

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20109

研究課題名(和文)AR, Aktシグナル経路に対する相互依存的制御機構を標的とした治療戦略の確立

研究課題名(英文)New treatment strategy of refractory prostate cancer by targeting interdependent signaling pathways.

研究代表者

本郷 周(Hongo, Hiroshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：10626675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：AR axisとPI3K/ Akt/mTOR axisとのクロストークに加えSTAT5 axisが難治性前立腺癌への進展に寄与すると考え検討を行った。ホルモン感受性前立腺癌細胞株LNCaPおよび当教室において樹立した去勢抵抗性前立腺癌細胞株C4-2AT6を使用した。C4-2AT6はドセタキセル耐性を有していた。Western blot法では、C4-2AT6においてドセタキセル投与後にAktシグナル、STAT5シグナルの増強を認めていた。申請者が独自にスクリーニングし同定したSTAT5阻害剤候補薬ME001は、in vitro, vivoにおいてC4-2AT6に対する抗腫瘍効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the therapeutic potential of targeting STAT5 signaling. We used two human prostate cancer cell lines: LNCaP, a androgen-dependent prostate cancer cell line; and C4-2AT6, a castration-resistant prostate cancer cell line. C4-2AT6 had docetaxel resistance. Western blotting showed higher expression of pAKT and pSTAT5 in C4-2AT6. We identified a novel stat5 inhibitor, ME001. ME001 had anti-tumor effect for C4-2AT6 in vitro and in vivo.

研究分野：泌尿器科腫瘍学

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 ドセタキセル耐性 相互依存的シグナル アンドロゲン受容体

1. 研究開始当初の背景

転移性前立腺癌の治療は、アンドロゲン受容体拮抗薬 (Androgen receptor; AR) および LHRH アゴニスト/アンタゴニストによるホルモン療法が中心となる。ホルモン療法により多くの症例で一時的な寛解が得られるが、数年の内にホルモン抵抗性を獲得する。これを去勢抵抗性前立腺癌: Castration Resistant Prostate Cancer; CRPC と表記する。CRPC に対して、本邦においてドセタキセルによる化学療法が広く行われてきた。また、近年ではエンザルタミド、アピラテロン、カバジタキセル等の新規治療薬も近年使用され始めているが、その生命予後改善効果はいずれも数か月程度である。今までの当教室における先行研究において、前立腺癌微小環境で PI3K/Akt シグナル経路が亢進しており、PI3K/Akt シグナルと AR との相互依存的な活性化機構を有していることを発見し、相互依存的な活性化機構をターゲットとした新規治療戦略の可能性について報告してきた。RPC の発生機序の全貌はいまだ明らかになっていないが、AR の発現増加及び突然変異による機能獲得が関わるということが知られている (Shafi AA et al, Pharmacol Ther. 2013)。また、前立腺局所におけるプロラクチンは、Janus kinase (Jak)-2 および Signal Transducer and Activator of Transcription (Stat)-5 によるシグナリングを介して、細胞周期に関わる様々な遺伝子を発現させる。前立腺癌とプロラクチンとの関係は、殆ど明らかになっていないが、前立腺特異的にプロラクチンを過剰発現するトランスジェニックマウスでは悪性度の高い前立腺癌を高率に発症した (Kindblom J et al, Endocrinology 2003)。また、前立腺癌組織における STAT5 の発現は、前立腺癌の予後と関係することが少数のケースコントロール研究で報告されてきた (Tan SH et al, Cancer Res. 2008)。しかし、前立腺癌組織内における STAT5 の制御機構については未だ明らかになっていない。今回、申請者は PI3K/ Akt/mTOR axis と共に腫瘍増殖に関わると考えられている PRLR/STAT5/PIM1 axis に着目し、PRLR/STAT5/PIM1 axis が、AR axis, PI3K/Akt/mTOR axis とのクロストークを通じて、CRPC の発現・増殖の一端を担っている可能性を考え、PRLR/STAT5/PIM1 をターゲットとした新規治療戦略の開発について、研究計画を考案した。

2. 研究の目的

今回申請者は、前立腺癌組織内の微小環境においてプロラクチン受容体 (PRLR) /STAT5/PIM1 の発現が亢進していることに着目し、PRLR/STAT5/PIM1 axis が AR, PI3K/Akt/mTOR axis との相互依存的調節機構を通じて CRPC の難治性獲得に寄与すると考え、以下 3 点を検討項目とした。

1. 前立腺癌細胞内における PRLR/STAT5/PIM1 発現量の解析
2. 前立腺癌微小環境における PRLR/STAT5/PIM1 シグナリングと AR axis, PI3K/Akt/mTOR axis との相互依存的なフィードバック機構の解明
3. 相互依存的シグナリング機構をターゲットとした新規治療戦略の確立

3. 研究の方法

- (1) ホルモン感受性前立腺癌細胞株 LNCaP および当教室において樹立した去勢抵抗性前立腺癌細胞株 C4-2AT6 を研究対象とした。それぞれの細胞株へタキサン系抗癌剤ドセタキセル、新規抗アンドロゲン剤エンザルタミドを投与した際の感受性を細胞増殖アッセイにより評価した。また、ドセタキセル投与による各種細胞増殖シグナルの変化をウェスタンブロットにより検討した。
- (2) STAT5 阻害剤 573108、および我々が独自にスクリーニングし同定した STAT5 阻害剤 ME001 を C4-2AT6 へ投与し、抗腫瘍効果を細胞増殖アッセイで評価した。また、ドセタキセル・エンザルタミドと併用することで、それぞれの阻害剤の相乗効果を検討した。
- (3) C4-2AT6 を用いて作成したマウス皮下腫瘍モデルに対して ME001 を投与し、腫瘍増殖抑制効果を検討した。

4. 研究成果

- (1) LNCaP および C4-2AT6 へドセタキセル、エンザルタミドを投与した際の細胞増殖アッセイの結果、C4-2AT6 はドセタキセル、エンザルタミドへの耐性を有していた (Figure 1, 2)。

Figure 1

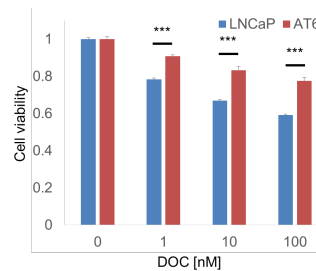
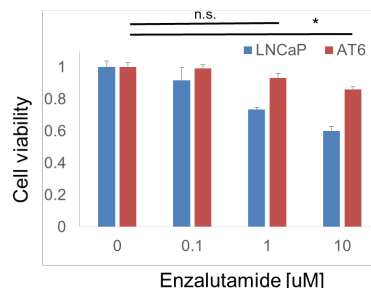
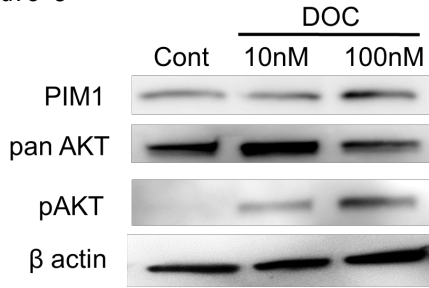


Figure 2



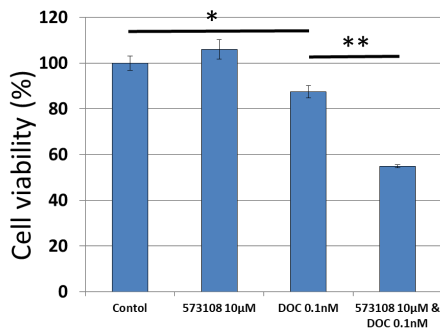
ウェスタンブロットの結果、C4-2AT6 においてドセタキセル投与後に PIM1 および Akt シグナルの増強を認めていた。

Figure 3



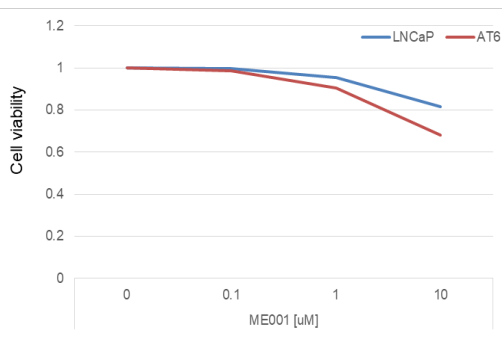
(2)さらに STAT5 阻害剤 573108 を C4-2AT6 に投与し、単剤での腫瘍効果およびドセタキセル、エンザルタミドとの併用効果を検討した。細胞装飾アッセイの結果、573108 は単剤では効果を認めないものの、ドセタキセルとの併用による相乗効果を認めた(Figure 4)。

Figure 4



STAT5 阻害剤 573108 は DOC との併用により前立腺癌細胞増殖抑制効果を示すが、単剤での効果に乏しく、臨床応用には高い障壁があると考えられた。そこで申請者は STAT5 阻害剤を独自にスクリーニングし、現在までに、候補薬 ME001 を同定した。ME001 は単剤投与により C4-2AT6 の細胞増殖を抑制した(Figure 5)。

Figure 5



また、ウェスタンブロットおよび免疫蛍光染色の結果、ME001 は STAT5 リン酸化の抑制効果を有していた (Figure 6, 7)。

Figure 6

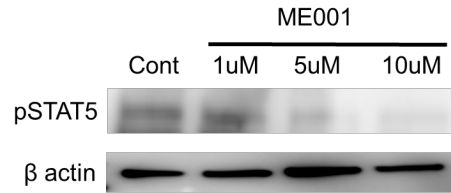
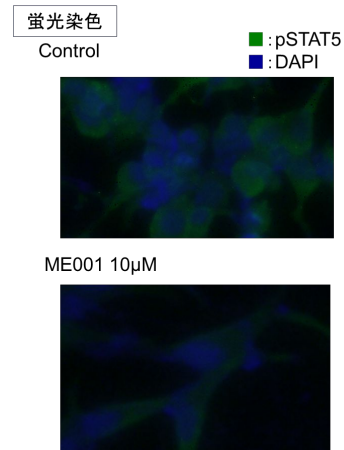
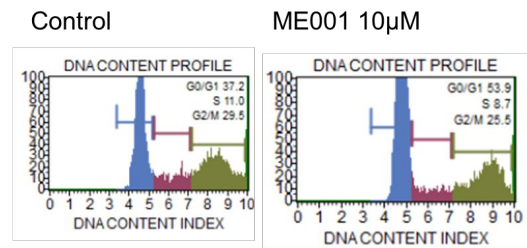


Figure 7



フローサイトメトリーによる細胞周期解析を行った結果、ME001 は、C4-2AT6 の G0/G1 arrest 誘導効果を認めた(Figure 8)。

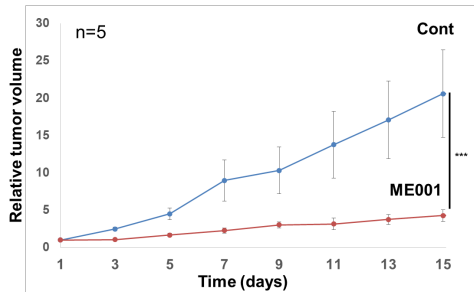
Figure 8



	G0/G1	S	G2/M
Control	47.9	14.2	38.0
ME001	61.2	9.9	28.9

(3)メスの Balb-C ノードマウスを用いて C4-2AT6 の皮下腫瘍モデルを作成した。皮下腫瘍のサイズが 100mm³ を越えた時点で コントロール群、ME001 7.5mg/kg/day 投与群に分け、15 日後のサイズを評価した。ME001 は単剤投与で有意な腫瘍増大抑制効果を示した(Figure 9)。

Figure 9



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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

1: Hiroshi Hongo, Takeo Kosaka, Yota Yasumizu, Yasumasa Miyazaki, Eiji Kikuchi, Akira Miyajima, Mototsugu Oya. Overcoming PI3K/mTOR inhibitor resistance by PIM1 inhibitor through regulation of tyrosine kinase expression. American Urological Association Annual Meeting 2017, 2017/5/15, Boston (USA)

2: Hiroshi Hongo, Takeo Kosaka, Yota Yasumizu, Yasumasa Miyazaki, Eiji Kikuchi, Akira Miyajima, Mototsugu Oya. Therapeutic targeting of transcriptional repressor BCL-6 in enzalutamide-resistant castration-resistant prostate cancer. American Urological Association Annual Meeting 2017, 2017/5/15, Boston (USA)

3: Hiroshi Hongo, Takeo Kosaka, Yota Yasumizu, Yasumasa Miyazaki, Eiji Kikuchi, Akira Miyajima, Mototsugu Oya. Correlation between Cabazitaxel resistance and EMT in metastatic castration resistant prostate cancer. American Urological Association Annual Meeting 2017, 2017/5/15, Boston (USA)

4: 本郷周、小坂威雄、大家基嗣. 転移性去勢抵抗性前立腺癌の遺伝子発現プロファイルに着目したリプログラミング候補薬剤のスクリーニング. 第 20 回日本がん分子標的治療学会, 2016/5/31, 別府国際コンベンションセンター (大分県別府市)

5: Hiroshi Hongo, Takeo Kosaka, Yota Yasumizu, Yasumasa Miyazaki, Eiji Kikuchi, Akira Miyajima, Mototsugu Oya. Bioinformatic analysis utilizing the androgenic suppressive effect identified

promising candidate drugs for reprogramming docetaxel-resistant castration-resistant prostate cancer. American Urological Association Annual Meeting 2016, 2016/5/10, San Diego (USA)

〔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

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本郷 周 (HONGO HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 10626675