

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16728

研究課題名(和文)カバジタキセル耐性獲得におけるケモカインと免疫機構の作用機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of action of chemokines and immune mechanisms in the acquisition of cabazitaxel resistance

研究代表者

岩本 大旭 (Iwamoto, Hiroaki)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：90847245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CRPCがカバジタキセル(CBZ)抵抗性をきたす機序を解明し、新規治療戦略を構築することは前立腺癌患者の予後改善に不可欠である。RNA microarrayの結果、Long non-coding RNAであるTP53TG1がCBZ耐性化の機序に関与している可能性が示唆された。また、コーヒー含有抗炎症作用物質カーウェオールとカフェストールがCBZ耐性前立腺癌細胞株に対する増殖抑制、遊走抑制効果を持つことを明らかにした。この作用機序を解明することでCBZ抵抗性をきたす機序の解明につながる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドセタキセル治療後のCRPCに対してカバジタキセルは生存期間を有意に延長したが、治療後増悪までの期間は高々2.8箇月と報告されている。進行性前立腺がんに対するカバジタキセルの効果は限定的であり、カバジタキセル抵抗性のメカニズムの解明が急務である。本研究の成果をさらに発展させることで、カバジタキセル耐性のメカニズムの解明につながり、進行性前立腺がんの予後改善に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Elucidating the mechanism by which CRPC confers resistance to cabazitaxel (CBZ) and developing novel therapeutic strategies is essential for improving the prognosis of prostate cancer patients. RNA microarray results suggest that TP53TG1, a long non-coding RNA, may be involved in the mechanism of CBZ resistance. We also found that coffee-containing anti-inflammatory substances, carweol and cafestol, have inhibitory effects on the proliferation and migration of CBZ-resistant prostate cancer cell lines. The results suggest that the elucidation of this mechanism of action may lead to the elucidation of the mechanism that leads to CBZ resistance.

研究分野：前立腺癌

キーワード：Cabazitaxel CRPC Resistant CCL2 Coffee

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本でも前立腺特異抗原(prostate-specific antigen: PSA) の認知が広まり、PSA 検診が広まっている。日本における前立腺癌新規罹患数は増加の一途を辿っており、男性癌の新規罹患数においていずれ第 1 位となると目されている。検診の普及とともに臨床的に重要ではない癌が発見されているという見解がある一方、新規診断症例の実に 12%が転移を伴う進行癌の状態で見られている。前立腺癌細胞は一般にアンドロゲン受容体(androgen receptor: AR)を発現し、アンドロゲン依存性に増殖するため、進行前立腺癌に対してはアンドロゲン除去療法(androgen-deprivation therapy: ADT)が行なわれる。ADT は多くの前向き研究で検証され、生存期間延長に寄与することが証明されている。しかし、ADT は初期には著効する一方、数年後にはほとんどの症例で ADT に対して抵抗性を獲得し、去勢抵抗性前立腺癌(castration-resistant prostate cancer: CRPC)となる。これまでの多くの前立腺癌の基礎的研究では、CRPC においてもなお AR シグナルが機能しているという点に焦点を当てていた、その成果として AR の感受性亢進や恒常的に活性化した AR(ARV7 など)の存在などの機序によってごく低濃度のアンドロゲンやアンドロゲンに依存しない状態でも AR シグナルを活性化していることが CRPC の本態である可能性が示唆された(Chandrasekar T, et al. *Transl Androl Urol.* 2015)。これらの成果は新規 AR シグナル標的薬アピラテロンやエンザルタミドなどの臨床応用へと繋がっている。しかし、いずれはタキサン系抗癌剤を使用せざるを得なくなる。最終段階として、タキサン系抗癌剤、特にカバジタキセルにも耐性化を獲得すると標準化された治療法がなくなってしまう。

前立腺癌は骨転移の頻度は非常に高いが、診断時に内臓転移(visceral metastasis: VM)を認めることはほとんどない。応募者は CRPC 治療を重ねることにより、肺・肝および副腎などの VM が著しく増加することを明らかにした。また、カバジタキセル抵抗性の獲得が新規 VM をきたす予測因子となっていた。さらに VM をきたした症例の予後が非常に悪いことを明らかにした(Iwamoto H, et al. *Prostate.* 2020.)。以上の知見はカバジタキセル抵抗性の獲得が新規 VM 発症に繋がり、予後不良因子となっていることを示すが、CRPC がカバジタキセル抵抗性となる機序はほとんど未解明である。ドセタキセル治療後の CRPC に対してカバジタキセルは生存期間を有意に延長したが、治療後増悪までの期間は高々 2.8 箇月と報告されている(de Bono JS, et al. *Lancet* 2010)。カバジタキセルの効果は限定的であり、カバジタキセル抵抗性の機序解明は急務である。応募者の研究室では世界に先駆けて PC-3-TxR/CxR、DU145-TxR/CxR を確立し、細胞外排出機構を担う MDR1 などの p 糖タンパクや、腫瘍免疫抑制や癌細胞活性化シグナルとして注目されている CCL2-CCR2 シグナルがカバジタキセル耐性化に関与している可能性を報告した(Machioka K, Iwamoto H et al. *Oncotarget.* 2018; Natsagdorj A, Iwamoto H, et al. *Cancer Sci.* 2019)。他には、ERK や PI3K/AKT シグナル伝達経路がカバジタキセル耐性化に関与している可能性が報告されているが、いまだ解明には至っていない(Hongo H, et al. *Cancer Sci.* 2018)。そこで、本研究では「カバジタキセル抵抗性となる機序の解明、それによる新規治療ターゲットの解明」を目指す。

2. 研究の目的

CRPC 患者の予後改善のためにカバジタキセル抵抗性となる機序の解明、それによる新規治療ターゲットの解明は急務である。応募者の研究室ではタキサン系抗癌剤に対する抵抗性獲得機序の解明のためドセタキセル耐性株 PC-3-TxR、DU145-TxR、カバジタキセル耐性株 PC-3-TxR/CxR、DU145-TxR/CxR を世界に先駆けて確立した(Takeda M, et al. *Prostate.* 2007, Machioka K, Iwamoto H et al. *Oncotarget.* 2018)。また、耐性株において MDR1(multiple drug resistance1, p-glycoprotein: p-gp)が高発現していることがわかった。MDR1 は薬物を細胞外へ排出する作用があり、抗癌剤の耐性に関与しているとされている。さらに、cDNA マイクロアレイの結果、カバジタキセル耐性株において解析した 27 種のケモカインのうち CCL2 と CCL28 が高発現していることがわかった。我々の研究室では CCL2 が自己分泌作用で前立腺癌細胞の遊走能を高めること、CCL2-CCR2 シグナルがドセタキセル・カバジタキセル耐性化に関与している可能性があることを報告している(Izumi K, et al. *EMBO Mol Med.* 2013, Natsagdorj A, Iwamoto H, et al. *Cancer Sci.* 2019)。CCL2 は TAM の強力な活性化因子であることがよく知られているが、活性化された TAM は前立腺癌細胞との相互作用で CCL2 の分泌促進をしている(Izumi K, et al. *EMBO Mol Med.* 2013)。CRPC と TAM だけでなく、TAM と Treg、CRPC と Treg についても様々な分子を介してお互いの活性化を誘導している(Mantovani A, et al. *Trends Immunol.* 2002; Ren L, et al. *Oncotarget.* 2016; Ikeda T, et al. *J Immunol.* 2010)。これらのことから CRPC、TAM、Treg はそれぞれ相互に活性化を促進していると考えられる。最終的に TAM や Treg といった腫瘍免疫寛容を担う二つの重要な免疫細胞からの影響で、CRPC における MDR1 の発現上昇が起こりカバジタキセル耐性をきたすという独自の仮説を考えた。これらの機序による CRPC のカバジタキセル耐性獲得については未だ明らかにした研究はない。CRPC のカバジタキセル耐性獲得の作用機序を解明することで CRPC 患者の予後改善に大きく寄与できる。また、TAM や Treg をターゲットとした抗ケモカイン治療を含めた新規治療戦略を創出する鍵となる。本研究は、今後の増加が

見込まれているカバジタキセル耐性 CRPC 患者の新規治療法の開発に繋がる、非常に学術的・社会的意義の高いものである。

3. 研究の方法

カバジタキセル耐性を獲得していく上で増加する分子の同定

ヒト CRPC 細胞株 PC-3、DU145、ドセタキセル耐性株である PC-3-TxR、DU145-TxR、カバジタキセル耐性株である PC-3-TxR/CxR、DU145-TxR/CxR を使用し、カバジタキセル耐性を獲得していく上で増加する遺伝子・micro RNA を網羅的解析手法(RNA microarray)にて探索し、抽出した。

候補分子の耐性化前立腺癌に対する作用、機序の同定

候補遺伝子をノックアウトすることでカバジタキセル耐性前立腺癌細胞株のカバジタキセルに対する感受性が回復するかどうかを検討した。またカバジタキセル耐性に関与している機序についても検討した。

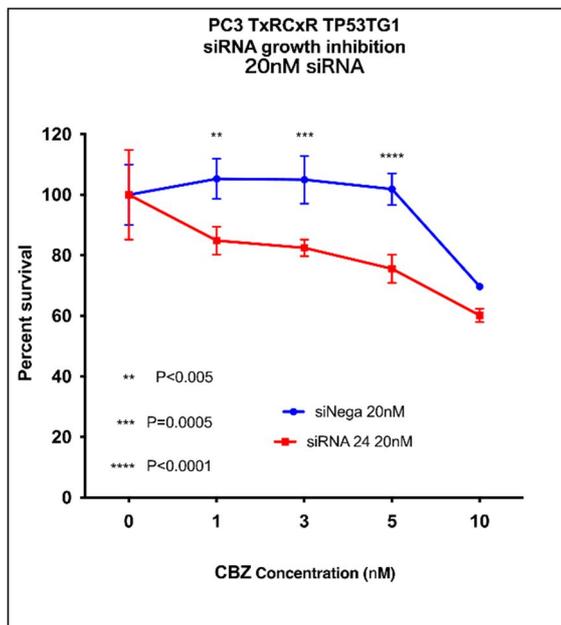
マウスの実験にて候補分子の作用の検証

SCID マウスを使用し、前立腺癌細胞は PC-3-TxR/CxR、DU145-TxR/CxR を使用する。候補分子をノックダウンした群とコントロールを作成し、カバジタキセル投与による両群間の腫瘍縮小効果を確認する。また、PC-3-TxR/CxR、DU145-TxR/CxR に対して候補分子の阻害剤、カバジタキセル、併用投与の 3 群で腫瘍縮小効果を確認する。

4. 研究成果

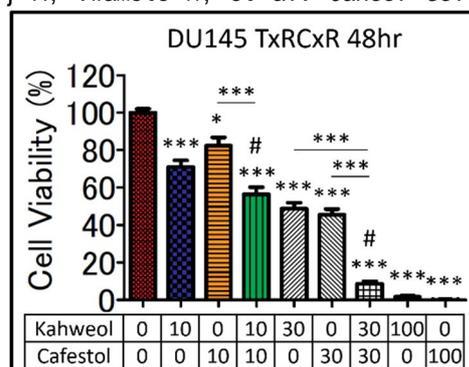
まず、カバジタキセル耐性株である PC-3-TxR/CxR、ドセタキセル耐性株である PC-3-TxR、通常の PC-3 に対して RNA microarray を行った。PC-3-TxR に対して PC-3-TxR/CxR で特に過剰発現している RNA を調べたところ Long non-coding RNA である TP53TG1 が PC-3-TxR と比較して 11.1

倍、カルシウム結合タンパク質 Sorcin が 7.2 倍、STEAP2 が 4.8 倍、chemokine (C-X-C motif) ligand 6 が 4.6 倍、STEAP1 が 4.5 倍、CROT が 4.4 倍、Transforming growth factor-beta induced gene が 4.4 倍、Insulin like growth factor binding protein 3 が 4.3 倍、TMEM243 が 4.1 倍、fatty acid binding protein 4 が 4.1 倍、claudin 12 が 3.7 倍、DBF 4 が 3.5 倍、aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2 が 3.4 倍過剰発現していることがわかった。いくつかの遺伝子で急激な過剰発現が起きている可能性を考えていたが、想定より変化は乏しかった。11.1 倍と最も過剰発現していた TP53TG1 に着目して実験を行った。まず PC-3-TxR/CxR において TP53TG1 をノックダウンして、カバジタキセルに対する感受性が回復するかどうかを proliferation assay にて確認した。その結果、右図のように siTP53TG1 投与でカバジタキセル投与に対する感受性が回復した。しかし、結果にばらつきが認められ有意な結果とまでは認められず、今回の実験では TP53TG1 がカバジタキセル耐性化に関与する遺伝子であることを明らかにすることはできなかった。今後さらに実験を続け、条件を微調整することで TP53TG1 がカバジタキセル耐性化に関与する遺伝子であることが明らかになる可能性はあると考えている。この実験と並行して SCID マウスを使用した in vivo 実験の準備を進めていたが、カバジタキセル耐性化に関与する候補 RNA の同定に至らなかったため、進捗に支障をきたす結果となった。

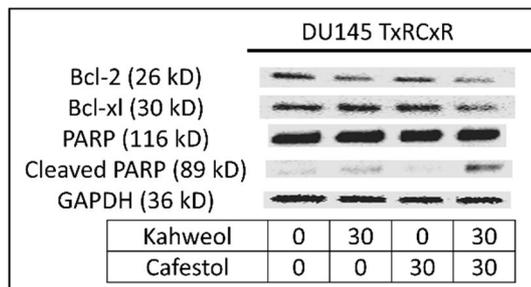


が認められ有意な結果とまでは認められず、今回の実験では TP53TG1 がカバジタキセル耐性化に関与する遺伝子であることを明らかにすることはできなかった。今後さらに実験を続け、条件を微調整することで TP53TG1 がカバジタキセル耐性化に関与する遺伝子であることが明らかになる可能性はあると考えている。この実験と並行して SCID マウスを使用した in vivo 実験の準備を進めていたが、カバジタキセル耐性化に関与する候補 RNA の同定に至らなかったため、進捗に支障をきたす結果となった。

我々の研究室では CCL2 が自己分泌作用で前立腺癌細胞の遊走能を高めること、CCL2-CCR2 シグナルがドセタキセル・カバジタキセル耐性化に関与している可能性があることを報告している (Izumi K, et al. *EMBO Mol Med.* 2013, Natsagdorj A, Iwamoto H, et al. *Cancer Sci.* 2019)。また、コーヒー含有抗炎症作用物質カーウエオールとカフェストールがホルモン感受性前立腺癌細胞株だけでなく、カバジタキセル耐性前立腺癌細胞株に対する増殖抑制、遊走抑制効果を持つこと、さらにカーウエオールとカフェストールが CCR2 を抑制することで遊走抑制効果を示すことを明らかにしている (Iwamoto H, et al. *Prostate.* 20, Natsagdorj A, Iwamoto H, et al. *Cancer Sci.* 2019)。そのことから、カーウエオールとカフェストールをカバジタキセル耐性前立腺癌細胞株 DU145-TxRCxR に投与し proliferation assay を行った。その結果右図のように強い増殖抑制効果を認めた。さらに western



blotting で Bcl-2、Bcl-xl の減少、cleaved PARP の上昇を認め、アポトーシスを誘導していることが明らかとなった。カーウェオールとカフェストールの作用機序を解明することでカバジタキセル抵抗性をきたす機序の解明につながる可能性が示唆された。進行前立腺癌の予後改善のためにはカバジタキセル耐性化の機序の解明が不可欠である。今後さらに研究を進めていく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwamoto Hiroaki, Izumi Kouji, Nakagawa Ryunosuke, Toriumi Ren, Aoyama Shuhei, Kamijima Taiki, Shimada Takafumi, Kano Hiroshi, Makino Tomoyuki, Naito Renato, Kadomoto Suguru, Yaegashi Hiroshi, Kawaguchi Shohei, Nohara Takahiro, Shigehara Kazuyoshi, Kadono Yoshifumi, Mizokami Atsushi	4. 巻 10
2. 論文標題 Serum CCL2 Is a Prognostic Biomarker for Non-Metastatic Castration-Sensitive Prostate Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 2369 ~ 2369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10102369	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 NAKAGAWA RYUNOSUKE, IWAMOTO HIROAKI, NAITO RENATO, KADOMOTO SUGURU, YAEGASHI HIROSHI, KAWAGUCHI SHOHEI, NOHARA TAKAHIRO, SHIGEHARA KAZUYOSHI, IZUMI KOUJI, KADONO YOSHIFUMI, MIZOKAMI ATSUSHI	4. 巻 43
2. 論文標題 Is it Necessary to Treat all Metastatic Prostate Cancer With Upfront Androgen Receptor Axis-targeted Agents?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1351 ~ 1359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16283	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
---------	---------