

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15686

研究課題名(和文)AR-V7陽性新規前立腺癌細胞株を用いたCRPCに対する創薬標的探索

研究課題名(英文)Identification of the novel therapeutic targets for CRPC by using newly developed AR-V7 expressing prostate cancer cell lines

研究代表者

中村 英二郎(Nakamura, Eijiro)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：90293878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌は、近年、本邦で罹患者数、死亡数がともに増加した癌腫の一つであり新規治療法開発が課題となっている。そこで、前立腺癌の病態解明、及び、治療標的分子の同定を目的として実験を行なった。アンドロゲン依存性増殖を示す前立腺癌細胞株であるLNCaP細胞を同ホルモンを除去した培地(csFBS: charcoal stripped FBS)で長期間培養を行うことにより新規細胞株(AILNCaP細胞)の樹立に成功した。上記の新規樹立細胞株を用いて増殖抑制効果を示す分子の同定を目的としたスクリーニングを行い有望な治療標的分子を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Recently, the number of patients who died in prostate cancer is increasing. One of the most significant difficulties of the translational research of this cancer is that it is so hard to establish cell lines. To overcome these, we newly established a cell lines by culturing the androgen-dependent LNCaP cells under the androgen depleted condition. By using these cell lines, we have successfully identified several genes critical for the androgen-independent cell growth of prostate cancer cells. These might be potent therapeutic targets for the disease.

研究分野：泌尿器科腫瘍学

キーワード：CRPC

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、近年、本邦で罹患者数、死亡数がともに増加した癌腫の一つである。転写因子である **Androgen Receptor (AR)** が driver として働くことが報告されており、有転移症例に対してはアンドロゲン除去療法が標準治療として施行される。本治療によって、腫瘍縮小をはじめとする病状の改善が得られるものの、殆どの症例が同療法に対する耐性を獲得した“去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC)”へと進展し最終的には癌死に至る。この数年、アンドロゲンのより強力な antagonist である Enzalutamide や同ホルモンの合成阻害薬である Abiraterone が臨床導入され、一旦、CRPC と診断された症例の予後が改善された。しかし、AR のスプライシングバリエントである AR-V7 を発現している症例が上記の両薬剤に対して治療抵抗性を示すことが明らかとなり (Antonarakis et al. *N Engl J Med.* 2014)、新規治療法開発が喫緊の課題となっている。

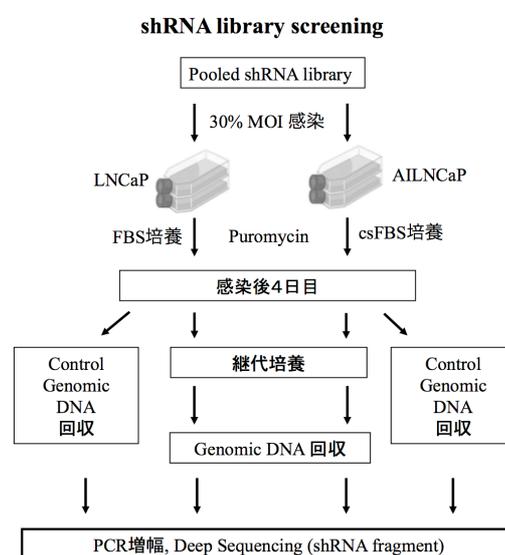
2. 研究の目的

本研究は、実臨床において問題となっている CRPC、特に AR-V7 陽性前立腺癌の去勢抵抗性病態解明、及び、治療標的分子の同定を目的とする。

3. 研究の方法

アンドロゲン依存性増殖を示す前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞を同ホルモンを除去した培地 (csFBS: charcoal stripped FBS) で長期間培養を行うことにより AR の splicing variant である AR-V7 が高発現を示す CRPC 細胞株 (AILNCaP 細胞) の樹立に成功した。そこで上記の新規樹立細胞株を用いた「in vitro において CRPC に対して増殖抑制効果を示す治療標的分子の同定」を目的とした shRNA library screening を行った。方法としては、Collecta 社の Pooled Lentiviral shRNA Libraries を使用

し Lentiviral Packaging plasmid を用いて Virus supernatant を作製、親株の LNCaP 細胞、及び、AILNCaP 細胞の各々に感染を行った。次に、これらの細胞において継代前、及び、継代後の各段階で DNA を抽出し deep sequencing を用いて各 shRNA fragment のリード数の解析を行った。コントロール (継代前) に比較して 8 週間の継代後にリード数が有意に減少した shRNA が in vitro において増殖抑制作用を有していることを示すことから AILNCaP 細胞に対して増殖抑制作用を示す shRNA fragment の抽出を行った。



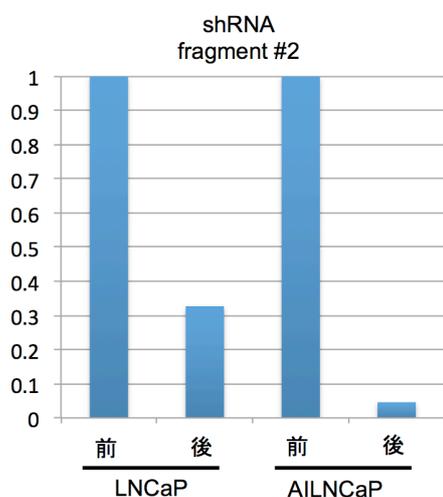
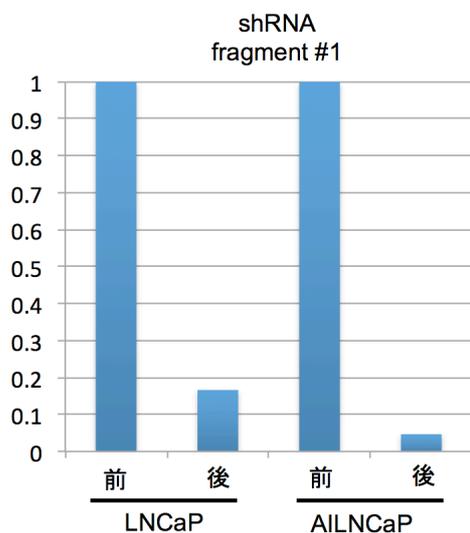
更に、blast search

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により当該 fragment が target とする標的遺伝子の同定を行なうことにより CRPC 細胞株に増殖抑制を示す複数の配列 (遺伝子) の抽出を試みた。

4. 研究成果

上記の方法にて抽出された shRNA 配列のうち、下記に示した 2 種類の shRNA fragment #1、及び、#2 が AILNCaP 細胞に対して増殖抑制的に作用していることが明らかとなった。また、これらの shRNA fragment の配列を blast search を用いて相同性検索を行ったところ、同

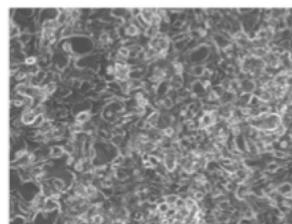
一のキナーゼを翻訳している mRNA を標的としていた。リード数の検討結果では親株の LNCaP細胞に対してもある程度の増殖抑制効果を示していたが、CRPC細胞株である AILNcAP細胞に対して、より強い増殖効果を有することが示された。



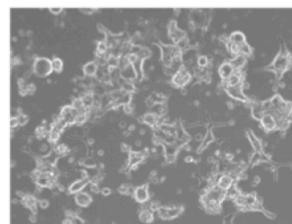
上記のライブラリースクリーニング結果の Validationを目的として、実際にAILNcAP細胞に対して上記の shRNA 配列のinfectionを行なった後に培養を継続したところ、コントロールの shRNA GFP を感染させた細胞に比較して in vitro において増殖抑制効果を示すことが確認された。

AILNcAP

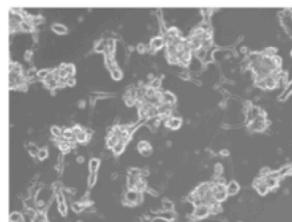
shRNA GFP



shRNA fragment #1



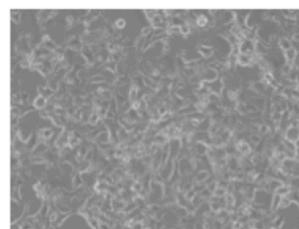
shRNA fragment #2



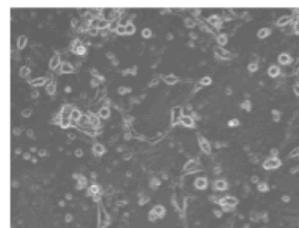
更に、同様の結果を示した shRNA fragment として shRNA fragment #3、及び、#4 が抽出された。これらは、ともに G タンパク質共役受容体を翻訳している mRNA を標的としていた。同様の検討を行なったところ、以下に示したように AILNcAP 細胞に対して増殖抑制効果を示した。

AILNcAP

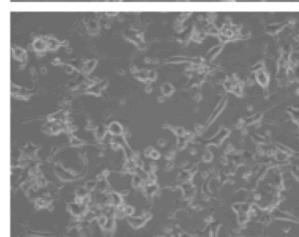
shRNA GFP



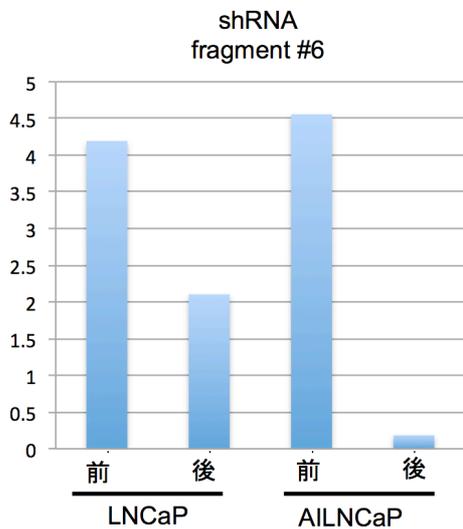
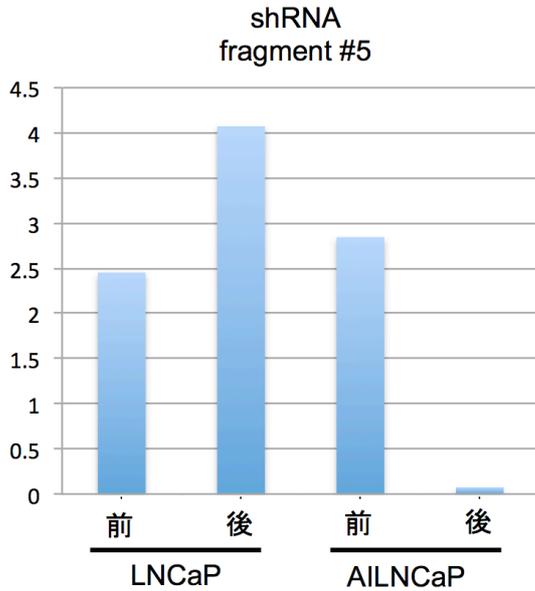
shRNA fragment #3



shRNA fragment #4



これらの分子とは別に、Wntシグナルの活性化に関連する分子を標的とする shRNA fragment#5, 6 が下記に示したごとく、AILNcAP細胞特異的に *in vitro* における増殖抑制に働くことが明らかとなった (synthetic lethality)。

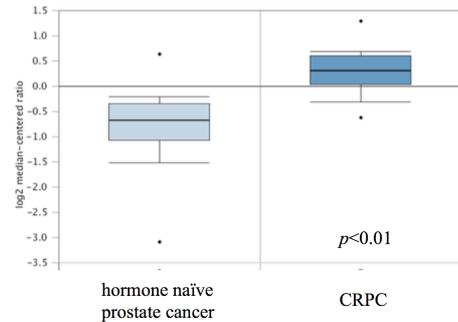
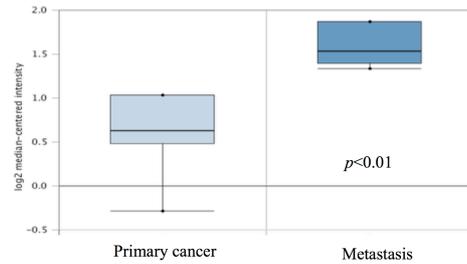


これまでも、Wnt シグナルが CRPC の進展に重要な働きをしているとの報告がなされていることから、上記の shRNA fragment が標的とする分子が関与していることが示唆された。そこで、Gene Expression Omnibus (GEO) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> に寄託されているデータを用いて

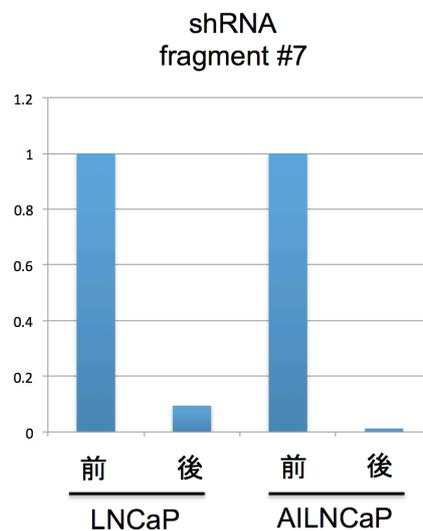
i) Primary cancer vs Metastasis

ii) hormone naïve cancer vs CRPC

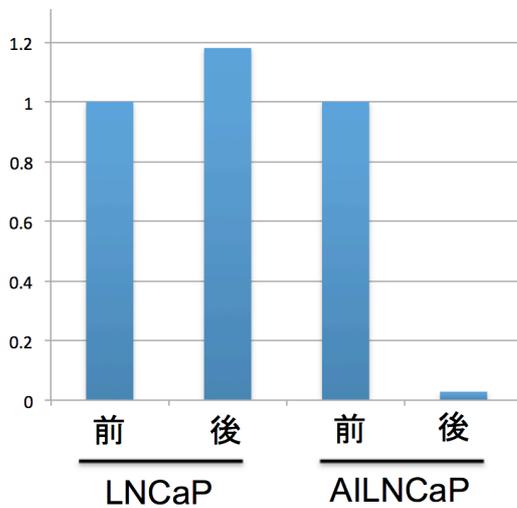
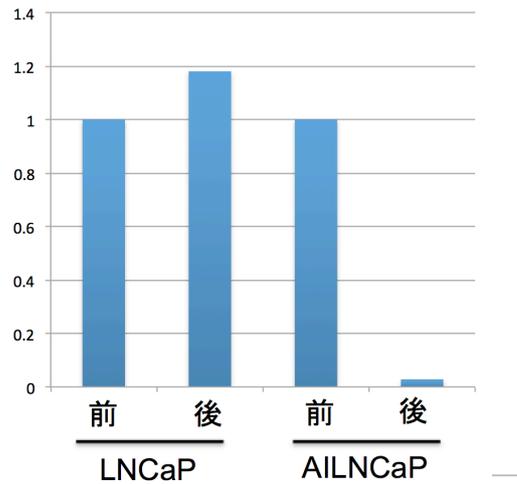
の Omics 解析により同分子の発現レベル比較を行った。その結果、後者において有意に発現亢進を来していることが明らかとなり、前立腺癌の転移、及び、CRPC 進展の両者に関与することが示唆された。



他にも、small G protein を標的とする#7, 8 の shRNA fragment が AILNcAP 細胞に対して増殖抑制をきたすことが判明した。今後、今回の研究成果として得られたこれらの分子に関して、解析を進めて行く予定である。



shRNA fragment #8



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〕

ホームページ等

<http://www.tk.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村英二郎 Eijiro Nakamura
京都大学・医学研究科・特定准教授
研究者番号：90293878

(2) 研究分担者

杉山愛子 Aiko Sugiyama
京都大学・医学研究科・特定研究員
研究者番号：30642699