

機関番号：14501  
 研究種目：研究活動スタート支援  
 研究期間：2010～2010  
 課題番号：22890113  
 研究課題名（和文） ホルモン療法および抗癌剤抵抗性前立腺癌に対する IGF-1R 標的治療  
 研究課題名（英文） Antisense oligonucleotide Targeting IGF-1R in a paclitaxel-resistant prostate cancer model  
 研究代表者  
 古川順也（FURUKAWA JUNYA）  
 神戸大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：20448179

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト IGF-1R を標的とするアンチセンスオリゴ(ASO)を用い、樹立したホルモン療法およびパクリタキセル抵抗性前立腺癌細胞株(PtxR PC3)に対する抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* の実験系で評価し、IGF-1R を標的とした ASO はパクリタキセル抵抗性前立腺癌の増殖を抑制しパクリタキセルとの併用療法ではパクリタキセルに対する感受性を再び高める可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：We establish paclitaxel-resistant PCa cells (PtxR PC3) and assess the anti-cancer activity of antisense oligonucleotide (ASO) targeting human IGF-1R *in vitro* and *in vivo*. We observed dose- and sequence-specific suppression of IGF-1R expression in IGF-1R ASO -treated PtxR PC3 cells *in vitro* which correlated with decreased proliferation and increased apoptosis. Combination of IGF-1R ASO with paclitaxel showed the drug interactions resulted in synergy *in vitro*. IGF-1R ASO suppressed PtxR PC3 tumor growth as a combination therapy with paclitaxel *in vivo*. In conclusion, IGF-1R ASO suppresses growth of PtxR PC3 tumors, synergistically enhancing paclitaxel sensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	1,230,000	369,000	1,599,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌, IGF-1R, 標的治療

#### 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は近年本邦においても急激な増加を認めているが、診断時に、根治的治療の対象とはならない進行性前立腺癌の割合が依

然として高い。進行性前立腺癌に対する第一選択の治療は内分泌療法であるが、その効果は限られており、究極的にはほぼ全例が内分泌療法抵抗性となる。このホルモン非依存性

進展のメカニズムの解明こそが、進行性前立腺癌の予後改善に寄与することは疑いの余地のないことである。しかしながら、その正確な分子メカニズムはいまだ解明の途上にあり、現在までの報告ではアンドロゲン受容体(AR)を介する経路とARを介さない経路の二つに大きく分類される。特にARを介する経路のうち、アンドロゲン以外の分子によるリガンド非依存性のARの活性化が、前立腺癌のホルモン非依存性進展に重要な役割を果たしている可能性があると考えられている。その中でもIGF-1Rの活性化を介したアンドロゲン非依存進展が特に注目されている。IGF-1Rは膜貫通型チロシンキナーゼレセプターの一つで、その下流シグナルであるPI3K/AKTおよびRas/MAPKを介した細胞の増殖生存の重要な役割を果たしている。IGF-1Rは正常前立腺組織に比べ前立腺癌組織では高発現しており(Hum Pathol 2005;36:1186-96, Cancer Res 2002;62:2942-50)、ホルモン非依存癌および転移巣で発現レベルが高まることが示されている(Cancer Res 2004;64:8620-29)。このことより前立腺癌に対するIGF-1R標的治療の開発研究が進められ、現在までに、small molecule inhibitorを用いた前立腺癌に対する前臨床試験が行われ、in vitro、in vivoともに良好な抗腫瘍効果が示されてきた。( Mitsiades et al, Cancer Cell 2004;5:221-230,Garcia-Echeverria et al, Cancer Cell 2004;5:231-239))しかしながらIGF-1Rと最も構造的に類似しているインスリン受容体(IR)に対する標的外効果の完全なる克服には至っておらず、糖代謝に与える影響が問題視されている(Hofmann F et al, Drug Discov Today 2005;10:1041-47)。また、より選択性の高いIGF-1Rに対するモノクローナル抗体を用いた検討でもインスリンの

過感受性を引き起こすことが報告されており(Wang Y et al, Mol Cancer Ther 2005;4:1214-1221)、さらに優れた標的選択性を持つ薬剤の開発が望まれている。そこで我々はこれまでにアンチセンスオリゴを用いたIGF-1R標的治療に取り組み、アンチセンスオリゴの優れた標的選択性を示し、IGF-1R遺伝子を不活化することにより動物モデルにおいても顕著な抗腫瘍効果が得られ、ホルモン抵抗性獲得までの期間を延長させることを報告した。(Furukawa J et al, Prostate. 2010 ;70:206-18)しかし、我々の報告したIGF-1Rアンチセンスオリゴ療法は優れた治療効果を示したが、完全に腫瘍を消退させる程の効果を有さなかった。このため、次の課題の一つに他の治療との併用療法の確立を考え、現時点で臨床試験上唯一HRPCの予後を延長することが示されたタキサン系抗癌剤を選択した。以上の経緯に基づき本研究の実施を計画した次第である。

## 2. 研究の目的

アンドロゲン除去療法は進行性前立腺癌患者に対して唯一の有効な治療であり、初回治療において大部分の症例の自覚的および他覚的所見を改善するが、数年以内にアンドロゲン除去療法に対する感受性を失いアンドロゲン非依存性進展に至る。近年、タキサン系抗癌剤がホルモン抵抗性前立腺癌(HRPC)の予後延長することが2種類の第三相臨床試験により示されたが、その予後延長期間は満足できるものではなく、HRPCに対するより効果的な治療戦略を構築することが急務であると考えられる。最近アンドロゲン除去療法および化学療法などの治療刺激により活性化され、それらの発現が顕著に亢進する遺伝子群が存在し、それらが強力な腫瘍増殖因子または抗アポトーシス作用を有することが報

告されてきた。また、これらの遺伝子群の発現を阻害することで、治療刺激のアポトーシス誘導効果を高め、その結果、HRPCへの進展を予防あるいは遅延させるという治療戦略は理にかなっていると考える。我々のグループはこれまでにHRPC前立腺癌患者より得た組織を用い、cDNA arrayを用い網羅的解析を行いHRPC進展に伴い発現が増強する候補遺伝子を選択し、それらの中から1型インスリン様成長因子受容体(IGF-1R)を標的遺伝子として選択した。これまでの研究成果においては、HRPCの進行とともにIGF-1RのmRNAおよび蛋白レベルでの発現の増強を認め、また、アンチセンスオリゴを用いIGF-1R遺伝子を不活化することにより顕著な抗腫瘍効果が得られ、ホルモン抵抗性獲得までの期間を延長させることを報告した。

(Furukawa J et al, Prostate. 2010 ;70(2):206-18.) 今回申請を行う研究の予備実験として、ホルモン抵抗性ヒト前立腺癌細胞株であるPC3 を用いタキサン系抗癌剤抵抗株であるPC3-tRを樹立した。アンドロゲン除去環境において、PC3-tRは親株であるPC3 と比較しmRNAおよび蛋白レベルでIGF-1Rの発現が亢進していることを確認した。この結果より、ホルモン抵抗性およびタキサン系抗癌剤に対する抵抗性の獲得に関しIGF-1Rの発現が関与している可能性が示唆される。以上より、本研究では、IGF-1Rに対する標的治療とタキサン系抗癌剤の併用療法がもたらす抗腫瘍効果を明らかにし、さらにはタキサン系抗癌剤抵抗性に関与する遺伝子がIGF-1Rの不活化によりどのように変化するかを同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

1) IGF-1R アンチセンスオリゴの *in vitro* での活性を評価する。ホルモン抵抗性前立腺細胞

株(PC3)およびホルモンかつタキサン系抗癌剤抵抗前立腺癌細胞株(PC3-tR)に IGF-1R アンチセンスオリゴをトランスフェクションさせた細胞より mRNA および蛋白を抽出し、real time RT-PCR、Western blot 法により mRNA および蛋白レベルでの標的である IGF-1R のサイレンシングが容量依存的にかつシーケンス特異的に生じていることを確認し、標的遺伝子の発現を抑制するのに必要なアンチセンスオリゴの容量を明らかにする。

次いで、アンチセンスオリゴ単独およびタキサン系抗癌剤と併用した場合の殺細胞効果、細胞周期およびアポトーシス誘導に対する影響を、MTT アッセイおよびフローサイトメトリーにて解析する。またアポトーシス誘導関連のシグナル伝達経路における標的遺伝子発現阻害の意義を検索するために、アポトーシス誘導関連蛋白の発現変化を Western blot 法により検討する。

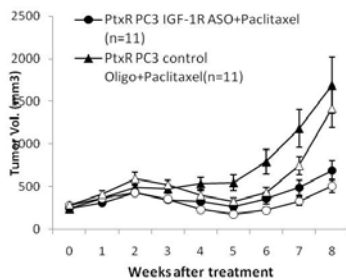
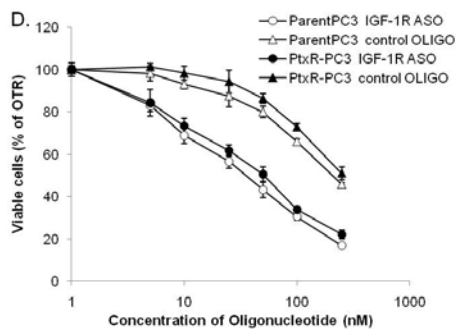
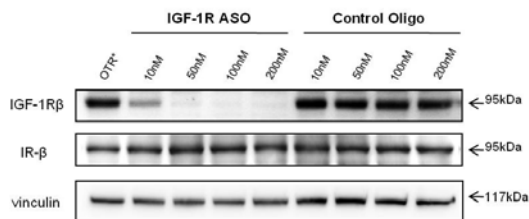
### 2)

上述のアンチセンスオリゴの効果をヌードマウスを用いた *in vivo* の系で解析する。まず、PC3 および PC3-tR 細胞を皮下接種し腫瘍が形成された時点でアンチセンスオリゴによる治療を開始し、腫瘍片より mRNA および蛋白を抽出し、real time RT-PCR、Western blot 法および免疫組織化学染色を施行し *in vivo* の系においても標的遺伝子の発現阻害が可能であることを確認する。次いでアンチセンスオリゴ投与およびミスマッチオリゴ単独投与の2群、さらにタキサン系抗癌剤との併用療法を加えた2群を設定し、前述の2種の前立腺癌細胞皮下接種のモデルを用い皮下に形成された腫瘍に対する増殖抑制効果を評価する。

#### 4. 研究成果

樹立した PtxR PC3 のパクリタキセルに対する IC50 値は親株と比較し約 15 倍高く、ドセタキセルやミトキサントロンに対しても交叉耐性を示した。IGF-1RASO は PtxR PC3 の IGF-1R 発現を mRNA および蛋白レベルで容量依存的、シーケンス特異的に抑制し（図 1），IGF-1R 発現の抑制と細胞増殖抑制およびアポトーシスの誘導促進の関与が確認された（図 2）。パクリタキセルとの併用療法では有意な相乗効果を示した。In vivo では、IGF-1RASO は PtxR PC3 マウス皮下腫瘍の増殖をパクリタキセルとの併用療法にて有意に抑制した（図 3）。以上の結果より IGF-1R を標的とした ASO はパクリタキセル抵抗性前立腺癌の増殖を抑制しパクリタキセルとの併用療法ではパクリタキセルに対する感受性を再び高める可能性が示された。

以下上より図 1、2、3 を示す。



#### 5. 主な発表論文等 〔学会発表〕（計 2 件）

①平成 23 年 3 月 11 日 三重  
第 20 回泌尿器科分子・細胞研究会  
演題名：パクリタキセル抵抗性前立腺癌に対するインスリン様成長因子 I レセプターを標的にしたアンチセンスオリゴ療法

②平成 23 年 5 月 16 日 ワシントン  
第 106 回アメリカ泌尿器科学会  
演題名：Antisense oligonucleotide targeting IGF-1R enhances Paclitaxel sensitivity in a Paclitaxel resistant prostate cancer model

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

古川順也 (FURUKAWA JUNYA )  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20448179