

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23791787  
 研究課題名(和文) 難治性前立腺癌の進展に着目した AKT-MTOR シグナル経路制御による新規治療戦略  
 研究課題名(英文) A new strategy controlling of AKT-mTOR pathway with targeting to progression of castration resistant prostate cancer.  
 研究代表者  
 安水 洋太 (YASUMIZU YOTA)  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号：40464854

## 研究成果の概要(和文)：

本研究では、ドセタキセル抵抗性ヒト前立腺癌細胞株 C4-2AT6 を用いて AKT-mTOR シグナル阻害剤の有効性について検討した。AKT-mTOR シグナル阻害剤とドセタキセルの併用は C4-2AT6 に対して高い殺細胞効果を示した。また、C4-2AT6 を用いて作成したマウス皮下腫瘍モデルにおいてもドセタキセルとの併用によって高い抗腫瘍効果を示した。これらの結果は、AKT-mTOR 阻害剤がドセタキセル抵抗性前立腺癌におけるドセタキセル抵抗性改善に寄与する可能性を示唆した。

## 研究成果の概要(英文)：

In this study we explored the efficacy of a AKT-mTOR pathway inhibitor for docetaxel resistant prostate cancer cell line: C4-2AT6. C4-2AT6 cells revealed combined administration of AKT-mTOR pathway inhibitor and docetaxel had a significant and synergistically high cytotoxicity. In a castrated mice xenograft model, combined AKT-mTOR pathway inhibitor and docetaxel also showed high anti-tumor effect. These results suggested that inhibition of AKT-mTOR pathway was able to overcome docetaxel resistance in human docetaxel resistant prostate cancer.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：去勢抵抗性前立腺癌、PI3K/AKT/mTOR pathway、ドセタキセル抵抗性、Dual PI3K/mTORC1/2 阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は欧米諸国において男性の悪性腫瘍の中で最も頻度の高いものの一つであり、我が国においては現在、男性の癌罹患率のうちで最も罹患上昇率の高い癌である。ステージの高い症例や低分化癌、有転移症例においては、主にアンドロゲン遮断療法 (androgen deprivation therapy; ADT) が施行される。ADT は 8 割の症例で奏功するものの、継続していくうちに多くがアンドロゲン非依存性増殖能を獲得し、ADT に抵抗性を示す、いわ

ゆる去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer; CRPC) となる。CRPC となった場合の生命予後は約 2 年である。CRPC の 2nd Line としてドセタキセルを中心とした化学療法が広く行われているが、生命予後改善の寄与度はわずか 3 か月程度であり、その効果は不十分である。したがって CRPC に対する新規治療戦略の確立は急務である。既存の多くの研究はホルモン不応性の獲得過程に着目した各種シグナル変化に追求し得ていないため、CRPC 特

異的な治療の検討・開発が不十分である。我々は前立腺癌細胞株 C4-2 を Androgen 除去下で培養継続し、独自に CRPC 株 : C4-2AT6 を樹立した (Kosaka et al. Prostate, 70, 162-9, 2010)。C4-2AT6 は PTEN 欠損、AR 増幅、PSA 産生を備えたアンドロゲン非依存性の増殖を呈するのみならず、各種化学療法に対し抵抗性を獲得していることが明らかとなった (Kosaka et al, J urol, in revise, 2010)。CRPC の 30% に癌抑制遺伝子である PTEN の欠損を認め、前立腺癌の増殖における最大の原因遺伝子と考えられている。PTEN の欠損が AKT のリン酸化を活性化し癌化を促進する。C4-2、C4-2AT6 では共に PTEN の欠損を認めるが、AKT のリン酸化は C4-2AT6 において有意に亢進している。このことは、PTEN が欠損した状態での AKT のリン酸化にも発現の強弱があり、癌の進展に伴って pAKT の発現が上昇することが CRPC の分子メカニズムの一端であることを示唆させるものである。CRPC の増殖において AKT-mTOR pathway の関与が強く示唆され、同 pathway の機序の解明及び制御が新たな治療戦略を確立するうえで重要である。

## 2. 研究の目的

当教室ではアンドロゲン除去下でドセタキセル抵抗性ヒト CRPC 細胞株 : C4-2AT6 を樹立し (Prostate, 2010)、この細胞株の解析から CRPC においてその進展に伴う AKT-mTOR pathway の活性化を示唆する知見を得た。本研究では、AKT-mTOR pathway 及びそのフィードバック機構に着目し、その制御によって去勢抵抗性前立腺癌に対する新規治療戦略の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト CRPC 細胞株 C4-2 及び C4-2AT6 を研究の対象とした。C4-2AT6 は C4-2 をアンドロゲン除去下で長期培養し樹立された細胞株で PTEN 欠損、PSA 産生能を有している。アンドロゲン非存在下における PI3K/AKT/mTOR pathway のタンパク発現ならびにドセタキセル投与におけるそれぞれの発現の変化を Western blot 法、免疫細胞・組織染色にて検討した。

(2) PI3K/AKT/mTOR シグナル阻害剤として、エベロリムス : mTOR 阻害剤、NVP-BE2235 : PI3K-mTOR1/2 dual inhibitor を使用し in vitro, in vivo における細胞増殖抑制効果を検討した。ドセタキセルと併用することで、それぞれの阻害剤の相加・相乗効果を検討した。

(3) C4-2AT6 を用いて作成したマウス皮下腫瘍の摘出検体を用いて免疫組織染色を行い、Ki67・アポトーシスの評価を行った。

## 4. 研究成果

(1) C4-2AT6 ではリン酸化 AKT (pAKT) の発現が C4-2 と比較して有意に亢進していた (figure1)。ドセタキセルの投与は C4-2AT6 で更に pAKT の発現を誘導した (figure2-A)。これらの結果は、当教室におけるこれまでの報告と同様のものであった (Kosaka et al, J urol, in revise, 2010)。アンドロゲン除去は AKT シグナル経路を有意に亢進させ、さらにドセタキセル投与による Akt シグナル経路の活性化がドセタキセル抵抗性獲得の一端である可能性が示唆された。

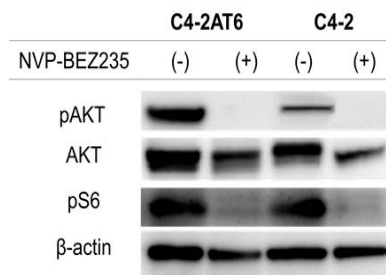


Figure1

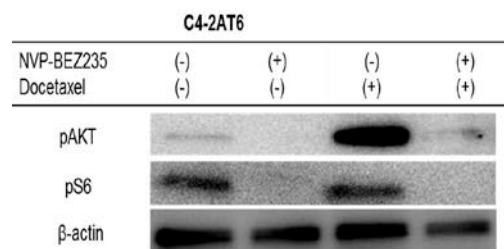


Figure2-A

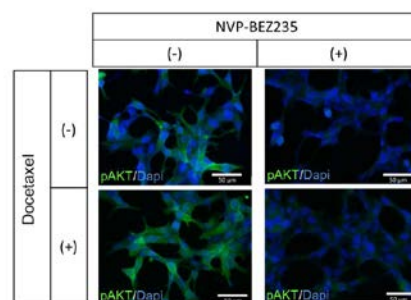


Figure2-B

(2) C4-2AT6 に対してエベロリムス及び NVP-BE2235 を投与し、pAKT 及び pS6 の発現を Western blot 法を用いて評価した。10nM 以上のエベロリムス投与は投与 24 時間後の pS6 の発現を十分に抑制することが可能であったが、pAKT の発現は抑制し得なかった。一方、50nM 以上の NVP-BE2235 単剤投与は投与後 24 時間後の pAKT、pS6 の発現を有意に抑制した (Figure3)。

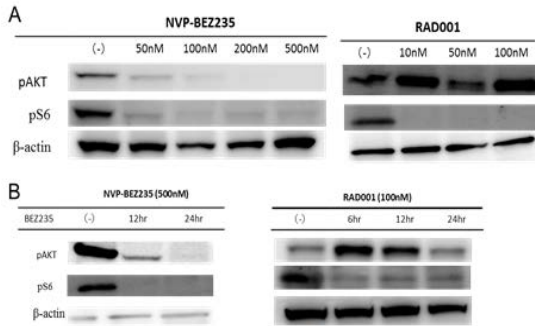


Figure3

続いて、WST assay を用いて NVP-BEZ235 の殺細胞効果を評価した。100nM 以上の濃度の NVP-BEZ235 は C4-2 と比較して C4-2AT6 に対して有意に高い殺細胞効果を示した。2nM 及び 5nM のドセタキセル単剤での殺細胞効果はそれぞれ  $88.2 \pm 7.5\%$  及び  $59.8 \pm 4.2\%$  であった。50nM 及び 500nM の NVP-BEZ235 単剤での殺細胞効果はそれぞれ  $57.6 \pm 2.6\%$  と  $36.0$

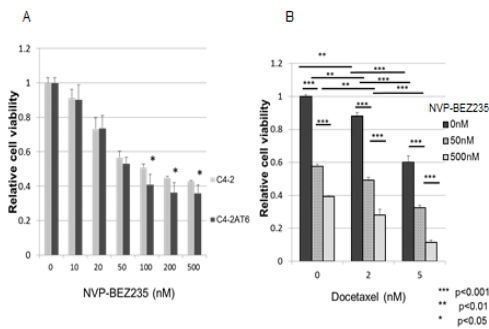


Figure4

$\pm 1.3\%$  であった。一方、5nM のドセタキセルと 500nM の NVP-BEZ235 との併用では殺細胞効果は  $11.5 \pm 2.7\%$  であった。Combination Index (CI) は 0.39 であり、ドセタキセルと NVP-BEZ235 の併用は相乗効果を示した (Figure 4)。続いてドセタキセルと NVP-BEZ235 を併用した際の pAKT 及び pS6 の発現について Western blot 法を用いて評価した。C4-2AT6 をドセタキセル 5nM 及び NVP-BEZ235 500nM に曝露させ、12 時間後における pAKT 及び pS6 の発現を評価した所、ドセタキセル投与によって上昇した pAKT 及び pS6 の発現は NVP-BEZ235 によって十分抑制し得た (Figure 2-A, 2-B)。去勢した Balb-C ノードマウスを用いて C4-2AT6 の皮下腫瘍モデルを作成した。皮下腫瘍のサイズが  $300\text{mm}^3$  を越えた時点で①コントロール群、②ドセタキセル投与群 (5mg/kg)、③NVP-BEZ235 投与群 (40mg/kg)、④ドセタキセル+NVP-BEZ235 併用群の 4 群に分け腫瘍サイズを評価した。ドセタキセル単剤投与群、NVP-BEZ235 単剤投与群では腫瘍径

はそれぞれコントロール比  $89.8 \pm 9.8\%$ 、 $81.2 \pm 6.4\%$  であったが、ドセタキセルと NVP-BEZ235 併用群では、腫瘍径はコントロール比  $6.1 \pm 5.5\%$  と有意な縮小を認めた (Figure5)。上記用量で十分な効果を認めたので、ドセタキセル (2 mg/kg) と NVP-BEZ235 (12.5 mg/kg) の投与量を減量して同様に検討を行った。コントロール群とドセタキセル単剤群および NVP-BEZ235 単剤群との間に有意差を認めなかったが、併用群では有意に腫瘍径の増大が抑制された (Figure6)。

Default dose of NVP-BEZ235 and docetaxel

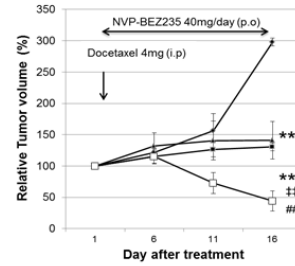


Figure5

Low dose of NVP-BEZ235 and docetaxel.

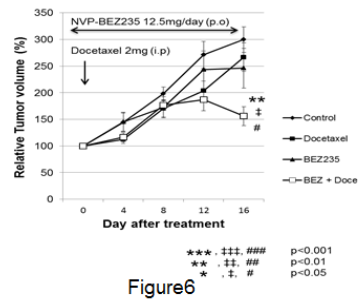


Figure6

(3) マウスの皮下腫瘍を摘出し、増殖の指標として組織免疫染色による Ki67 の発現を評価した。Ki67 index はコントロール群で  $54.0 \pm 4.5\%$ 、ドセタキセル単剤群で  $35.0 \pm 3.0\%$ 、NVP-BEZ235 単剤群で  $32.1 \pm 2.4\%$ 、ドセタキセルと NVP-BEZ235 併用群で  $12.1 \pm 1.3\%$  であった。併用群において有意に Ki67 の発現が抑えられていた (Figure7)。

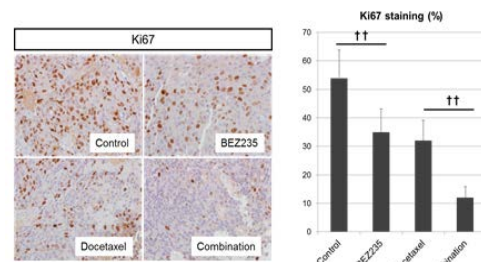


Figure7

同様にアポトーシスの指標として TUNEL assay 法による組織免疫染色を行った。腫瘍のアポトーシス index はコントロール群  $2.2 \pm 0.7$ 、ドセタキセル単独群で  $4.3 \pm 1.0$ 、NVP-BE2235 単独群で  $3.1 \pm 0.5$ 、併用群で  $12.0 \pm 1.1$  であった。ドセタキセル・NVP-BE2235 併用群で 1 有意にアポトーシスの導入が認められた (Figure8)。

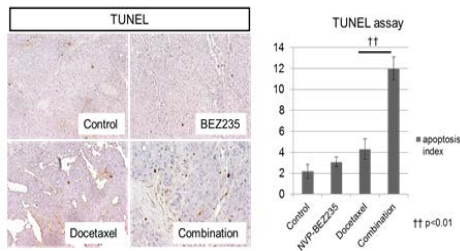


Figure8

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 8 件)

- 1) Yota Yasumizu, A new strategy for castration resistant prostate cancer with targeting to feedback mechanism of PI3K/Akt/mTOR pathway., American Urological Association Annual Meeting 2013, 2013/5/6, America
- 2) 安水 洋太, 去勢抵抗性前立腺癌におけるドセタキセル耐性機序克服の試み、第 101 回日本泌尿器科学会総会、2013/4/26、北海道
- 3) 安水 洋太, PI3K-Akt-mTOR シグナル経路の制御による去勢抵抗性前立腺癌のドセタキセル抵抗性改善に関する検討、第 22 回泌尿器科分子細胞研究会、2013/3/9、高知
- 4) 安水 洋太, Combination Therapy with PI3K-mTOR Pathway Inhibitor and Docetaxel in Castration Resistant Prostate Cancer, 第 71 回癌学会、2012/9/20、北海道
- 5) 安水 洋太, 去勢抵抗性前立腺癌に対する PI3K・mTORC1/2 阻害剤とドセタキセル併用効果についての検討、第 17 回がん分子標的治療学会、2012/6/28、福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安水 洋太 (YASUMIZU YOTA)  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号：40464854