

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06817

研究課題名(和文)多様性を再現した患者由来ゼノグラフト群を用いた新規前立腺癌治療薬の耐性機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of resistance to new generation androgen receptor axis-targeted agents by using various patient-derived xenografts of prostate cancer

研究代表者

後藤 崇之(GOTO, TAKAYUKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90806605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌患者の検体を用いて多種多様なPatient derived xenograft(PDX)モデルであるKUCaPシリーズ(KUCaPs)を樹立した。KUCaPsはPSA、ARの蛋白発現や去勢抵抗に關与する遺伝子発現に差を認め、臨床におけるCRPCの多様性を反映しているといえた。これらを用いてエンザルタミドの治療抵抗性獲得機序解明を目指したが、継代を重ねる中で増殖能の低下や細菌感染などがおこり実験に使用できなくなる系統が出現した。そんな中でも新規KUCaPs作成は継続して行い、アンドロゲン受容体経路標的(ARAT)薬抵抗性の患者から新たにエンザルタミド投与に抵抗を示すモデルを樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の前立腺癌細胞株では臨床における癌の多様性を十分に反映しておらず、それを用いた研究結果では一部の前立腺癌の性質を探索したにすぎない。ヒトの前立腺癌細胞をそのままマウスに移植して樹立したPDXモデルを多種類用いることが、多様な癌に対応するために重要と考えられる。我々は以前よりこれらのモデルを数種類保持していたが、今回新規アンドロゲン受容体標的治療薬に耐性を示す患者からPDXモデルを作成することに成功した。このモデルではエンザルタミド投薬実験に抵抗性を示しており、これらを解析することで臨床でのエンザルタミド耐性機序の解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A variety of patient derived xenograft (PDX) models, named KUCaPs, were established using specimens from prostate cancer patients in our laboratory. KUCaPs showed differences in PSA and AR protein expression and gene expression related to castration resistance, and was considered to reflect the clinical heterogeneity of castration resistant prostate cancer (CRPC). We aimed at elucidation of the mechanism of enzalutamide resistance acquisition using KUCaPs, but weak growths and bacterial infections occurred in several lines and they have become impossible to use for experiment. In such a situation, we continued to try to make new KUCaPs from patients resistant to next-generation androgen receptor axis-targeted (ARAT) agents. The newly established model showed resistance to enzalutamide administration.

研究分野：泌尿器科

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 xenograft エンザルタミド抵抗性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食生活の変化や高齢化に伴い、前立腺癌は近年急速に増加している疾患であり、その 10~20% は進行性前立腺癌である。進行性前立腺癌の標準治療はアンドロゲン受容体(AR)経路を標的とした去勢療法であるが、多くはやがて去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)へと進展する。去勢抵抗性獲得後も多くの前立腺癌細胞の増殖は様々な機序を介して AR 経路に依存しているという知見に基づき(Chen Nat Med 2004)、近年、CRPC の治療には AR 経路をさらに強力に阻害する新規抗アンドロゲン剤であるエンザルタミドや、副腎でのアンドロゲンの代謝を抑制するアピラテロンなどが用いられているが、その治療効果は限られる。去勢抵抗性獲得機序が様々であるように、CRPC の新規治療薬に対する治療抵抗性獲得機序にも多様性があると考えられる(Claessens Nat Rev Urology 2014)。これまで AR の増幅・変異・スプライシングバリエーションなどを介した耐性機序の他、エンザルタミドにおいては糖質コルチコイド受容体(GR)経路を介した機序が報告されているが、いずれも決定的ではなく、進行性前立腺癌の治療向上のためには、新規治療薬に対する治療抵抗性獲得機序の解明が急務である。LNCaP、VCaP、PC3、DU145、22Rv1 といった既存の前立腺癌細胞株を用いたマウス xenograft モデルの多くは、去勢反応性、AR や PSA の発現などにおいて CRPC の臨床的特徴を十分に再現しておらず、治療モデルとして適しているとは言えない。我々の施設はこれまで前立腺癌患者組織由来の PDX モデル(KUCaP1-3)を独自に樹立し、それらを用いて、AR の変異と治療抵抗性との関連解析(Yoshida Cancer Res 2005, Terada Prostate 2010)、新規 CRPC 治療標的の同定(Terada Cancer Res 2010, Maeno Prostate 2014)、新規マーカー候補蛋白の同定(Yoshikawa Prostate 2016)といった研究を行ってきた。また申請者自身も KUCaP2 などに対して質量顕微鏡を用いた脂質発現解析(Goto PLoS ONE 2014, Goto Prostate 2015)を行ってきた。現在までに安定して継代可能な PDX モデルを計 9 系統(KUCaP1-11)樹立し、それらは腫瘍増大速度、PSA の発現、AR の発現や変異、去勢への反応性に多様性を認めることがわかった。

これらのモデルは、臨床における前立腺癌の多様性を反映しており、去勢抵抗性状態におけるエンザルタミドに対する治療反応性や耐性獲得機序も様々であると予測される。これらの多種多様な PDX モデルを用いて、エンザルタミド抵抗性獲得機序を解明していくことが極めて大きな意義があると考えられる。

2. 研究の目的

多くの前立腺癌細胞は AR や PSA を発現し、去勢療法により縮小する去勢反応性細胞であるが、一部の癌細胞はアンドロゲン除去によるストレス下で様々な genetic もしくは epigenetic な変化を遂げ CRPC となる。このため CRPC は多様な病態であり、画一的な治療選択では治療効果に大きな差を認め、CRPC の耐性機序の解明には多様な実験モデルが必要である。一方、去勢療法や薬物に対する反応性は細胞株の実験だけでは評価困難であり、適切な動物モデルが必要であると考えられている(Inoue Nat Rev Urology 2017)。我々が独自に樹立した KUCaPs は、それぞれが AR や PSA の発現並びに去勢反応性に特徴を持った PDX モデルで、前立腺癌の多様性を再現し、さらに臨床の前立腺癌に近い組織構築を保持している。そのことから、本モデルは新たな前立腺癌治療薬の抵抗性獲得機序を探索する極めて独創的な実験モデルであると考えられる。さらに本研究では、京都大学医学研究 支援センターの保有する次世代高速シーケンサーや高感度質量分析装置を用いることにより、KUCaP の腫瘍組織中あるいはマウス血中の遺伝子発現解析や蛋白の解析が可能である。さらに当施設では、長期予後を追跡した豊富な前立腺癌患者の組織並びに血漿サンプルを有しており、同定した候補分子の臨床における評価が可能である。最終的には、当研究で得られた知見から CRPC 治療薬の抵抗性獲得を抑えるような新規治療方法が開発できる可能性があり、CRPC 患者の予後改善へとつながることを目的とする。

3. 研究の方法 (図 1)

(1) KUCaPs の特徴解析。

各 KUCaP の腫瘍組織における AR、PSA の蛋白発現評価、さらには、PTEN、p53、RB1 などの去勢抵抗性に関わりうる主要分子や、神経内分泌マーカーである Chromogranin A、Synaptophysin などの発現解析も行い特徴を把握する。また、各 KUCaP マウスに去勢術を行った際の腫瘍サイズの経時変化を調べることで、それぞれの去勢反応性の評価を行う。

(2) 去勢抵抗性(CR)-KUCaP 株の樹立。

各 KUCaP を去勢して CR の状態にする。去勢により縮小しないもの、または去勢後に再増殖したものを、CR-KUCaP とする。次に各 KUCaP から 3 匹ずつの CR-KUCaP 作成してエンザルタミドペレットを皮下投与し、増殖曲線を作成

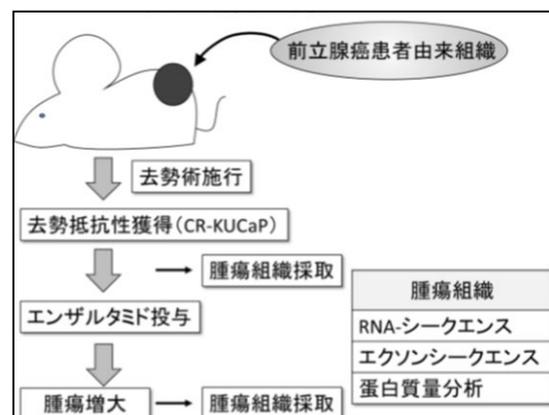


図 1 研究の方法

して腫瘍縮小効果を評価する。

(3) エンザルタミドの投与と反応性の評価。6 匹ずつの CR-KUCaP を作成し、エンザルタミド投与前、その後の増殖中（抵抗期） それぞれ 3 匹ずつから腫瘍と血液を採取する

(4) 投薬前と抵抗期の CR-KUCaP 組織を採取。

(5) 各 KUCaP 組織の網羅的遺伝子・蛋白解析。

KUCaP の腫瘍組織から RNA、ゲノム DNA、蛋白を抽出する。京都大学医学研究支援センターの高速シンクエンサー(Ion Proton™ システム)を用いて RNA シークエンスおよびエクソンシークエンスを行い、遺伝子発現と変異を網羅的に解析する。同じく、高感度質量分析装置を用いて、蛋白発現を網羅的に解析する。エンザルタミドの投与前、抵抗期の各群間で有意に発現や変異に差を認められた遺伝子を抽出する。蛋白発現の解析結果も適宜参考にして候補分子を絞り込む。

(6) 臨床検体における評価。

当科では年間約 70 例の前立腺癌手術を施行しており、約 300 例の十分な経過観察を施行し、臨床情報とリンクした癌組織新鮮凍結標本を有する。また、当科ではエンザルタミド抵抗性獲得前後の組織標本も有している。我々の豊富な臨床検体ライブラリーから作成した組織アレイ(TMA)を用いて、候補分子の発現状況を検査する。その上でエンザルタミド抵抗性獲得前後の組織標本においても候補分子の発現状況の評価する。

(7) 候補分子の機能解析。

当施設ではステロイドホルモン非存在培地でも育つ前立腺癌細胞株 LNCaP (AI-LNCaP) を作成し保有している。これを用いて候補分子の強制発現株およびノックダウン株を作成し、Western blot 法や qPCR 法で各種分子の発現や、MTT assay 法で増殖速度を評価する。また、候補分子の阻害剤が存在する場合は投与実験を行う。in vitro で評価を行うのと同時に、作成した細胞株による in vivo モデルにて評価を行う。候補分子の阻害薬がある場合は、CR-KUCaP に対しても阻害薬を投与し効果を確認する。阻害薬がない場合は、Atelogene®などを用いて CR-KUCaP マウスの腫瘍に直接候補分子の siRNA を導入し効果を確認する。

4. 研究成果

(1)

研究開始当初は安定して継代可能な PDX モデルは 9 系統であったが、最終的に 11 系統に増えたため、去勢反応性を含めた増殖曲線および PSA, AR の蛋白レベルでの発現を確認した(図 2)。その結果、腫瘍増大速度、PSA の発現、AR の発現や増幅、去勢への反応性に多様性を認め、臨床における前立腺癌の多様性を反映していると考えられた。

No.	1	2	3	6	7	8	9	10	11	13	14
採取部位	肝転移	前立腺	前立腺	前立腺	前立腺	骨転移	骨転移	骨転移	陰茎転移	前立腺	前立腺
増大速度	+	+	±	+	+	+	++	+	+++	+++	+
PSA発現	+	+	++	++	-	-	+	++	-	-	++
AR発現	+	+	++	+	++	+	++	++	-	-	+
AR mutation	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
AR amplification		-		-	-	-	2.36	4.54	2.41		-
去勢反応性	++	+	++	-		-	+	++	-	-	+
腫瘍感染	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-

図 2 各 KUCaPs の特徴

PTEN, p53, RB1 などの去勢抵抗性に関わりうる主要分子や、神経内分泌マーカーである Chromogranin A、Synaptophysin などの蛋白レベルでの発現をウェスタンブロッティング (WB) にて特徴を把握した (図 3)。

また、RT-PCR を行ったところ、KuCaP2, 9, 10 では AR - V7 の発現を認めた(図 4)。

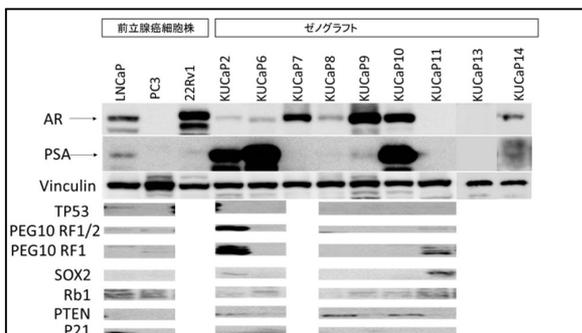


図 3 各種細胞株および KUCaPs の WB

AR が DNA レベルで増幅しているかを digital PCR にて確認した (図 2)。面白いことに、神経内分泌前立腺癌の特徴を有する KUCaP11 は、DNA レベルでは AR の増幅を認めるが、mRNA および蛋白レベルでは AR、PSA の発現をほとんど認めないことが判明した。ただし、神経内分泌前立腺癌は臨床でも比較的稀であり、エンザルタミド耐性機序も異質な可能性があるため今回の研究からは除外した。また、KUCaP13 では、ヒト特異抗原が PCR で回らないため、マウスの腫瘍に置き換わってしまった可能性があり、本研究から除外した。

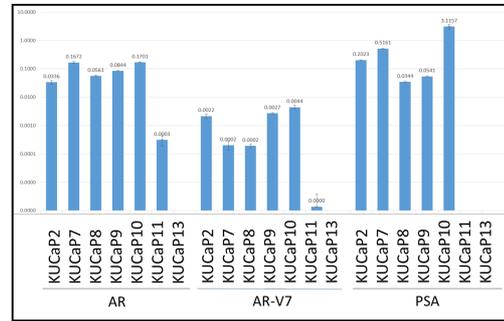


図 4 各 KUCaPs の RT-PCR

- (2)
- (2)

上記の結果から、比較的早期に CR を獲得する KUCaPs を候補としたが、KUCaP1, 3, 4, 5, 7 が途絶、また継代を繰り返すうちに、腫瘍増殖速度が遅くなり、十分に成長しないものが出現しました。KUCaP6, 8, 9 では病理学的にも壊死巣が増大しており、病理部の方で確認したところ、腫瘍内に細菌感染を起こしていることが判明した。これらは継代を繰り返すにつれて壊死巣や細菌叢が増大し、腫瘍の増殖が遅くなってしまい、本研究では使用が難しくなりました。また、KUCaP2 はもともと去勢反応性を獲得していたが、継代を重ねるにつれて去勢抵抗性獲得まで 30 週以上かかるようになり、エンザルタミド投与に至る前に死亡することが多くなった。KUCaP10 も同様に去勢反応性がよく、ほとんどが去勢にて腫瘍が消失してしまい、本研究で使用が難しい状況となってしまった。

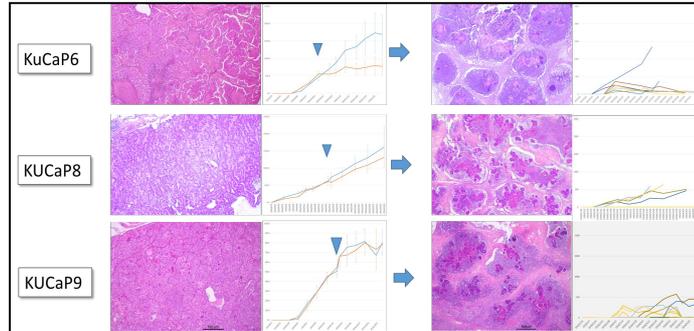


図 5 感染 KUCaPs の成長曲線の変化

そこで、早期に CR を獲得する可能性の高い、新規抗アンドロゲン薬に抵抗性となった患者から新たに xenograft を作成する方針とした。アピラテロン耐性の前立腺癌患者より KUCaP14 の作成に成功した。

- (3)

KUCaP14 は、PSA、AR の蛋白レベルでの発現を確認、去勢反応性を認め、AR の DNA レベルでの増幅は認めなかった。増殖曲線では比較的早期に CR を獲得し、エンザルタミドの投与が可能であった。エンザルタミド投与にて腫瘍は一時的に縮小したがすぐに耐性を獲得し、エンザルタミド抵抗性機序解明に優れたマウスモデルであると考えられた。(図 6)

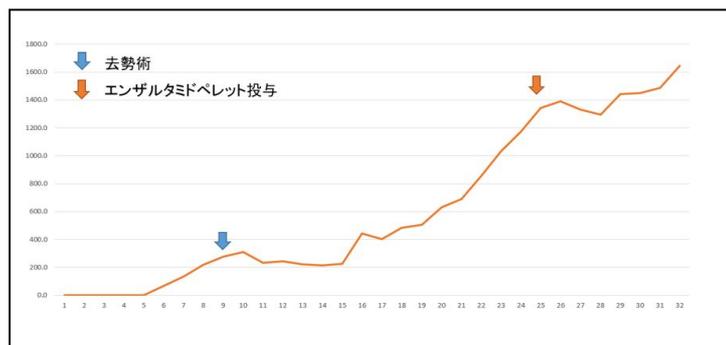


図 6 KuCaP14 の成長曲線 (去勢、エンザルタミド投与)

- (4)

現在、8 匹の CR-KUCaP を作成し、エンザルタミド投与前、その後の増殖中 (抵抗期) それぞれ 3 匹ずつから腫瘍と血液を採取する予定としている。

- (5、6、7)

現在のところ未達であるが、上記で採取した腫瘍と血液サンプルを使用して解析を検討している。

また、これまで当科ではアピラテロンおよびエンザルタミドの両薬剤に耐性を示す患者からの xenograft は保有できていなかったが、現在、両薬剤に耐性を示す 2 人の患者より新たに作成した xenograft がそれぞれマウスで 2 代目まで生着を認めており、今後も安定して継代可能となる見込みである。これらは KuCaP14 と同様に早期に CR を獲得し、エンザルタミド耐性を獲得する可能性が高いと考えられる。前立腺癌の多様性を反映する多様な KUCaPs のうち、現在の治療に対応するモデルが構築できつつあり、これらを用いて今後も新規抗アンドロゲン薬への治

療抵抗性機序の解明につながるような研究を継続していきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Uegaki M, Goto T (16 名中 9 番目), Kobayashi T. Downregulation of RalGTPase-activating protein promotes invasion of prostatic epithelial cells and progression from intraepithelial neoplasia to cancer during prostate carcinogenesis. (査読有) ; 2019 May 6. pii: bgz082. doi: 10.1093/carcin/bgz082.
2. Miyazaki Y, Goto T (12 名中 4 番目), Inoue T. Consecutive Prostate Cancer Specimens Revealed Increased Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C3 Expression with Progression to Castration-Resistant Prostate Cancer. (査読有) ; J Clin Med. 2019 May 1;8(5). pii: E601. doi: 10.3390/jcm8050601.
3. Sumiyoshi T, Goto T (16 名中 9 番目), Akamatsu S. Clinical utility of androgen receptor gene aberrations in circulating cell-free DNA as a biomarker for treatment of castration-resistant prostate cancer. (査読有) ; 2019 Mar 11;9(1):4030. doi: 10.1038 /s41598-019-40719-y.
4. Kita K, Goto T (7 名中 2 番目), Kobayashi T. Castration-resistant prostate cancer refractory to second-generation androgen receptor axis-targeted agents: opportunities and challenges. Cancers (Basel). (査読有) ; 2018 Sep 21; 10(10). pii: E345 doi: 10.3390.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 牧野雄樹、後藤崇之、小川修ほか、「An original patient-derived xenograft model for castration-resistant prostate cancer expressing AR-V7」, 第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017 年 4 月 21 日 (鹿児島)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

京都大学医学研究科泌尿器科学教室 HP

<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。