

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462406

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌に対するユビキチン-プロテアソーム系を標的とした治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel therapeutic strategy for castration-refractory prostate cancer targeting ubiquitin-proteasome system

研究代表者

小中 弘之 (KONAKA, Hiroyuki)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：40334768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)に対する新規治療法の確立には、再燃メカニズムの解明は必要不可欠である。共にユビキチン-プロテアソーム系によって制御される転写因子NF-kappa Bのシグナル伝達系と小胞体ストレス応答系という新たな観点から前立腺癌の再燃メカニズムの解明を試みた。再燃メカニズムの1つとして、NF-kappa Bの恒常的な活性化と小胞体ストレスからの継続的な回避が示されたと共に、ユビキチン-プロテアソーム系を創薬標的とした治療戦略がCRPCに対する新規治療となりうる可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Elucidating a comprehensive mechanism through which most patients with advanced prostate cancer have an initial response to androgen deprivation therapy, but eventually progress to a castration-resistant state is critical to establish a novel treatment strategy for castration refractory prostate cancer (CRPC). We investigated the mechanism for the emersion of CRPC from the perspective of ubiquitin-proteasome system regulating both NF-kappa B and unfolded protein response (UPR) activation. Our study suggested that constitutive NF-kappa B activation and successive escape from endoplasmic reticulum stress might be one of mechanism for CRPC emersion, and that trying development of new drugs with targeting for ubiquitin-proteasome system might be a novel therapeutic strategy for the management of CRPC.

研究分野：腫瘍学

 キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 再燃メカニズム ユビキチン-プロテアソーム系 NF- B 小胞体ストレス UPR
 シグナル伝達 クロストーク

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌はその大部分がアンドロゲン依存的にアンドロゲン受容体(AR)を介して増殖するため、アンドロゲン除去(去勢)を根幹としたホルモン療法が有効である。進行性前立腺癌においても初期にはホルモン治療が約80%以上で有効であるが、その半数以上は5年以内にアンドロゲン非依存性となり再燃する。このようなCRPCの予後は極めて不良であり、標準治療であるDocetaxelが投与されても、ほとんどの症例は数年以内に死亡する。現在までもGVAX, Abiraterone, MDV3100, Zibotentan等の新たな創薬が開発されるが、依然としてCRPCの予後は改善されていない。従って、CRPCに対する新たな治療戦略の確立とその再燃メカニズムの解明は我々に課せられた大きな使命と言っても過言ではない。これまで我々は再燃に関与するシグナル伝達系の1つとして、NF- κ Bに着目して研究をすすめてきた。NF- κ Bは転写因子の一つで、その活性化が癌細胞の増殖促進、アポトーシス抑制、血管新生誘導、転移浸潤能を引き起こすことが知られており、乳癌をはじめとして、肺癌、甲状腺癌、メラノーマ、膀胱癌、腎癌、大腸癌、白血病等の多くの悪性腫瘍において恒常的なNF- κ B活性化が報告されている。また、NF- κ BはERストレスによって活性化される転写因子の一つでもある。ERストレスが加わると細胞は直ちにストレスから回避するための防御システムを活性化させる。3つのセンサー膜貫通タンパク質: PERK, IRE1, ATF6が小胞体に蓄積した変性タンパク質やミスフォールドタンパク質を検出することによって、シグナル伝達経路が活性化し、UPRと呼ばれる細胞応答が起こる。UPRによってタンパク質合成の抑制と変性タンパク質のリフォールディングが引き起こされ、ERAD(ER Associated Degradation)を介したミスフォールドタンパク質の分解除去が促進される。一方、ERストレスが過剰な場合あるいは長時間持続する場合においてはアポトーシスによる細胞死が誘導される。NF- κ B活性化およびERADはユビキチン-プロテアソーム系によって制御されている。ユビキチン-プロテアソーム系は標的タンパク質に対する選択的なタンパク質分解システムであり、その破綻は癌をはじめとした数多くの疾患を引き起こす。プロテアソームは、NF- κ Bの阻害分子I κ Bを分解することでNF- κ Bの活性化を促進する一方で、蓄積した異常タンパク質を分解することでERストレスを減少させる。従って、ユビキチン-プロテアソーム系を標的とした治療戦略として、プロテアソームを阻害することによって、NF- κ B活性化を抑制すると共にERストレスを増大させ、癌の病勢を制御できる可能性が示唆される。近年、ユビキチン-プロテアソーム系

を標的とした創薬の研究開発が盛んになり、既にプロテアソーム阻害剤Bortezomib(別名PS-341,商品名Velcade®)が多発性骨髄腫の治療薬として臨床応用に至っているのは周知のとおりである。

我々は従事した過去の基盤研究(C)-「ホルモン非依存前立腺癌に対する遺伝子治療を根幹とした新たな集学的治療戦略の確立」(平成16-17年度)、「ホルモン不応性前立腺癌におけるNF- κ B活性化の意義とその経路を標的とした治療戦略」(平成18-19年度)、「再燃前立腺癌におけるエストロゲン受容体を介したシグナル伝達機構の包括的解明」(平成20-22年度)、「核内受容体・NF- κ Bクロストークを標的とした去勢抵抗性前立腺癌に対する治療戦略」(平成23-25年度)において、前立腺癌の再燃初期にNF- κ B活性化が関与することを示すとともに、NF- κ BとAR/NF- κ BとGRのクロストークについても言及した;また、前立腺癌におけるGRおよびERの役割を明らかにし、GR/ERを標的とした遺伝子治療の可能性を示した。これら成果の中で特に強調すべき点は、恒常的なNF- κ B活性化がアンドロゲン非感受性前立腺癌細胞株PC-3, DU145に認められたこと、アンドロゲン感受性前立腺癌細胞株LNCaPにおいては、その増殖に必須のアンドロゲンを除去することによって、アンドロゲン存在下ではほとんど認められなかったNF- κ B活性が亢進した点にある。すなわち、NF- κ B活性化こそが、アンドロゲン依存性からCRPCへのシフトに関わるイニシエーターとなりうる可能性が示唆された。また、我々は、NF- κ Bの結合部位がPSAプロモーターのアンドロゲン応答配列(ARE)近傍に存在することを見出し、活性化されたNF- κ BがARと拮抗することによって、ARを介するPSAの発現が抑制されることを報告した。(Biochem J. 2004)

以上の学術的背景から、CRPCにおいて恒常的なNF- κ B活性化が再燃メカニズムの一つとして重要な役割を担い、NF- κ B活性の阻害がCRPCに対する治療戦略の1つになりうる可能性が示唆される。更に、アンドロゲン除去という飢餓環境下で誘発されたCRPCにおけるERストレスの程度と再燃メカニズムとの関連にも焦点を当てて、ERストレスの外因性制御がCRPCに対する治療戦略の1つになりうるか否かについても検討する。究極的なゴールとしてユビキチン-プロテアソーム系を標的としたCRPCに対する包括的治療戦略を構築する。

2. 研究の目的

過去のこれまでの前立腺癌に関する基盤研究の成果を踏襲して、今回われわれは、ともにユビキチン-プロテアソーム系によって制御されているNF- κ BとUPRのシグナ

ル伝達経路に注目し、標的タンパク質に対する選択的なタンパク質分解システムという新たな観点から前立腺癌の再燃メカニズムを解明すると共に、ユビキチン-プロテアソーム系を制御することによって、CRPC に対する新たな包括的治療戦略を構築する。さらに、CRPC における NF- κ B と UPR に関する転写因子のクロストークの有無ならびに、その基礎的及び臨床的意義についても明らかにする。CRPC における ER ストレスの状態と NF- κ B 活性のステータスを、前立腺癌細胞株と前立腺癌ヒト組織アレイを用いて解析する。次に NF- κ B と UPR の活性化に関する転写因子との相互作用の詳細を解明する。すなわち、NF- κ B と XBP-1, NF- κ B と p50ATF6, NF- κ B と ATF4 のクロストークの有無を検討する。さらに、CRPC に対する治療戦略として 1) NF- κ B 活性化を特異的に阻害する分子標的治療、2) ユビキチン-プロテアソーム系を標的とした創薬による治療(ユビキチン修飾系阻害剤あるいはプロテアソーム阻害剤)-を計画しており、in vitro, in vivo で検討を加え、その有用性を検討する。

本研究の学術的な特色は、CRPC における再燃メカニズムの解明と新たな治療戦略の構築を第一義とし、ユビキチン-プロテアソーム系の代表的な転写因子である NF- κ B に着目した点にある。また、ER ストレス下で誘導される UPR の活性化に関わる転写因子群と NF- κ B のクロストークの解析のみならず、ユビキチン-プロテアソーム系を標的とした治療戦略によって NF- κ B および UPR の両方のシグナル伝達経路を制御するというのは革新的な発想である。CRPC における転写制御機構の何らかの破綻がその再燃に関与しているという仮説に基づけば、ユビキチン-プロテアソーム系を標的とした CRPC に対する新規治療戦略は極めて有望である。これまでの前立腺癌の基礎研究においては、CRPC における ER ストレスおよび UPR シグナル伝達系から再燃のメカニズムを検討した研究は極めて少なく、NF- κ B と UPR シグナル伝達系のクロストークという視点からの前立腺癌の基礎研究は独創的かつ斬新と考えられる。

本研究から予想される結果と意義として、CRPC を誘導しうるアンドロゲン除去という飢餓的環境下において NF- κ B と UPR の活性化が促進され、両者をユビキチン-プロテアソーム系を標的とした創薬で制御することが、今後、CRPC に対する治療戦略として大きなブレークスルーになりうると確信する。実臨床を考慮した場合、多発性骨髄腫に対する Bortezomib の成功例からも、NF- κ B を抑制し ER ストレスを増強するプロテアソーム阻害剤が現実的であり、現在臨床応用が模索されている Carfilzomib (PR-171) や Ixazomib (MLN2238, MLN9708) が CRPC に対する治療薬となりうる可能性は

十分にあり、その社会的意義は極めて大きい。

3. 研究の方法

(1) ER ストレスの状態

アンドロゲン依存性前立腺癌株 LNCaP, アンドロゲン非依存性前立腺癌株 PC-3, DU145, (正常前立腺上皮細胞 PrEC, 正常前立腺間質細胞 PrSC を用いて、ER ストレス誘導効果を有する thapsigargin あるいは tunicamycin で処理後、MTT アッセイで増殖抑制効果を判定し、ウエスタンブロット、タンパク合成アッセイ、XBP1 スプライシング解析などを通して ER ストレス状態を把握する。ER ストレス検出キット: ERAI ER Stress Detector HDAR(株式会社トランスジェニック)も積極的に使用し、ER ストレス解析の一助とする。また、転写因子: XBP-1, p50-ATF6, ATF4 の発現、局在のプロファイルにつき、RT-PCR 法と Western-blot 法によって、mRNA とタンパク質レベルで調べる。また、癌化ヒト組織アレイ Human Neoplastic Tumor Tissue Microarray シリウス(タカラバイオ社)の前立腺版を用いて、転写因子の発現、局在を同様に解析する。

(2) 発現ベクターの構築

CMV プロモーターによって XBP-1, p50-ATF6, ATF4 がドライブされる発現ベクター: pCMV-XBP-1, pCMV-p50-ATF6, pCMV-ATF4 をそれぞれ構築する。発現ベクターが機能するか調べるため、LNCaP 細胞に FuGENE6 を用いてプラスミドを一過性に導入後、XBP-1, p50-ATF6, ATF4 の mRNA、タンパクの発現をそれぞれ RT-PCR 法、Western-blot 法にて確認する。

(3) UPR と NF- κ B のクロストーク

LNCaP, PC-3, DU145 を thapsigargin あるいは tunicamycin で処理後、ER ストレスによって誘導される UPR 転写活性が、NF- κ B 転写活性を抑制するか否かを NF- κ B プロモーター活性、Western-blot 法、免疫染色を用いて調べる。NF- κ B プロモーター活性については、以前構築した pGL3-3x NF- κ B-Luc を用いてルシフェラーゼアッセイにて検討する。また、pCMV-XBP-1, pCMV-p50-ATF6, あるいは pCMV-ATF4 それぞれと pGL3-3x NF- κ B-Luc を前立腺癌細胞株に co-transfect して NF- κ B プロモーター活性も評価する。

(4) NF- κ B の活性阻害による in vitro 殺細胞効果

いかにして NF- κ B 活性を効率良く阻害するかを以下の方法で、以前樹立した LNCaP-SF 細胞(アンドロゲンフリーで培養可能)及び LNCaP-NF- κ B 細胞(p65 を強制発現)を用いて、in vitro における殺細胞効果を WST-assay にて比較検討する。さらに、殺細胞効果が認められた細胞にアポトーシスが起きているか、Tunel assay あるいは Annexin-V assay にて解析する。

ドミナントネガティブ...IKK によって I B がリン酸化をうけるセリン 32 と 36 の部位をアラニンにかえた変異体タンパク SR-I B の発現ベクターを用い, I B のリン酸化を阻害する.

デコイ... B コンセンサス配列 NNGGGAMTTTCCNN を有する二本鎖 DNA を, M あるいは N の塩基を変えて数種類作製予定である. また, Gal4 コンセンサス配列 CGGAGTACTGTCCCTCC を有する二本鎖 DNA を合成し, コントロールとして使用する.

siRNA... 業者に委託して作製した数種類を実験に使用する.

プロテアソーム阻害薬... Bortezomib (VercadeTM) は, タンパクの制御において中心的な役割を担うユビキチン・プロテアソーム系を標的分子とした新規薬剤で, I B のプロテアソームによる分解を阻害することで NF- B 活性化を抑制する. 既に本邦でも多発性骨髄腫に対して臨床応用されている. また, 実験用試薬として発売されており, なおかつ現在第 I 相試験も始まっている強力なプロテアソーム選択的阻害剤:

Carfilzomib (PR-171) や Ixazomib (MLN2238, MLN9708) も使用する. なお, 1) ~ 3) は, トランスフェクション試薬: FuGENE6 を用いて細胞導入し, 4) については各種の濃度設定で培養液に添加する.

(5) SCID マウスを用いた担癌モデルの作成

LNCaP 細胞をマトリジェルと共に SCID マウスの背部皮下に移植し, 皮下腫瘍の形成を確認後, 除睾術を施行して腫瘍が再形成されたものを去勢抵抗性前立腺癌のモデルとして以下の実験に使用する.

(6) NF- B 阻害薬による in vivo 抗腫瘍効果

担癌モデルに対して, プロテアソーム阻害薬: Bortezomib, Carfilzomib, Ixazomib の腹腔内投与とドミナントネガティブ: SR-I B のアデノウイルスベクターの局所投与による in vivo 抗腫瘍効果を検討する. 抗腫瘍効果は腫瘍のサイズを経時的に計測し, コントロールと比較検討することによって評価する.

(7) アデノウイルス発現ベクターの作製

既に構築した pCMV-XBP-1, pCMV-p50-ATF6, pCMV-ATF4 プラスミドから CMV プロモーターと XBP-1, p50-ATF6 あるいは ATF4 をインサートとして切り出し, コスミドベクターに挿入する. このコスミドと Eco T22I 処理を行った DNA-TPC を, E1A・E1B を恒常的に発現している 293 細胞へトランスフェクションして, ウイルス DNA とコスミド DNA との相同組み換えによりアデノウイルスベクター(Ad-CMV-XBP-1, Ad-CMV-p50-ATF6, Ad-CMV-ATF4) を作製する.

(8) ER ストレス誘導とアデノウイルスベクター局注による造腫瘍効果

担癌マウスに Ad-CMV-XBP-1, Ad-CMV-p50-ATF6, Ad-CMV-ATF4 を腫瘍内局注後, 腹腔内に thapsigargin あるいは tunicamycin を投与して, in vivo 造腫瘍効果を検討する. コントロールとして Ad-CMV-GFP を腫瘍内局注したマウスに thapsigargin あるいは tunicamycin を投与した群と比較する.

(9) 改良 PSA プロモーターを用いた癌特異的発現ベクター構築

PSA プロモーター領域に修飾を加え, 野性型の 3 倍以上のプロモーター活性を有する新たな XPSA プロモーターを構築済である. その下流に XBP-1, p50-ATF6, ATF4 を挿入し, 同様にアデノウイルスベクター(Ad-XPSA-XBP-1, Ad-XPSA-p50-ATF6, Ad-XPSA-ATF4) を作製し, 同様に造腫瘍効果を検討する.

4. 研究成果

去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)に対する新規治療法の確立には, 再燃メカニズムの解明は必要不可欠である. 本研究の目的は, ユビキチン・プロテアソーム系という新たな観点から前立腺癌の再燃メカニズムを解明すると共に, ユビキチン・プロテアソーム系を創薬標的としたCRPC に対する包括的治療戦略の構築にある. NF-κB は転写因子の一つで, その活性化が癌細胞の増殖促進, アポトーシス抑制, 血管新生誘導, 転移浸潤能を引き起こすが, NF-κB は小胞体ストレスによっても活性化される. 小胞体ストレスが加わると, 細胞はUPR(unfolded protein response) のシグナル伝達が活性化することによってストレスから回避する一方で, 小胞体ストレスが過剰すぎる場合には, 同防御システムで 対処しきれずアポトーシスが誘導される. これらのNF-κBと UPR のシグナル伝達経路がともにユビキチン・プロテアソーム系によって制御されていることより, CRPCにおける NF-κB とUPR のクロストークに関する基礎的及び臨床的意義について検討した.

アンドロゲン依存性前立腺癌株 LNCaP, アンドロゲン非依存性前立腺癌株 PC-3, DU145, 正常前立腺上皮細胞 PrEC, 正常前立腺間質細胞 PrSCを用いて, ER ストレス誘導効果を有する thapsigargin あるいは tunicamycin で処理後, MTT アッセイで増殖抑制効果を判定し, ウェスタンブロット, タンパク合成アッセイ, XBP1 スプライシング解析などを通して ER ストレス状態を確認し, 転写因子: XBP-1, p50-ATF6, ATF4の発現, 局在のプロファイルにつき, RT-PCR 法と Western-blot 法によって, mRNA とタンパク質レベルで検討した. しかし, 癌化ヒト組織アレイ Human Neoplastic Tumor Tissue Microarray シリーズ(タカラバイオ社)の前立腺版を用いた, 転写因子の発現, 局在の検討においては, その結果にバラツキが認められたため,

何度か再検討したが、結局ところ有意な結果が得られなかった。

また、前立腺癌における小胞体ストレスの状態、UPR 活性化のステータス、発現ベクターの構築、NF-κB 活性化阻害による殺細胞効果等の in vitroでの実験に加えて、in vivo実験に向けての準備を進めたが、SCIDマウスを用いた担癌モデルの作成に難渋したため、in vivoの実験の進捗に支障をきたす結果となった。さらに、CMVプロモーターによる XBP-1, p50-ATF6, ATF4 の発現ベクター：pCMV-XBP-1, pCMV-p50-ATF6, pCMV-ATF4 の構築がうまくいかず、今後も引き続き、UPR と NF-κB のクロストークの検討および、NF-κB の活性阻害による in vitro 殺細胞効果の検討を継続する予定ではあるが、総じて不本意な結果となった。

去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) に対する新規治療法の確立には、再燃メカニズムの解明は必要不可欠である。共にユビキチン-プロテアソーム系によって制御される転写因子 NF-κB のシグナル伝達系と小胞体ストレス応答系という新たな観点から前立腺癌の再燃メカニズムの解明を試みた。今回の実験を通じて、明確な証明はできなかったが、再燃メカニズムの1つとして、NF-κB の恒常的な活性化と小胞体ストレスからの継続的な回避が示されたと共に、ユビキチン-プロテアソーム系を創薬標的とした治療戦略が CRPC に対する新規治療となりうる可能性も示唆された。今後の展望としては、NF-κB と UPR とのクロストークを中心に検討したい。

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 2件)

1. Experience with androgen deprivation therapy for prostate cancer in Japan and future perspectives.

Kitagawa Y, Ueno S, Konaka H, Mizokami A, Hinotsu S, Akaza H, Namiki M. Curr Cancer Drug Targets. 2015;15(4):314-26. Review. 査読有り

2. SOD3 acts as a tumor suppressor in PC-3 prostate cancer cells via hydrogen peroxide accumulation.

Kim J, Mizokami A, Shin M, Izumi K, Konaka H, Kadono Y, Kitagawa Y, Keller ET, Zhang J, Namiki M. Anticancer Res. 2014 Jun;34(6):2821-31. 査読有り

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小中 弘之 (Konaka Hiroyuki)

金沢大学・附属病院・講師
研究者番号：40334768

(2)研究分担者

北川 育秀 (Kitagawa Yasuhide)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号：00452102

角野 佳史 (Kadono Yoshifumi)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：10397218

京 哲 (Kyo Satoru)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：50272969