

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19568

研究課題名（和文）可塑性の制御による固形癌の革新的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of innovative therapies for solid tumors by regulating plasticity

研究代表者

赤松 秀輔（Akamatsu, Shusuke）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20767248

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：新規神経内分泌前立腺癌（NEPC）細胞株KUCaP13にアンドロゲンレセプター（AR）活性を同定するレポーター遺伝子ARElucを導入した。Luciferase assayでAR強制発現株においてアンドロゲン投与下に発光を認め、NEPC細胞株においてAR再発現を感知できるスクリーニング系を開発した。1552種の既知化合物を用いて化合物スクリーニングを行い30種類の化合物をヒット化合物として同定したが、いずれの薬剤もルシフェラーゼ阻害作用のため偽陽性であった。今回の研究で可塑性を制御する薬物は同定できなかったが、新規NEPC細胞株を用いて可塑性の可逆性を評価できるスクリーニング系を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経内分泌前立腺癌（NEPC）においては系統的な可塑性を反映した細胞株が存在せず、大規模なスクリーニングは困難であった。我々は系統的な可塑性の表現型を有する新規NEPC細胞株KUCaP13を樹立し、これを用いて可塑性の可逆性を評価できるスクリーニング系を開発した。本研究では単一化合物ではアンドロゲンレセプター（AR）を再発現できなかったが、複数の化合物を組み合わせるなど、今後さらなる研究に応用可能である。また前立腺癌は他の固形癌と異なりAR活性で可塑性を評価できるので、他の固形癌では困難な可塑性を評価するスクリーニング系で得られた成果は、他の癌種における可塑性研究への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：A reporter gene, AREluc was transduced into a novel neuroendocrine prostate cancer (NEPC) cell line, KUCaP13 cells to detect androgen receptor (AR) activity. Positive control cells (KUCaP13_AREluc_AR) overexpressing AR showed enhanced luminescence upon administration of synthetic androgen. We developed the screening system to detect AR re-expression in an NEPC cell line. Although a chemical screening of 1,552 known compounds revealed 30 candidate molecules potentially enhancing luciferase luminescence, all hit compounds were confirmed as false positives, probably due to their inhibitory activity on luciferase. We developed a screening system to evaluate the reversibility of plasticity using a novel NEPC cell line; however, no compound demonstrated the ability to regulate plasticity.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：可塑性 前立腺癌 神経内分泌前立腺癌 固形癌 スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、新規のアンドロゲン受容体(AR)経路阻害剤(ARPI)で AR 経路を強力に阻害することができるようになった結果、AR 陽性の一般的な前立腺癌の治療経過中に AR 経路に全く依存しない神経内分泌前立腺癌 (NEPC) に癌細胞が変化する症例が増加している。このように治療負荷に伴い細胞の系統的性質が完全に変化する現象を系統的可塑性 (lineage plasticity) という。最近のゲノム研究により、NEPC においては *TP53*, *RB1*, *PTEN*, *N-MYC* などの遺伝子の異常が重要な役割を果たすことがわかってきた。一方、これらの遺伝子は直接的な治療標的にはならないため、NEPC は依然、有効な治療法が存在しない非常に予後の悪い癌であり、今後の前立腺癌治療の成績を向上させるために新規治療法の開発は必須である。

NEPC に対する新規治療として系統的可塑性の制御を目指したものが注目されている。前立腺癌細胞株では *TP53*, *RB1*, *PTEN* をノックダウンすると *SOX2* や *EZH2* といったエピジェネティクス関連遺伝子の発現が亢進し、その結果 AR の発現が低下して NEPC 関連遺伝子の発現が上昇することが報告されている。そしてそのような細胞では *EZH2* 阻害剤によって AR が再発現して ARPI が奏功することが示されている (Ku SY. Science, 2017)。しかし、NEPC 患者組織由来のオルガノイドでは *EZH2* 阻害剤による AR の再発現は認めず (Puca L. Nat Commun, 2018)、未だ系統的可塑性の制御による治療開発は手探りの状況が続いている。

NEPC の治療開発が遅れている大きな要因としてヒト NEPC 由来の実験モデルが限られていることがある。特に遺伝子操作や大規模な化合物スクリーニングに用いることができるような細胞株はほぼ皆無である。そこで、我々は前立腺癌の治療経過中に NEPC となった患者の転移巣組織から新規の患者由来ゼノグラフト (PDX) を樹立し、その細胞を通常の培地で長期培養して NEPC 細胞株 KUCaP13 の樹立に成功した (Okasyo K. Cancer Sci. 2021)。KUCaP13 はレンチウイルスによる遺伝子操作だけでなくフローサイトメトリーによる単一細胞の評価も可能である。また、*TP53*, *PTEN* のヘテロ接合性の喪失を認め、遺伝子発現解析で RB 経路に異常があることや *SOX2* が高発現していることも確認されており、NEPC の系統的可塑性の研究を行うのに適したモデルである。

2. 研究の目的

我々は可塑性による表現型の変化が可逆的であることに着目し、一度 AR の発現を失った NEPC を、何らかの薬物で AR を再発現させることができれば、再度 ARPI が有効となり抗腫瘍効果を期待できると考えた。可塑性の研究では表現型の変化の同定が課題となるが、前立腺癌では他癌種と異なり AR 活性を指標に可塑性による表現型の変化を鋭敏に評価できる。本研究の目的は、AR の発現を失った新規 NEPC 細胞株 KUCaP13 を用いて AR の再発現を誘導する化合物を同定し、NEPC に対して可塑性の制御による新規治療法の開発を目指すことである。

3. 研究の方法

1) KUCaP13 へ ARE (Androgen Response Element) luc の導入

NEPC 細胞株である KUCaP13 にレンチウイルスを用いて AREluc を導入する。AREluc は、ARE にルシフェラーゼ遺伝子を連結しアンドロゲン受容体が ARE に結合したら発光で感知できるレポーター遺伝子であり、AR 活性を測定できる最も鋭敏かつ簡便な実験系である。予備実験で前立腺癌細胞株 LNCaP に AREluc と control 遺伝子を導入し、アンドロゲン投与下に AR の活性をルシフェラーゼアッセイにより定量可能なことを確認している。また、KUCaP13 にレンチウイルスによる遺伝子導入が可能とも確認済みである。KUCaP13 は AR を全く発現しないため、KUCaP13_AREluc に AR を強制発現させた細胞株を作成し、2) のスクリーニングで陽性コントロールとして使用する。KUCaP13_AREluc と KUCaP13_AREluc_AR を用いてルシフェラーゼアッセイの条件検討を行い、KUCaP13 において AREluc により AR 活性を感知できるか検証する。

2) 化合物スクリーニングの実施 (1st screening)

KUCaP13_AREluc に各化合物および合成アンドロゲンを添加しルシフェラーゼアッセイで AR の活性を測定する。ルシフェラーゼアッセイで合成アンドロゲン添加により発光増強を認められた化合物を、AR を再発現させたヒット化合物として選択する。本学の「創薬拠点コアラボ」には約 2500 種類の既存薬および機能既知化合物を保有しており、当研究室ではそれらを用いた化合物スクリーニングの実績がある (Kita. BJC. 2019)。

3) 検証実験 (2nd screening)

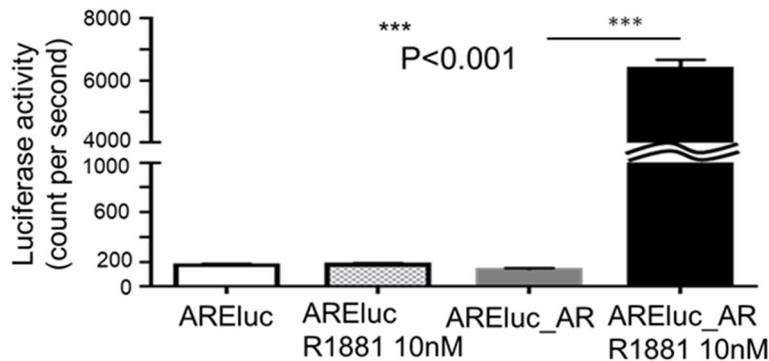
先の 1st screening で同定されたヒット化合物について、偽陽性の除外と妥当性の検証を行う。具体的には、化合物にアンドロゲンを添加するプレートと添加しないプレートを作成し、アンドロゲンにより AR 活性に差異が見られるか検証する。化合物は濃度を 10 段階にふり、より低濃度で AR を再発現させる化合物を同定する。2nd screening において同定された真のヒット化合物については、qPCR でアンドロゲン投与下に AR や AR の下流遺伝子である *KLK3* の発現が変化するか検証する。

4. 研究成果

1) KUCaP13 へ AREluc の導入

KUCaP13 にレンチウイルスを用いて AREluc を導入した。さらに陽性コントロールとして KUCaP13_AREluc に AR を強制発現させた細胞株を作成した。AREluc の導入は selection marker である GFP で確認し、AR の発現については western blotting で確認した。KUCaP13_AREluc と KUCaP13_AREluc_AR を用いて 96well plate でルシフェラーゼアッセイを行ったところ、KUCaP13_AREluc_AR でアンドロゲンを加えた細胞のみ発光を認めた(図 1)。このことから、KUCaP13 において AREluc により AR 活性を評価できることを確認した。スクリーニング系の精度の評価に用いられる Z' -factor を算出したところ、0.81 であり、精度の高いスクリーニング系であることが示された。

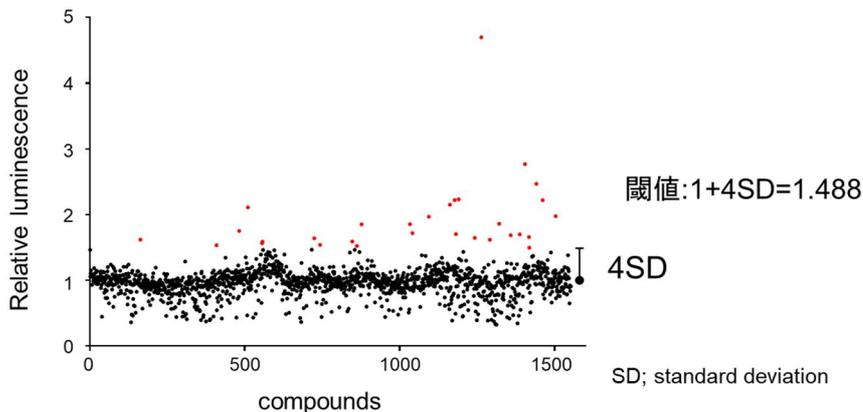
図 1



2) 化合物スクリーニングの実施 (1st screening)

化合物は本学の「創薬拠点コアラボ」が保有する 1552 種類の既存薬および機能既知化合物を使用した。閾値は陰性コントロールの発光度・標準偏差(SD)を元に、 $1+4SD$ 以上の平均発光度を示した化合物をヒット化合物とした。その結果、1st screening では 30 種類の化合物をヒット化合物として同定した(図 2 赤点がヒット化合物)。

図 2



3) 検証実験 (2nd screening)

ルシフェラーゼアッセイにおいて、30 種類いずれの化合物においてもアンドロゲンを添加するプレートと添加しないプレートで同等の発光度を示し、偽陽性が考えられた。一部の化合物は AR と *KLK3* の qPCR でも検討を行ったが、ヒット化合物とアンドロゲンをともに加えても AR や *KLK3* の発現を認めなかった。以上から 1st screening で同定したヒット化合物は全て偽陽性であると判定した。

4) 考察

今回、偽陽性の原因として化合物のルシフェラーゼ阻害作用が考えられた。1st screening のヒット化合物の多くが、ルシフェラーゼ阻害作用に特徴的な構造を有していた。今回、単一化合物では t-NEPC 細胞株の AR を再発現させることは困難であったが、複数の化合物を組み合わせれば可能かもしれない。あるいは形質分化のより早期の段階で介入すれば、t-NEPC において AR を再発現させることができる可能性かもしれない。

5) 結語

NEPC においては系統的可塑性を反映した細胞株が存在せず、大規模なスクリーニングは困難であった。我々は系統的可塑性の表現型を有する新規 NEPC 細胞株 KUCaP13 を樹立し、これを用いて可塑性の可逆性を評価できるスクリーニング系を開発した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kosuke Okasho, Takayuki Goto, Shusuke Akamatsu	4. 巻 112
2. 論文標題 Establishment and characterization of a novel treatment-related neuroendocrine prostate cancer cell line KUCaP13	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2781-2791
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14935.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 赤松秀輔
2. 発表標題 治療関連内分泌前立腺癌患者由来の新規細胞株KUCaP13の樹立とその特徴
3. 学会等名 第109回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福井智洋、赤松秀輔
2. 発表標題 NEPCの系統的可塑性は可逆的か？新規NEPC細胞株を用いたドラッグスクリーニングによる検討
3. 学会等名 第82回 日本癌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomohiro Fukui, Shusuke Akamatsu
2. 発表標題 A highly-sensitive screening system to evaluate the reversibility of NEPC to prostate adenocarcinoma
3. 学会等名 20th Urological Association of Asia Congress 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福井智洋、赤松秀輔
2. 発表標題 前立腺癌のlineage plasticityを深掘する
3. 学会等名 第38回 前立腺シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福井智洋、赤松秀輔
2. 発表標題 NEPCにおける系統的可塑性の可逆性を評価する高感度スクリーニング系の開発
3. 学会等名 第33回 泌尿器分子細胞研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 福井智洋、赤松秀輔
2. 発表標題 新規NEPC細胞株を用いたNEPCにおける系統的可塑性の可逆性を評価する高感度スクリーニング系
3. 学会等名 第111回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 赤松秀輔、福井智洋
2. 発表標題 Is neuroendocrine transdifferentiation reversible? A drug screening approach using a novel NEPC cell line.
3. 学会等名 Urological Research Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	佐野 剛視 (Sano Takeshi) (60866309)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究 分担者	後藤 崇之 (Goto Takayuki) (90806605)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------