

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861299

研究課題名(和文) 前立腺癌のがん幹細胞性遺伝子ネットワークを標的とした新規治療戦略

研究課題名(英文) New strategy of Identifying a candidate drug of reprogramming prostate cancer by targeting gene network

研究代表者

小坂 威雄 (KOSAKA, TAKEO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30445407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌(Castration Resistant Prostate Cancer: CRPC)は難治性である。申請者は難治癌における治療抵抗性獲得プロセスと、多能性幹細胞誘導・獲得プロセスの類似点に着目し、新規薬剤スクリーニング系を確立し報告してきたが、本研究は抗がん治療耐性を内包する遺伝子ネットワークを標的とし、既存薬剤を用いた抗がん剤治療耐性癌から感受性癌へのネットワークへの再プログラム化による新規治療戦略の確立を目的とし、バイオインフォマティクスを応用し、ヒト臨床検体におけるデータベースの解析から、有意に変化した細胞周期調節因子を同定した。引き続き解析を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Recently, new generation anti-androgen drugs and a new generation taxane, cabazitaxel have received a lot of attention as high potent agents for CRPC. However, response rate and overall survival benefit of these drugs are limited. In this study, we investigated gene expression profiles of prostate cancer using the whole human genome microarray and compared using Connectivity Map to identify candidate drugs with the potential to revert tumor's metastatic properties. We found a candidate drug that can possibly overcome refractory prostate cancer.

研究分野：前立腺癌

 キーワード：前立腺癌 幹細胞 薬剤耐性 去勢抵抗性前立腺癌 C4-2AT6 バイオインフォマティクス ドラッグリ
 ポジショニング リプログラミング療法

1. 研究開始当初の背景

本邦において欧米諸国のように前立腺癌の罹患率が、高齢化や検診の普及により増加傾向で2020年に男性の癌罹患率第1位になると想定されている。早期の前立腺癌に対しては、手術・放射線による根治が可能となってきたが、去勢抵抗性前立腺癌 (Castration Resistant Prostate Cancer: CRPC) は難治性である。現在我が国で使用可能な薬剤はドセタキセル(DOC)のみで、今後登場が予想される新規薬剤にしても、その有用性は3-6カ月であるのが現状でありCRPCに対する新規治療戦略の確立は泌尿器科に課せられた急務の課題である。幹細胞医学の分野において京都大学の山中教授らは、4つの転写因子(Klf4, Oct3/4, Sox2, c-Myc)の導入によって、最終分化型の体細胞から直接ES細胞様の多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPSCs)を誘導できることを発見した(Cell 2006, Cell 2007)。iPSCs誘導時に用いる転写因子群は、胚性幹細胞(ES細胞)で多能性の維持に重要な働きをしており、山中因子の導入により、多能性幹細胞としての遺伝子発現ネットワークを形成し、エピジェネシスの変化・修飾への寄与が推測されている。一方、がん研究の分野に目を転じると、様々ながんにおいて、幹細胞様の遺伝子ネットワークを獲得したがん細胞、もしくは元来そうしたネットワーク有しているがん細胞が、難治性の浸潤・転移がんや、抗がん剤抵抗性に寄与することが次第に明らかになってきた(Nature Genetics 2010)。蓄積されたゲノム異常と腫瘍組織内の様々な微小環境の影響を受けながら形成された幹細胞様の遺伝子ネットワークはエピジェネシスの変化・修飾へと寄与し、難治性の形質獲得に寄与していると推測される。申請者は難治性がんにおける幹細胞性・治療抵抗性獲得のプロセスと、山中因子による体細胞からのiPS細胞誘導・獲得プロセスに類似性を見出している。しかし、難治性がんに対して、幹細胞様の遺伝子ネットワークを制御することの重要性は認識できていても、その制御する有用な手段・薬剤ないため、このような幹細胞性制御の基礎的知見の臨床への応用には至っておらず、その制御機構の解明とヒト臨床応用は急務の課題である。

2. 研究の目的

申請者は、本研究に先駆けて、ヒトiPS細胞の実験系で、幹細胞性因子の内因性の発現とGFP発現下で多能性幹細胞をスクリーニングできる実験系を応用し、幹細胞性因子の発現が高い細胞群を選択できるウイルスベクターを作成の上、ヒト前立腺癌細胞株に遺伝子導入し、幹細胞誘導転写因子の発現が内因性に高い安定した細胞株の樹立に成功した。この細胞株の性質を遺伝子導入する前の細胞株と比較し、ヌードマウスにおいてわずか1000個の細胞でも生着でき、がん原性が高ま

っていること(がん幹細胞性の獲得) 抗がん剤ドセタキセル(DOC)に対する感受性が*in vitro*でも*in vivo*でも低下しており、抗がん治療抵抗性を獲得していること(抗がん治療耐性能の獲得)を明らかにした。マイクロアレイ解析にて、親株と幹細胞性因子の発現が高い細胞株の遺伝子発現プロファイルを比較し、バイオインフォマティクスを応用し、理論的に抗がん治療抵抗性遺伝子プロファイルに抗がん剤感受性プロファイルに初期化し得る候補既存薬をリストアップした。*in vitro*にて検証し有効であった薬剤を同定し、*in vivo*における検証でも有効性を確認でき、臨床応用可能な薬剤として報告した(Kosaka T et al. Cancer Sci 2013)。この実験系はその独創性と発展性の高さから発表誌のハイライトとして取り上げられた。申請者はこれらをProof of concept (POC)として臨床試験中である。

上記の背景とこれまでの研究成果のプラットフォームをもとに、本研究はがん幹細胞性・抗がん治療耐性遺伝子ネットワークを有する難治性前立腺癌の、抗がん剤治療耐性癌から抗がん剤感受性癌への遺伝子ネットワークへの転換・初期化・再プログラム化に基づいた、革新的な臨床応用に向けた新規治療戦略の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 難治性前立腺癌における遺伝子ネットワークからのバイオインフォマティクスを応用した、新規がん幹細胞・エピジェネシス関連マーカーの同定: 申請者は、オープンソースで体系的に収集され公開されているヒト臨床にて投与可能な薬剤を種々のがん細胞株に投与した際の遺伝子プロファイルと、ヒト臨床検体における転移病巣と原発巣の遺伝子データベースを入手し、これらの遺伝子発現プロファイルを申請者独自のアルゴリズムとバイオインフォマティクスで分析・解析することで新規幹細胞関連マーカーを同定する。

(2) 新規がん幹細胞性、抗がん剤耐性を有する前立腺癌細胞株の樹立:

: ヒト前立腺細胞株LNCaPをアンドロゲン除去環境下で長期間(6-24月間)培養し新規にCRPCヒトPCa細胞株LNCaPAT6/12/18 (ADT for 6, 12, 18, months)の樹立を試みる。ヒトCRPC細胞株C4-2をアンドロゲン除去環境下で長期間(6-24月間)培養し新規にCRPCヒトPCa細胞株C4-2AT6/12/18 (ADT for 6, 12, 18months)の樹立を試みる。

(3) 新規再プログラム化候補薬剤の選択と同定: 1, 2にて同定・樹立した幹細胞性の高い、抗がん治療耐性細胞株の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析にて比較し、バイオインフォマティクスの手法である、主成分分析と相関係数を応用したコネクテ

イビティマップ(CMAP: Broad institute of MIT & Harvard)が作成した遺伝子発現のデータベースで、様々な細胞に様々な薬剤を作用させて変化する遺伝子発現を網羅的に解析したものから既存薬剤のうち生物数理情報工学における理論上において、幹細胞性・抗がん治療耐性プロファイルが抗がん剤感受性プロファイルへと初期化し得る候補薬剤をリストアップする。

4. 研究成果

(1) ヒト臨床検体における転移病巣と原発巣の遺伝子データベースの解析から、ヒストン修飾酵素の関連パスウェイが有意に変化していること、細胞周期の中でG1からS期への進行におけるDNAのライセンシングに不可欠なCDC6の発現上昇と幹細胞との関連が認められた、引き続き解析を進めていく予定である。

(2) ヒト前立腺細胞株LNCaPをアンドロゲン除去環境下で長期間(6-18月間)培養し新規にCRPCヒトPca細胞株LNCaPAT6/12/18(ADT for 6, 12, 18 months)の樹立を試みる。ヒトCRPC細胞株C4-2をアンドロゲン除去環境下で長期間(6-24月間)培養し新規にCRPCヒトPca細胞株C4-2AT6/12/18/(ADT for 6, 12, 18 months)が樹立された。アンドロゲンの応答性や、各種血管新生因子、エピジェネシス調整因子が、アンドロゲンの依存度に応じて異なることが見出されており、今後引き続き、長期間の培養を継続していく予定である。

(3) 1での遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析にて比較し、CMAPで解析し、有用な候補小分子化合物を数十種類同定した。2で樹立した細胞株を対象として、in vitro, in vivoで今後検証していく予定である。

ヒトゲノムが解読され新たな創薬標的の発見を通じ、創薬に大きな変革をもたらすことが期待され、米国では、10年前からNIHはアカデミアによる創薬スクリーニングへの支援方針を打ち出し製薬会社やベンチャーの創薬へのプロセスにおける役割分担を明確にし、プラットフォームの確立に取り組んできた。創薬研究は創薬スクリーニングの主体が、化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングへと変遷し多大なりソースを要することもありアカデミアにとってはハードルが高く、更に我が国においては、基礎研究と臨床開発、臨床研究それぞれにギャップがあり、連携が円滑ではないため、大学・研究機関における創薬研究が段階的に進行することが困難であると推察される。実際に我が国の医療貿易赤字が、1.5兆円にも及ぶことを鑑みると、独自の概念に基づいた、欧米追従ではない先行的な、ヒト臨床研究に

まで整備された創薬研究のプラットフォームとその臨床応用を目指した本研究は、癌治療の成績向上を目指した将来的発展のために、得に振興すべき急務の課題であると考えられる。本研究の新規性・独創性は既存の創薬スクリーニングにおける分子標的を主役とすることではなく、がんの幹細胞性遺伝子ネットワークを内包する細胞実験系を新規薬剤アッセイ系の主役とした点と、ヒト臨床上使用可能な既存薬剤による遺伝子発現変化率をバイオインフォマティクスを応用することで候補薬として絞り込むという点である。基礎研究により有用な治療標的が発見されても、実証を可能とする臨床材料、臨床試験のプラットフォームを持ち合わせていないために、臨床応用への道筋が断たれ、検証されないままに研究が置き去りにされていた事例が多いと推察できる。申請者は、社会に研究成果の還元を速やかに行うプラットフォームを既に構築しており、研究成果をがんの治療へ即時に進展させることが可能で、社会に研究成果の還元を速やかに行うことができる。その波及効果は計り知れず、がんの難治性の打開にとどまらず、再生医学やiPSテクノロジーの安全な臨床応用への波及効果も期待でき、その将来的発展のために、得に振興すべき研究テーマであると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8件)

1: Kosaka T, Mikami S, Yoshimine S, Miyazaki Y, Daimon T, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M. The prognostic significance of OCT4 expression in patients with prostate cancer. *Hum Pathol*. 査読あり 2016 May;51:1-8. doi: 10.1016/j.humpath.2015.12.008. Epub 2015 Dec 30. PubMed PMID: 27067776.

2: Hongo H, Kosaka T, Mizuno R, Ezaki T, Matsumoto K, Morita S, Shinoda K, Shinojima T, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M. Should We Try Antiandrogen Withdrawal in Castration-Resistant Prostate Cancer Patients? Insights From a Retrospective Study. *Clin Genitourin Cancer*. 査読あり 2016 Feb 23. pii: S1558-7673(16)30042-8. doi: 10.1016/j.clgc.2016.02.014. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27036975.

3: Ezaki T, Kosaka T, Mizuno R, Shinojima T, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M. Efficacy of treatment with a GnRH antagonist in prostate cancer patients previously treated with a GnRH agonist. *Cancer Chemother Pharmacol*. 査読あり 2015 Aug;76(2):301-6. doi: 10.1007/s00280-015-2798-4. Epub 2015 Jun 9. PubMed PMID: 26055219.

4: Matsushima M, Kikuchi E, Matsumoto K, Hattori S, Takeda T, Kosaka T, Miyajima A, Oya M. Intravesical dual PI3K/mTOR complex 1/2 inhibitor NVP-BEZ235 therapy in an orthotopic bladder cancer model. *Int J Oncol*. 査読あり 2015 Jul;47(1):377-83. doi: 10.3892/ijo.2015.2995. Epub 2015 May 11. PubMed PMID: 25963317.

5: Ishida M, Mikami S, Shinojima T, Kosaka T, Mizuno R, Kikuchi E, Miyajima A, Okada Y, Oya M. Activation of aryl hydrocarbon receptor promotes invasion of clear cell renal cell carcinoma and is associated with poor prognosis and cigarette smoke. *Int J Cancer*. 査読あり 2015 Jul 15;137(2):299-310. doi:10.1002/ijc.29398. Epub 2015 Jan 8. PubMed PMID: 25523818.

6: Kosaka T, Yasumizu Y, Miyazaki Y, Miyajima A, Kikuchi E, Oya M. Potent increased risk of the initiation of DNA replication in human prostate cancer with the use of 5 α -reductase inhibitors. *Am J Clin Exp Urol*. 査読あり 2014 Jul 12;2(2):136-44. eCollection 2014. PubMed PMID: 25374915; PubMed Central PMCID: PMC4219299.

7: Shigeta K, Kosaka T, Yazawa S, Yasumizu Y, Mizuno R, Nagata H, Shinoda K, Morita S, Miyajima A, Kikuchi E, Nakagawa K, Hasegawa S, Oya M. Predictive factors for severe and febrile neutropenia during docetaxel chemotherapy for castration-resistant prostate cancer. *Int J Clin Oncol*. 査読あり 2015 Jun;20(3):605-12. doi: 10.1007/s10147-014-0746-7. Epub 2014 Sep 9. PubMed PMID: 25196861.

8: Kosaka T, Miyajima A, Yasumizu Y, Miyazaki Y, Kikuchi E, Oya M. Limited in vitro efficacy of CYP17A1 inhibition on human castration resistant prostate cancer. *Steroids*. 査読あり 2014 Dec;92:39-44. doi: 10.1016/j.steroids.2014.07.017. Epub 2014 Aug 20. PubMed PMID: 25150014.

〔学会発表〕(計 13 件)

(1)Miyazaki Y, Kosaka T, Mikami S, Yasumizu Y, Tanaka N, Kikuchi E, Miyajima A, Sato Y, Oya M, A new strategy for the treatment of prostate cancer by targeting vasohibin-2. American Urological Association annual meeting, May 10, 2016, San Diego Convention Center (USA).

(2)Hongo H, Kosaka T, Yasumizu Y, Miyazaki

Y, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M, Bioinformatic analysis utilizing the androgenic suppressive effect identified promising candidate drugs for reprogramming docetaxel-resistant castration-resistant prostate cancer. American Urological Association annual meeting, May 10, 2016, San Diego Convention Center (USA).

(3)Kosaka T, Hongo H, Miyazaki Y, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M, Reactive oxygen species induction by Cabazitaxel via inhibition of the Sestrin family in castration-resistant prostate cancer. American Urological Association annual meeting, May 10, 2016, San Diego Convention Center (USA).

(4)Miyazaki Y, Kikuchi E, Tanaka N, Shirotake S, Matsumoto K, Kobayashi H, Ide H, Obata J, Ishioka K, Kosaka T, Kanao K, Oyama M, Miyajima A, Momma T, Hasegawa S, Nakajima Y, Jinzaki M, Oya M. Impact of maximum tumor diameter adjusted by primary tumor location in patients with upper tract urothelial carcinoma managed by radical nephroureterectomy: The multi-institutional study. American Urological Association annual meeting, May 7, 2016, San Diego Convention Center (USA).

(5)Kobayashi H, Kikuchi E, Tanaka N, Shirotake S, Miyazaki Y, Ide H, Obata J, Hoshino K, Matsumoto K, Kaneko G, Hagiwara M, Kosaka T, Hara S, Miyajima A, Momma T, Nakagawa K, Oya M. External validation of prognostic impact of patient age and gender in patients treated with radical nephroureterectomy: Proposed new perspective of gender-adjusted age in upper tract urothelial carcinoma. American Urological Association annual meeting, May 7, 2016, San Diego Convention Center (USA).

(6)宮崎保匡、小坂威雄、三上修治、安水洋太、田中伸之、菊地栄次、宮嶋哲、佐藤靖史、大家基嗣。前立腺癌における Vasohibin-2 の発現の検討。第 25 回泌尿器科分子細胞・細胞研究会。平成 28 年 2 月 27 日。ATC コンベンションルーム(大阪府大阪市)。

(7)宮崎保匡、小坂威雄、三上修治、菊地栄次、田中伸之、安水洋太、宮嶋哲、岡田保典、大家基嗣。上部尿路上皮癌における EZH2 によるヒストン H3K27 トリメチル化修飾と予後についての検討。第 74 回日本癌学会学術総会。平成 27 年 10 月 10 日。名古屋国際会

議場（愛知県名古屋市）。

研究者番号：30445407

(8)宮崎保匡、小坂威雄、菊地栄次、三上修治、宮嶋哲、佐藤靖史、大家基嗣。尿路上皮癌における血管新生調節因子バソヒピンとエピジェネティクス制御機構の解明。第103回日本泌尿器科学会総会。平成27年4月18日。石川県立音楽堂(石川県金沢市)。

(9)大門達明、小坂威雄、菊地栄次、三上修治、宮崎保匡、橋本あり、橋本茂、水野隆一、宮嶋哲、岡田保典、佐邊壽孝、大家基嗣。腎盂尿管癌におけるEPB4.1L5発現の意義。第74回日本癌学会学術総会。平成27年10月10日。名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）。

(10)小坂威雄、宮崎保匡、宮嶋哲、菊地栄次、田中伸之、岡田保典、佐藤靖史、大家基嗣。前立腺がんにおける新規血管新生関連マーカーの発現の検討。第73回日本癌学会学術総会。平成26年9月25日。パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）。

(11)田中伸之、小坂威雄、宮崎保匡、水野隆一、菊地栄次、大家基嗣。尿路上皮癌におけるシスプラチン耐性獲得とがん微小環境としての上皮間葉転換誘導。第73回日本癌学会学術総会。平成26年9月25日。パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）。

(12)宮崎保匡、小坂威雄、宮嶋哲、三上修治、林雄一郎、田中伸之、長田浩彦、菊地栄次、中川健、岡田保典、佐藤靖史、大家基嗣。前立腺癌における新規血管新生調節因子Vasohibin-1発現の臨床的意義。第52回日本癌治療学会学術集会。平成26年8月28日。パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）。

(13)宮崎保匡、小坂威雄、三上修治、菊地栄次、田中伸之、前田高宏、石田勝、宮嶋哲、中川健、岡田保典、佐藤靖史、大家基嗣。上部尿路上皮癌における新規血管新生制御因子Vasohibin-1発現の臨床的意義。第51回日本癌治療学会学術集会。平成25年10月24日。国立京都国際会館（京都府京都市）。

〔産業財産権〕

特記すべき事項なし

〔その他〕

ホームページ

<http://www.keio-urology.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小坂 威雄 (TAKEO KOSAKA)

慶應義塾大学・医学部・講師