

令和元年5月30日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16422

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌における放射線抵抗性の機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanism on radio-resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer

研究代表者

河村 英将 (Kawamura, Hidemasa)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80431716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌にはホルモン療法が有効であるが、経過によりその有効性が失われ去勢抵抗性前立腺癌となる。去勢抵抗性前立腺癌は一般に放射線治療に用いられるX線に対しても抵抗性となることが示唆されている。ホルモン感受性の細胞株と、そこから作成した去勢抵抗性の細胞モデルを用い、重粒子線では去勢抵抗性の細胞でもホルモン感受性の細胞と効果に差がないことを示した。また、DNAの解析でその原因遺伝子を明らかにし、RNAの網羅的解析によりX線抵抗性の原因となりうる分子機構の候補を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本における前立腺癌の罹患率は増加しており、ホルモン療法への感受性が失われた去勢抵抗性前立腺癌ではX線治療にも抵抗性となるために有効な治療法が確立しておらず、医学的、社会的な課題となっている。今回の研究では、去勢抵抗性前立腺癌での重粒子線治療の有効性について基礎的な結果を示し、また、その原因となるメカニズムの候補を示したことにより、去勢抵抗性前立腺癌の放射線治療抵抗性の克服につながり、今後の治療法確立の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although hormone therapy is effective for prostate cancer, its effectiveness is lost over time and become castration-resistant prostate cancer. It has been suggested that castration resistant prostate cancer is also resistant to X-rays generally used for radiation therapy. Using a hormone-sensitive cell line and a castration-resistant cell model prepared therefrom, heavy ion beam showed that castration-resistant cells had no difference in effect from hormone-sensitive cells. In addition, analysis of DNA revealed its causative gene, and comprehensive analysis of RNA identified candidate molecular mechanisms that could cause X-ray resistance.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：前立腺癌

1. 研究開始当初の背景

日本における前立腺癌の罹患数は男性で1位となり、死亡者数は現在年間約1.2万人で、近年急速に増加傾向にある。2020年には年次死亡者数が2万人に達し、肺癌に次いで第2位となると予測されている。前立腺癌は一般的にアンドロゲン依存性を示し、黄体ホルモン放出ホルモン(LH-RH)アゴニスト及びアンタゴニストによるアンドロゲン枯渇療法が腫瘍の制御に有効であり、実際の前立腺癌診療でも治療の過程のいずれかのタイミングでアンドロゲン枯渇療法が用いられることが多い。しかしながら、アンドロゲン枯渇療法が一時的に奏功しても、長期的に継続した場合にはアンドロゲン依存性を失うことにより治療抵抗性となって腫瘍が再増殖することがしばしば認められる。このようにアンドロゲン枯渇療法によって去勢レベルのテストステロン値にもかかわらず増悪する腫瘍を去勢抵抗性前立腺癌と呼ぶ。

去勢抵抗性前立腺癌に対する治療にはさまざまな新規ホルモン療法剤、化学療法剤が用いられるが、その治療成績は十分なものではない。前立腺癌により死亡に至るほとんどの場合において去勢抵抗性が問題となる。薬剤による全身療法に加え、前立腺癌に対する局所療法として放射線治療がある。限局性前立腺癌の初回治療として放射線治療は手術と同様に良好な治療成績が得られることからアンドロゲン枯渇療法と併用あるいは単独で前立腺局所の治療に放射線治療が用いられる。去勢抵抗性前立腺癌を克服する方法の一つとして、薬剤とは異なった物理的なアプローチである放射線治療の果たす役割は大きいことが期待される。しかしながら、去勢抵抗性前立腺癌はX線による放射線治療に対して抵抗性であるとされており、実際その治療成績が好ましくないことも報告されている。この去勢抵抗性前立腺癌におけるX線抵抗性について分子生物学的な機序は明らかでない。X線抵抗性の機序が解明されれば、有効な照射方法(線量分割等)の開発、あるいは従来の薬物療法とは異なった機序(放射線治療との併用における増感等)での新規薬剤の開発につながることを期待され、去勢抵抗性前立腺癌の克服において大きな意義があると考えられる。

前立腺癌がアンドロゲン枯渇療法抵抗性を獲得する機序として、アンドロゲン受容体及びそのシグナル経路や AKT、ERK など細胞増殖に關与するキナーゼにおける新たな遺伝子変異や発現亢進、epithelial-mesenchymal transition などが示唆されている(図(1)b Zong Y. et al 2013)。しかしながら、これらの去勢抵抗性の獲得における変化がX線抵抗性の獲得に関してどのように關連しているかという報告は少ない。アンドロゲンレセプターのシグナルの下流に PRKDC や PARP-1 といった DNA 損傷の修復に關わるタンパクの発現があり、放射線抵抗性に關連している(Bartek J. et al 2013 図(2))といった報告があるが、その全容は未解明である。

我々はこの機序を明らかにするため、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP(親株)をアンドロゲン低濃度含有培地で長期間培養し、アンドロゲン枯渇療法抵抗性株 LNCaP-LA(抵抗株)を樹立した。さらに、抵抗株は親株より X 線抵抗性であることを見出した。すなわち、我々は去勢抵抗性前立腺癌株で、かつ、放射線抵抗性を示すモデルをすでに確立している。さらに親株であるアンドロゲン感受性株と遺伝的バックグラウンドが近いため、このモデルを用いて、遺伝子レベルの比較やタンパク発現の差異を解析することにより X 線抵抗性の機序の解明が可能であると考えられる。

關連タンパクが明らかになれば、阻害剤

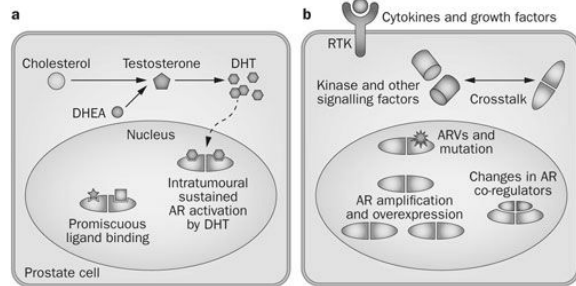


図1 去勢抵抗性のメカニズム

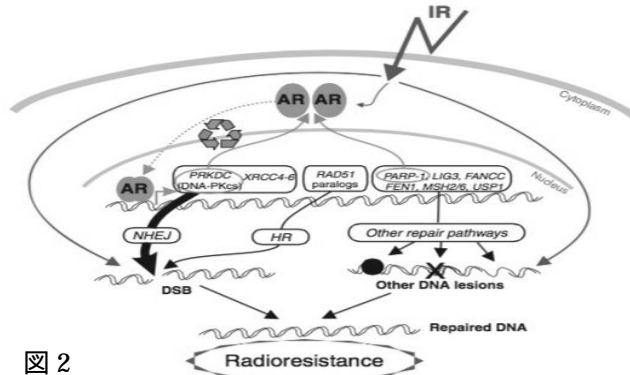


図2

去勢抵抗性が放射線抵抗性に影響するメカニズムの仮説

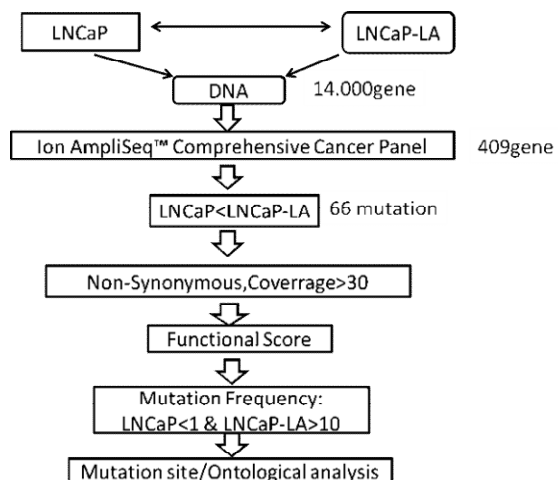


図3 候補遺伝子の絞り込み概念図

等の併用により X 線抵抗性の改善が期待しうる。我々は、すでに DNA レベルで解析を開始しており Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel を用いて複数の候補遺伝子を見出している。(図 3)

さらに、X 線抵抗性を克服する手法の一つに修復阻害剤など薬剤とは別のアプローチとして炭素イオン線が期待されている。炭素イオン線は高 LET 放射線に分類され、高い生物学的効果を持ち、さまざまな腫瘍において臨床的に優れた局所制御効果と非再発生存率が得られている。このことから、限局した去勢抵抗性前立腺癌に対し炭素イオン線治療が有効である可能性があり、現在去勢抵抗性前立腺癌に対する炭素イオン線治療の有効性を問う臨床試験が行われている。理論的には X 線抵抗性の腫瘍の全てにおいて炭素イオン線治療が有効とは限らないが、前述したような DNA 損傷からの修復が放射線抵抗性に関連しているものと仮定すると、修復しがたい DNA 損傷を与える炭素イオン線治療が去勢抵抗性前立腺癌の放射線抵抗性を克服する手段として生物学的にも有効であると考えられる。

2. 研究の目的

去勢抵抗性前立腺癌はアンドロゲン枯渇療法に抵抗性を示すだけでなく X 線治療にも抵抗性を示し、治療に難渋することが臨床的に問題となっている。去勢抵抗性前立腺癌において X 線抵抗性獲得機序、すなわち原因遺伝子、タンパクを同定することで、X 線抵抗性を克服する可能性について探索する。さらに、炭素イオン線治療が去勢抵抗性前立腺癌において X 線抵抗性を克服しうるかについて明らかにする。

3. 研究の方法

使用細胞株

前立腺癌細胞株として広く用いられているアンドロゲン感受性株 LNCaP 及び我々が樹立した LNCaP-LA を使用した。LNCaP-LA はアンドロゲンを通常より低濃度に調整した培地で LNCaP を長期間培養し作成したアンドロゲン非感受性株、すなわち *in vitro* の去勢抵抗性前立腺癌モデルである。LNCaP(親株)と LNCaP-LA(抵抗株)を比較することで遺伝子的比較が比較的行いやすいと考えられる。

(1) LNCaP 及び LNCaP-LA において RNA の発現解析を行い、DNA の解析結果と比較検討し、有力な候補遺伝子/タンパク、パスウェイを同定する。

LNCaP 及び LNCaP-LA において Whole Transcriptome Assay を行う。まず、それぞれの株において Whole Transcriptome Assay を行い、標準化の上、発現量の差異を比較する。必要により、前述の市販の去勢抵抗性株の発現量も考慮し、候補遺伝子を探索する。また、解析ソフトウェアを用い、パスウェイ解析も行い候補タンパク、パスウェイを探索する。

この結果とすでに Cancer Panel の結果より導いた DNA の解析結果と比較検討し、有力な候補遺伝子/タンパク、パスウェイを同定する。

(2) LNCaP 及び LNCaP-LA の炭素イオン線照射の反応性を確認する。

炭素イオン線への反応性は前述の Survival assay にて判定する。種々の線量の炭素イオン線を照射し、LNCaP 及び LNCaP-LA の反応性を比較検討する。

4. 研究成果

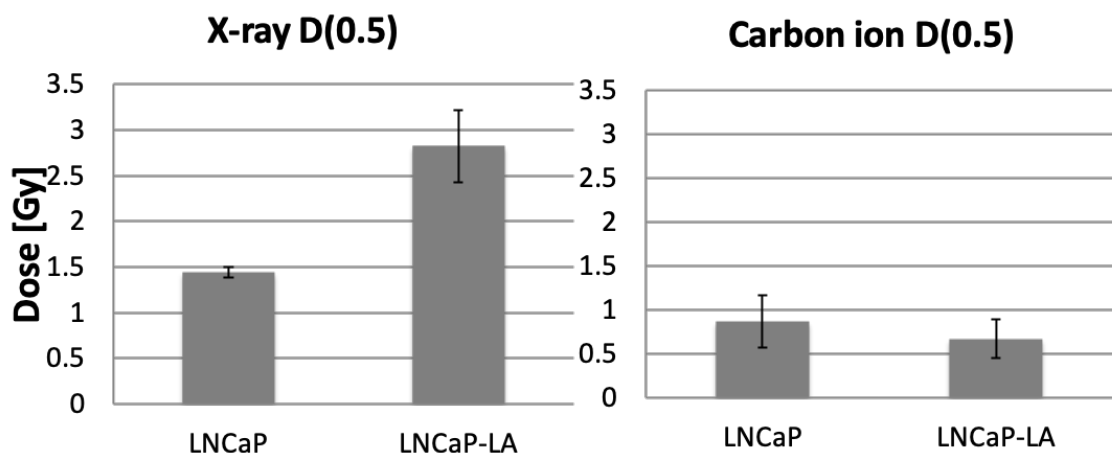
(1) LNCaP 及び LNCaP-LA において Whole Transcriptome Assay を行った。解析ソフトウェアを用い、パスウェイ解析を行い酸化ストレス防御に関連した NRF-2 パスウェイ の関与が考えられた。

実験結果の妥当性の検証と臨床上的の特性との一致について検討した。Comprehensive Cancer Panel を用いて見出された複数の候補遺伝子についてサンガー法による変異の確認を行い、さらに遺伝子の背景等を検討し妥当性を確認した。

Whole Transcriptome Assay によって得られた発現パターンについて、function analysis などの手法で解析を行い、発現変化が臨床上的の去勢抵抗性前立腺癌の特徴(細胞増殖、神経内分泌への分化、細胞死への抵抗性など)を再現している事などを確認した(表)。

Diseases or Functions Annotation	p-Value	Predicted Activation State	Activation z-score
generation of cells	5.86E-03	増加	3.055
development of neuron	4.96E-03	増加	2.129
apoptosis	2.38E-04	減少	-2.011
organismal death	1.91E-06	減少	-2.306
necrosis	2.14E-04	減少	-2.388

(2) X線の照射実験を行いLNCap-LAはLN-CaPに比べX線抵抗性であることを確認した。さらに、重粒子線の照射実験を行い、LNCap-LAとLN-CaPで重粒子線抵抗性に差がないことを明らかにした。50%の細胞死をもたらすのに必要な線量を基準とした場合、重粒子線のX線に対する生物学的効果比(Relative Biological Effectiveness)はLNCaPで1.92、LNCaP-LAでは3.96であった(下図)。このことは修復しがたいDNA損傷を与える炭素イオン線治療が去勢抵抗性前立腺癌の放射線抵抗性を克服する手段として生物学的に有効である可能性を示す一助となると考える。



(3) 学会等に参加し、質疑を通じて情報交換を行うとともに、当該分野の最新の知見を得るため情報収集を図った。現在までの内容について論文作成、投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

2018/05/21 PTCOG57 Cincinnati, USA

The difference of radiation sensitivity between X-ray and Carbon ion beam in Castration-resistant prostate cancer

6. 研究組織

特記事項なし

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。