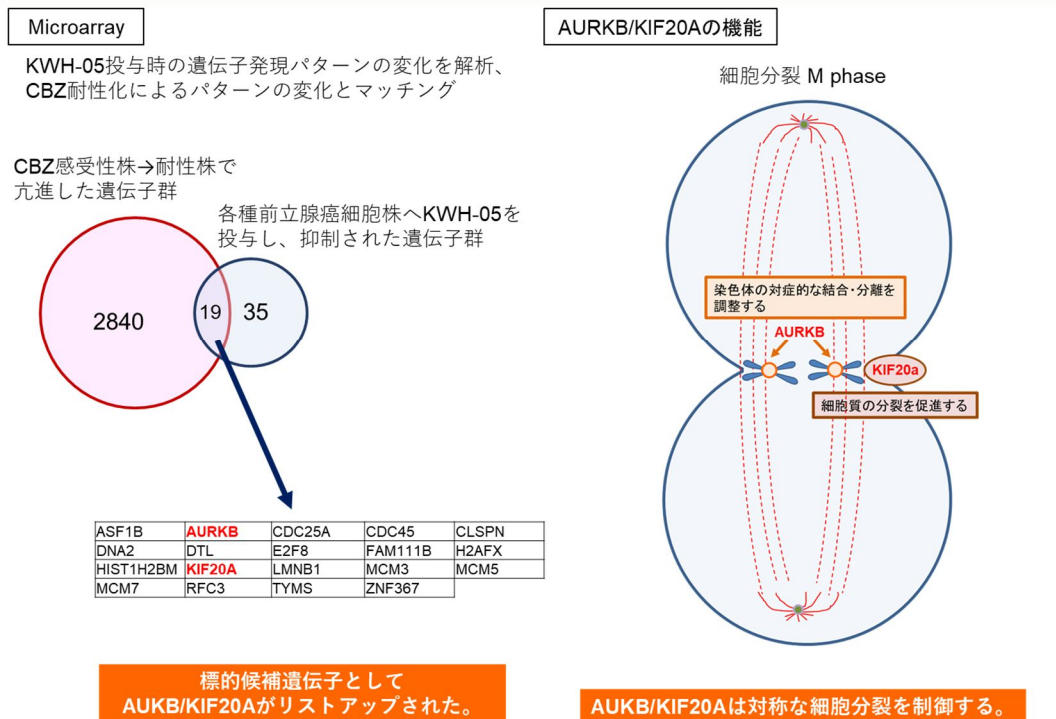


(2) Drug repositioning による抗癌剤耐性克服薬のスクリーニング

(1)の結果において、AURKB/KIF family タンパク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、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)を行った。その結果、数種の薬剤(KWH01-06)において抗癌剤耐性前立腺癌の遺伝子プロファイル、抗癌剤感受性の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、KWH-05 は有意な抗腫瘍効果有していた。

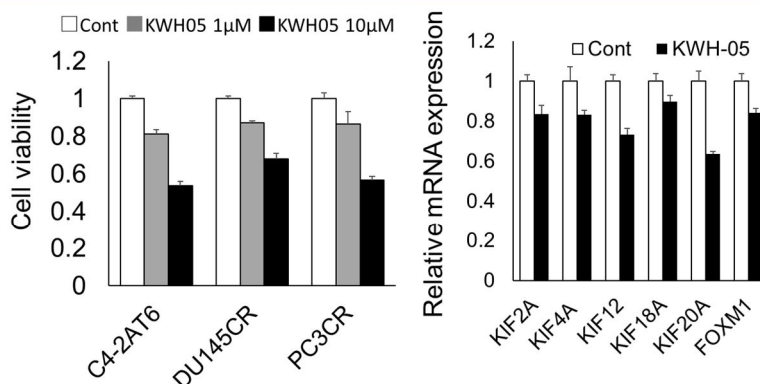
KWH-05 の治療標的を網羅的に解析するため、各種前立腺癌細胞株に KWH-05 を投与し、mRNA を抽出してマイクロアレイにより遺伝子発現を解析した。CBZ 感受性株から耐性株で亢進した遺伝子群および各種前立腺癌細胞株へ KWH-05 を投与し、抑制された遺伝子群をマッチングさせた結果、AURKB および KIF20A が含まれており、KWH-05 は前立腺癌の微小管ネットワークを評定とした治療薬として有望と考えられた(図3)。

図3: KWH-05の治療標的遺伝子の網羅的解析



定量 PCR においても KWH-05 は前立腺癌細胞株の AURK/KIF family 発現を抑制した (図 4)。

図 4: KWH-05の抗腫瘍効果とKIF family抑制効果



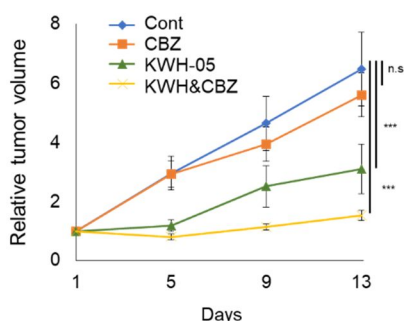
KWH-05はCRPC細胞株に抗腫瘍効果を発揮した

KWH-05はAURK/KIF family, PLKを抑制した

さらに DU145CR/PC3CR xenograft マウスを 4 群に分け、それぞれに 生理食塩水、 KWH-05 単剤、 CBZ 単剤、 KWH-05 および CBZ を投与し 4 群間での腫瘍増大速度を比較した結果、KWH-05 は CBZ 耐性 CRPC 皮下腫瘍モデルに単剤で抗腫瘍効果を発揮し、CBZ との併用による相乗効果も有していた (図 5)。

図 5: CBZ耐性CRPC皮下腫瘍モデルにおけるKWH-05の有効性

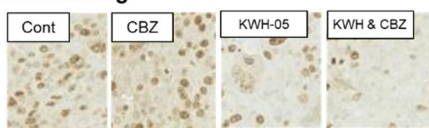
DU145CR



KWH-05はCBZ耐性CRPC皮下腫瘍モデルに単剤で抗腫瘍効果を発揮し、CBZとの併用による相乗効果も有していた。

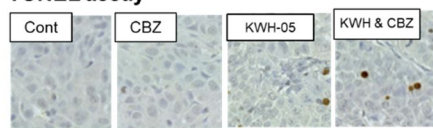
IHC

Ki67staining



KWH-05は皮下腫瘍の細胞増殖を抑制した。

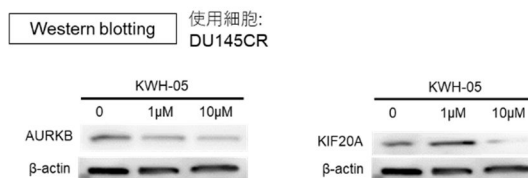
TUNEL assay



KWH-05は皮下腫瘍のアポトーシスを誘導した。

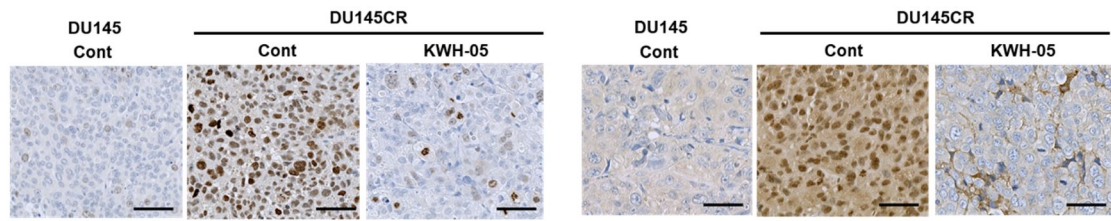
KWH-05 はカバジタキセル前立腺癌へ有効な可能性が示唆された。各種前立腺癌細胞株に KWH-05 を投与した際のタンパクを回収し、KWH-05 の標的シグナル解析を行った結果、AURKB/KIF20A が KWH 濃度依存的に抑制されていた (図 7)。マウスから抽出した皮下腫瘍を薄切し、各種抗体で免疫染色を行い KWH05 の機能解析を行った。CBZ 耐性前立腺癌では AURKB/KIF20A の発現が上昇し、KWH の経口投与により抑制されていた (図 8)。

図 7: Western blotting



KWH-05はAURKB・KIF20Aを抑制した。

図 8: 皮下腫瘍免疫染色



In vivoにおいてもCBZ耐性株でAURKB/KIF20A発現が亢進し、KWH-05はKIF20Aを抑制した。

以上のように、KWH-05 は難治性前立腺癌の新規治療戦略として有望であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hongo Hiroshi, Kosaka Takeo, Suzuki Yoko, Mikami Shuji, Fukada Junichi, Oya Mototsugu	4. 巻 11
2. 論文標題 Topoisomerase II alpha inhibition can overcome taxane-resistant prostate cancer through DNA repair pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-01697-2	査読の有無 無
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 Hongo Hiroshi, Kosaka Takeo, Suzuki Yoko, Oya Mototsugu	4. 巻 -
2. 論文標題 Discovery of a new candidate drug to overcome cabazitaxel-resistant gene signature in castration-resistant prostate cancer by in silico screening	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Prostate Cancer and Prostatic Diseases	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） 10.1038/s41391-021-00426-0	査読の有無 無
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 Hongo Hiroshi, Kosaka Takeo, Nakatsuka Seishi, Oya Mototsugu	4. 巻 -
2. 論文標題 A long-term survivor of metastatic neuroendocrine prostate cancer treated with multimodal therapy: genetic consideration from next-generation sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Cancer Conference Journal	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） 10.1007/s13691-021-00482-2	査読の有無 無
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 Kosaka Takeo, Hongo Hiroshi, Hayashi Hideyuki, Nakamura Kohei, Nishihara Hiroshi, Mikami Shuji, Beltran Himisha, Oya Mototsugu	4. 巻 24
2. 論文標題 Germline BRCA2 mutation in a case of aggressive prostate cancer accompanied by spinal bulbar muscular atrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Journal of Andrology	6. 最初と最後の頁 116 ~ 116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/aja.aja_37_21	査読の有無 無
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 Hongo Hiroshi, Kosaka Takeo, Aimon Eriko, Nishihara Hiroshi, Oya Mototsugu	4. 巻 15
2. 論文標題 Aggressive prostate cancer with somatic loss of the homologous recombination repair gene FANCA: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostic Pathology	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) 10.1186/s13000-019-0916-z	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 本郷周、小坂威雄、楊井祥典、安水洋太、宮崎保匡、田中伸之、武田利和、松本一宏、水野隆一、大家基嗣
2. 発表標題 難治性前立腺癌Circulating tumor cellのトランスクリプトーム解析と薬剤スクリーニング
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------