

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861449

研究課題名(和文) 難治性前立腺癌におけるAkt経路とアンドロゲン受容体経路の制御による新規治療戦略

研究課題名(英文) New treatment strategy of refractory prostate cancer by regulation of androgen-androgen receptor axis and PI3K/Akt pathway

研究代表者

石岡 桂 (ISHIOKA, KATSURA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80573352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌の治療抵抗性の原因にAR axisとPI3K/Akt 経路の相補排他的フィードバック機構がある。そこで、去勢抵抗性前立腺癌細胞株C4-2、C4-2をアンドロゲン除去下で培養し有意にドセタキセル抵抗性を示すC4-2AT6細胞株にてPI3K/mTOR阻害剤(NVP-BEZ235)とAR阻害剤(アピラテロン、MDV3100)の併用療法を検討した。C4-2AT6はC4-2と比較しアンドロゲン受容体(AR)の亢進を認め、NVP-BEZ235の使用は濃度依存的にARの発現を亢進させた。またアピラテロン・MDV3100とNVP-BEZ235の併用でのC4-2AT6に対する殺細胞効果は有意でなかった。

研究成果の概要(英文)：Mutual exclusivity of androgen-androgen receptor axis (AR axis) and PI3K/Akt pathway by negative feedback is one of the contributing factor of resistance to treatment of prostate cancer, so we examined combination therapy of PI3K/mTOR inhibitor (NVP-BEZ235) and AR inhibitor (Abirateron and MDV3100). There is more expression of androgen receptor (AR) in C4-2AT6 than C4-2, and expression of AR increased by using NVP-BEZ235 dose-dependently. Secondly, we evaluated cell killing effectiveness of C4-2AT6 by combination therapy using WST assay, then cell killing effectiveness increased by using Abirateron, though not increased by using MDV3100 unexpectedly. There showed effectiveness of combination therapy in LNCaP which is androgen sensitive prostate cancer cell line, so the experimental result suggest that both inhibition of AR axis and PI3K/Akt pathway is not effective to prostate cancer cell line which achieved high grade of malignancy.

研究分野：医学系泌尿器科

キーワード：ドセタキセル抵抗性前立腺癌細胞株 アンドロゲン受容体阻害剤 PI3K/mTOR阻害剤 抗腫瘍効果 併用効果

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床上的の問題点

前立腺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割の症例で当初は奏効するものの、次第に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の治療法としてドセタキセルを用いた化学療法が広く行われているが、予後改善の寄与度はわずか3か月程度であり、新規治療戦略の確立は急務である。

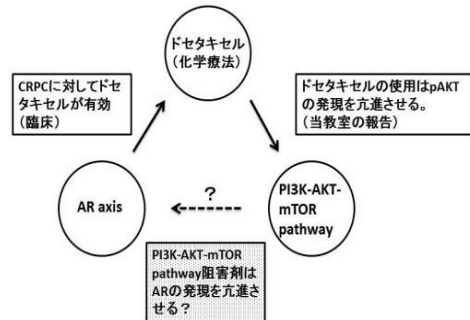
(2) CRPCに対する当教室の取り組み

当教室では前立腺癌細胞株C4-2をアンドロゲン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、ドセタキセル療法に対し耐性を有する。そこで我々はシグナル伝達の変化に着目し、ドセタキセル耐性獲得機序を解析している。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PI3K-Akt-mTOR pathwayを活性化し癌化を促進する。C4-2、C4-2AT6では共にPTEN欠損の形質を有するためAktのリン酸化の恒常的な亢進を認めるが、その発現には強弱があり、C4-2AT6において有意に亢進していた。またドセタキセルの投与はさらなるAktのリン酸化の発現を誘導することを発見した。PI3K-Akt-mTOR pathway阻害剤を用いて同pathwayの阻害を試みると、ドセタキセルはC4-2AT6において著明な抗腫瘍効果を示した。(Kosaka et al, J urol, 185, 2376-2381, 2011)

(3) 今後の展望

当教室でのこれまでの知見から、PI3K-Akt-mTOR pathwayの活性化がドセタキセル耐性獲得の主な要因の一つであることが明らかとなった。しかし、mTOR阻害剤単剤では、十分な抗腫瘍効果を示さない。その原因として negative feedbackの存在・他のpathwayの活性化の関与が報告されている。CRPCの制御においてPI3K-Akt-mTOR pathwayに加えて、これらのpathwayの制御が重要である。

前立腺癌においてPI3K-Akt-mTOR pathwayとアンドロゲン-アンドロゲンレセプター軸 (AR axis) において、相互依存性のかつ排他的なフィードバック機構の存在が報告され、CRPCとなった後も多くの場合アンドロゲンレセプター (AR) の強発現を認め、AR axisは重要なシグナル伝達経路である。そこで、AR axisに着目し、



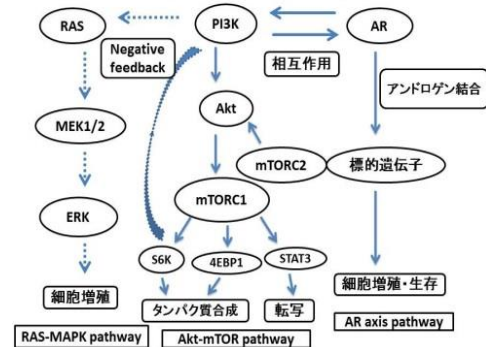
・CRPCにおけるシグナル伝達機序の解明
 ・各pathwayの制御を組み合わせることによる新規治療戦略の確立を本検討の目的とする。

PI3K-Akt-mTOR pathwayとの相互依存性フィードバック機構を明らかにすることがCRPCの新規治療戦略を確立する上で極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

CRPCの進展には様々なpathwayが複合的に関与しており、あるpathwayの制御により他のpathwayが活性化することが報告されている。今回、PI3K-Akt-mTOR pathway・AR axisに着目し、CRPCにおけるシグナル伝達機序の解明を試みるとともに、各pathwayの阻害剤及びドセタキセルを組み合わせることが治療抵抗性を改善して新たな治療戦略につながるか検討する。具体的に以下の3点を本研究における目的と考えた。

<前立腺癌細胞増殖に関する各pathwayの関連性>



(1) CRPC 細胞株 C4-2・C4-2AT6 に対して

mTORC1 阻害剤 (RAD001:Everolimus)、PI3K・mTORC1/2 阻害剤 (NVP-BEZ235) を使用した際の PI3K-Akt-mTOR pathway のシグナル変化を Western blot 法を用いて検討し、シグナル経路の阻害作用を比較検討する。

- (2) CRPC 細胞株 C4-2・C4-2AT6 に対して mTORC1 阻害剤 (Everolimus)、PI3K・mTORC1/2 阻害剤 (NVP-BEZ235) を使用した際の殺細胞効果を、WST assay を使用して、評価する。
- (3) WST assay を用いて PI3K・mTORC1/2 阻害剤 (NVP-BEZ235) と AR シグナル伝達阻害剤 (MDV3100)・アンドロゲン合成阻害剤 (Abiraterone) の併用療法の C4-2AT6 に対する殺細胞効果を検討する。

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、Everolimus : mTOR 阻害剤、NVP-BEZ235 : 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) NVP-BEZ235 と併用して、AR シグナル伝達阻害剤 (MDV3100)・アンドロゲン合成阻害剤 (abiraterone) を使用し、C4-2AT6 に対する殺細胞効果を検討する。

4. 研究成果

- (1) C4-2 及び C4-2AT6 に対する PI3K/Akt/mTOR pathway 阻害効果

Western blotting を用いて C4-2 及び C4-2AT6 における PI3K/Akt/mTOR pathway の活性化を評価した。C4-2AT6 では C4-2 と比較して有意に Akt のリン酸化 (pAkt)・pS6 のリン酸化 (pS6) の発現が亢進していた。細胞の免疫組織化学においても同様の結果であった (Figure1)。これらの結果か

ら、アンドロゲン除去は AKT シグナル経路を有意に亢進させ、長期間アンドロゲン除

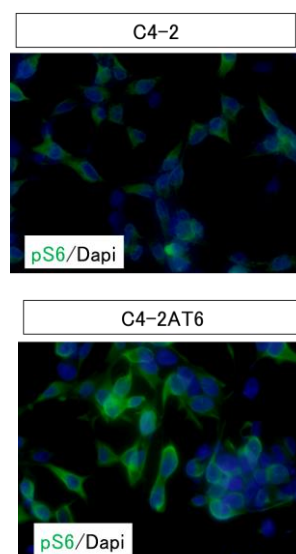


Figure1

去環境にあった C4-2AT6 に対して Everolimus や NVP-BEZ235 のような PI3K/Akt/mTOR pathway 阻害剤が有効性を示す可能性が示唆された。

- (2) C4-2 及び C4-2AT6 に対する Everolimus 及び NVP-BEZ235 の殺細胞効果

C4-2 及び C4-2AT6 に対する Everolimus/NVP-BEZ235 の殺細胞効果を WST assay 法を用いて評価した。同検討においては去勢抵抗性前立腺癌に対する標準的治療法であるドセタキセル (DTX) との併用についても検討した。Everolimus と NVP-BEZ235 の両剤において、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 (Figure2)。100 nM の Everolimus に曝露した C4-2AT6 の cell viability ($58.2 \pm 5.1\%$) と 50nM の NVP-BEZ235 に曝露した C4-2AT6 の cell viability ($56.3 \pm 3.8\%$) はいずれも約 60% 程度とほぼ同等の効果を示した。一方、DTX (5nM) との併用において NVP-BEZ (50nM) は $36.2 \pm 4.1\%$ の殺細胞効果を示したのに対して、Everolimus (100nM) は $42.1 \pm 3.1\%$ と有意に殺細胞効果は劣った (Figure3)。DTX 単独 (5nM) では cell viability は $59.8 \pm 4.2\%$ 、NVP-BEZ235 単独では $41.2 \pm 3.8\%$ であったのに対し、NVP-BEZ235 (500nM) との併用では $11.5 \pm 1.3\%$ であり、Combination Index (CI) は 0.39 で相乗効果を認めた。

以上の結果から、アンドロゲン除去環境

におかれた去勢抵抗性前立腺癌に対して NVP-BE235 と DTX の併用が高い抗腫瘍効果

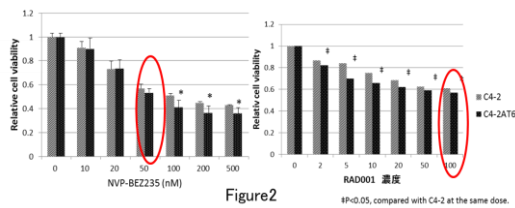


Figure2

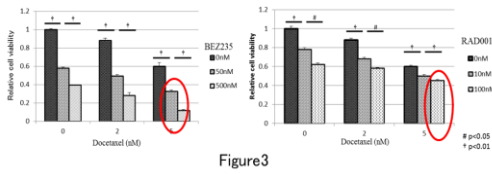


Figure3

を示す事が示唆された。

- (3) NVP-BE235 と AR シグナル伝達阻害剤 (MDV3100) ・アンドロゲン合成阻害剤 (Abiraterone) の併用による C4-2AT6 に対する殺細胞効果

C4-2AT6 のマウス皮下腫瘍モデルを作成し、NVP-BE235 と DTX の併用効果について検討したところ、NVP-BE235 及び DTX の単剤と比較して併用療法は優位に高い抗腫瘍効果を確認した。しかし、長期間にわたって投与を継続したところ腫瘍の再増大を認め、免疫組織化学では PI3K/Akt/mTOR pathway の再活性化を認めた (Figure4)。これらの結果から、長期

C4-2AT6 (mouse xenograft model)

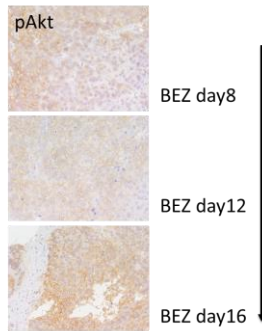


Figure4

間の PI3K/Akt/mTOR 阻害は Feedback 経路を開始したリン酸化の再エントリーを引き起こすことが示唆された。

そこで、AR axis を介した Feedback 経路に着目し、NVP-BE235 と AR シグナル伝達阻害剤やアンドロゲン合成阻害剤との併用効果について検討した。まず C4-2AT6 における NVP-BE235 使用時の AR の発現について Western blotting 法を用いて評価した。C4-2AT6 は C4-2 と比較して有意に AR の発現の亢進を認めた。また、NVP-BE235 (100nM) は、C4-2 及び C4-2AT6 において AR の発現を

活性化した (Figure5)。すなわちアンドロゲン除去環境に長期間曝露された C4-2AT6 において AR の発現が亢進しており、PI3K/Akt/mTOR pathway の抑制は AR axis へ

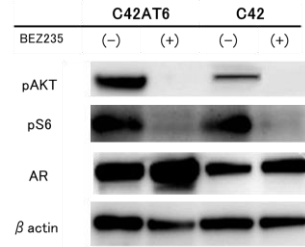


Figure5

の dependency の増強を引き起こした。これらの結果から C4-2AT6 に対する NVP-BE235 と AR シグナル伝達阻害剤、あるいはアンドロゲン合成阻害剤の併用は高い抗腫瘍効果を示すことが示唆された。そこで、C4-2AT6 に対する NVP-BE235 と AR シグナル伝達阻害剤 (MDV3100) 及びアンドロゲン合成阻害剤 (Abiraterone) との併用による殺細胞効果を WST assay を用いて評価した。しかし、当初の予想と反して、NVP-BE235 と Abiraterone との併用は若干の殺細胞効果の上昇を認めたものの MDV3100 と NVP-BE235 の併用療法は C4-2AT6 に対して有効性を示さなかった (Figure6)。アンドロゲン感受性前立腺細胞株である LNCaP ではこれらの薬剤の併用の有効性が報告されている。これらの結果から、アンドロゲン除去環境下に長期間曝露されることで高い悪性度を獲得した前立腺癌細胞では AR axis と PI3K/Akt pathway の同時阻害は十分な有効性を示さないことが示唆された。今後、包括的なリン酸化制御についての検討が必要と考えられる。

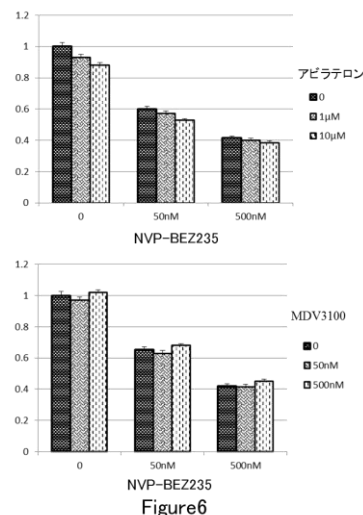


Figure6

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石岡 桂 (Ishioka Katsura)

慶応義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 80573352

(2) 研究協力者

小坂 威雄 (Kosaka Takeo)

慶応義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 30445407

菊地 栄次 (Kikuchi Eiji)

慶応義塾大学・医学部・講師

研究者番号 : 10286552

宮嶋 哲 (Miyajima Akira)

慶応義塾大学・医学部・講師

研究者番号 : 90245572

大家 基嗣 (Oya Mototsugu)

慶応義塾大学・医学部・教授

研究者番号 : 00213885