

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09164

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌のドセタキセルに対する耐性獲得機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanism mediating the acquired resistance to docetaxel in castration-resistant prostate cancer and the development of the novel therapy targeting this mechanism

研究代表者

三宅 秀明(MIYAKE, Hideaki)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：60379435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)細胞株を、ドセタキセルに持続的に暴露させ、薬物濃度を段階的に上昇させることにより、ドセタキセルに対する耐性株を樹立したが、カバジタキセルに対しては交叉耐性を示さず、母細胞株と同等の感受性を示すことを確認した。次いで、耐性株においては、ドセタキセル暴露の有無にかかわらず、AktおよびMAPKが恒常的にリン酸化されていることを明らかにし、特に特異的Akt阻害剤を併用することによりドセタキセルの耐性株に対する感受性は顕著に亢進することを示した。また、in vivoにおいても耐性株はドセタキセルに比しカバジタキセルに対して顕著に良好な感受性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドセタキセルはホルモン療法に抵抗性を獲得した進行前立腺癌に対する第一選択の治療である。本研究ではドセタキセル抵抗性前立腺癌株を樹立し、その解析を行ったところ、ドセタキセル抵抗性にAktの恒常的リン酸化が重要な役割を果たしていることを明らかにし、Akt特異的阻害剤がドセタキセル抵抗性前立腺癌株のドセタキセルに対する感受性を顕著に亢進させることを示した。以上より、上記の試みが進行前立腺癌に対する新たな治療戦略になりえる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A parental human CRPC cell line, PC3 (PC3/P) was continuously exposed to increasing doses of docetaxel, and cell line resistant to docetaxel, PC3/R, was developed. There were no significant differences in sensitivities to cabazitaxel, between PC3/P and PC3/R. In PC3/P, both docetaxel and cabazitaxel markedly inhibited the expression levels of phosphorylated Akt and p44/42 MAPK. In PC3/R, however, phosphorylation of Akt and p44/42 MAPK were maintained following treatment with docetaxel, whereas treatment with cabazitaxel resulted in the marked down-regulation of phosphorylated Akt, but not that of p44/42 MAPK. Antitumor activity of cabazitaxel in CRPC cells even after the acquisition of resistance to docetaxel could be explained, at least in part, by the inactivation of Akt, persistently phosphorylated following treatment with docetaxel.

研究分野：泌尿器科悪性腫瘍

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 ドセタキセル 耐性獲得機構 新規治療

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、我が国の男性における罹患率1位の癌であり、ホルモン療法に対する感受性が高く比較的予後良好との特徴を有するが、ほぼ全ての進行癌は同療法にて完治することはなく、数年内に抵抗性を獲得し去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC: castration-resistant prostate cancer) と診断される。2014年以降、CRPCの予後改善効果が示された2種類の新規 androgen receptor (AR) 標的薬 (abiraterone acetate、enzalutamide)、cabazitaxel および Ra-223 の計4剤が本邦の実臨床の場でも使用可能となり、CRPC に対する治療は大きな変革の中にある (Miyake H et al, Clin Genitourin Cancer 2017; 15: e591-e597, Miyake H et al, Med Oncol 2017; 34: 141, Miyake H et al, Clin Genitourin Cancer 2017; 15: 313-319)。しかし、2004年に初めてCRPCの予後を有意に延長することが示された docetaxel は、現在も CRPC の逐次治療の中で中心的な役割を果たしているが、その一方で CRPC に対する docetaxel の奏効期間は約8ヵ月と報告されており (Miyake H et al, Urol Oncol 2013; 31: 733-738)、決して満足出来るものではない。今日まで、異なる作用機序を有する他剤を併用し、docetaxel の CRPC に対する効果を改善しようとする試みが多数行われてきたが、いずれも docetaxel 単剤の効果を上回る結果は得られておらず、この事実は、いみじくも CRPC に対する docetaxel の有用性を強く示唆している。よって、CRPC に対する docetaxel のさらなる効果改善を目指すには、より抜本的な対策、つまり CRPC が docetaxel に対する耐性を獲得する分子機序を明らかにし、それに基づく耐性克服を目指した新規治療の開発が必要であるとの仮説の下、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究は CRPC に対する逐次薬物療法の中心的役割を果たしている docetaxel の抗腫瘍効果改善を通じて進行前立腺癌患者の予後延長に寄与する可能性のある基礎的所見を集積するために、培養 CRPC 細胞の docetaxel に対する耐性獲得機序解明およびその分子機構に基づく耐性克服戦略の構築を目指して計画したものである。今日まで特定の遺伝子を強制発現あるいは発現阻害することで、CRPC に対する docetaxel の感受性が変化したとの報告は散見されるが (Sakai I, Miyake H et al, Cancer Sci 2011; 102: 769-775)、獲得耐性を反映した CRPC モデルを用いた報告は殆ど認められない。研究代表者は以前より腎癌細胞株を用いて、複数の分子標的薬に対する耐性獲得機序の解明に取り組んできたが (Harada K, Miyake H et al, Clin Transl Oncol 2014; 16: 801-806, Harada K, Miyake H et al, Br J Cancer 2013; 109: 2389-2395, Sakai I, Miyake H et al, BJU Int 2013; 112: E211-E220)、その際に修得した薬剤耐性株樹立方法を用いて独自の docetaxel 耐性株の樹立を見込んでいる。また、docetaxel 耐性株および母細胞株の遺伝子発現レベルを含む形質の違いを、研究代表者等が独自に開発した cDNA microarray を用いて網羅的に解析する (Terakawa T, Miyake H et al, Br J Cancer 2009; 101: 1731-1739)。さらに、研究代表者の過去の薬物耐性に関連した基礎研究の経験から、CRPC の docetaxel に対する耐性獲得にも、主要なシグナル伝達系の恒常的活性化およびアポトーシスあるいは epithelial-mesenchymal transition (EMT) に関連する分子の adaptive な発現増強等の関連が予想され、このような形質変化に焦点を当てた解析の施行も予定する。また、これらの所見に基づき、docetaxel 存在下でも継続的に活性化される分子カスケード等の標的分子候補が明らかになれば、それらを研究代表者が豊富な経験と独自のシステムを有するアンチセンスオリゴあるいは siRNA 等の核酸関連医薬開発の手法を中心に (Miyake H et al, Cancer Res 2000; 60: 170-176, Miyake H et al, Cancer Res 2000; 60: 2547-2554, Miyake H et al, Clin Cancer Res 2000; 6: 1655-1663)、各種キナーゼ特異的阻害剤、中和抗体等も駆使してブロックすることで、耐性克服に繋がる新たな分子標的治療の確立を目指すものである。以上より本研究計画は、研究代表者が実臨床の場で難渋している問題を基礎的な手法で検証し、さらにその成果を新たな分子標的治療の確立に繋げんとするトランスレーショナルリサーチの実践を目的としたものであり、その着想のみならず、研究の実践という面においても高い独自性で特徴付けられていると確信する。

## 3. 研究の方法

### (1) CRPC の docetaxel に対する耐性獲得機序の解明

Docetaxel 抵抗性 CRPC 細胞株の樹立：研究代表者は癌細胞株を薬物に持続的に暴露させ、薬物濃度を段階的に上昇させることにより、その薬物に一定の耐性を獲得した癌細胞株の樹立方法に精通しており、本研究でも同様の手法で2種類の CRPC 細胞株 (DU145、PC3) を用いて docetaxel に対する耐性株を樹立する。その際、臨床的な視点を考慮し最終的には docetaxel に対して母細胞株の約5-6倍の IC50 を示す耐性株の樹立を目指す。また、docetaxel 抵抗性 CRPC に対する効果が示されている cabazitaxel の母細胞株および耐性株に対する効果を、併せて検証する。Docetaxel 抵抗性 CRPC 細胞株におけるシグナル伝達関連分子の活性化の評価：研究代表者は、docetaxel 耐性株においては docetaxel 存在下でも、細胞増殖関連シグナル伝達に関

与する主要分子のリン酸化が恒常的に認められることを想定している。そこで、docetaxel 耐性 CRPC 細胞株および母細胞株の docetaxel 投与前後での Akt、MAPK、STAT3 および JNK 等を介するシグナル伝達経路の主要分子の活性化の評価に加え、チロシンキナーゼ活性を有する種々の受容体蛋白のリン酸化を RTK Phosphorylation Antibody Array (RayBiotech, Norcross, GA, USA) を用いて評価する。Docetaxel 抵抗性 CRPC 細胞株における遺伝子発現レベルの評価：研究代表者は、CRPC の docetaxel に対する抵抗性獲得に EMT およびアポトーシス関連分子の関与を想定している。したがって、docetaxel 耐性 CRPC 細胞株および母細胞株の docetaxel 投与前後における E-cadherin、N-cadherin、vimentin、 $\beta$ -catenin、Snail、Slug、ZO-1、MMP-2 および MMP-9 等の EMT 関連分子 (Behnsawy HM, Miyake H, et al, BJU Int 2013; 111: 30-37)、Bcl-2、Bax、Bcl-xL、clusterin、Mcl-1 および p53 等のアポトーシス関連分子 (Miyake H et al, Urol Oncol 2010; 28: 145-151) の発現レベルを Western blotting 等により評価する。また、cDNA microarray を用いて、上記と同様のサンプル間における遺伝子発現レベルを網羅的に比較解析する。なお、本解析には、泌尿器癌に対する分子標的療法の開発をテーマに 2000 年以來、研究代表者と共同研究を展開している Dr Martin Gleave (University of British Columbia, Vancouver, Canada) より供与されたヒト前立腺癌組織を用いて作製した cDNA microarray を用いている予定である。また、研究代表者は従来より cDNA microarray を用いた網羅的遺伝子解析を頻繁に行っており、コンピュータープログラムを使用し客観的で信頼性の高い結果解析を行うことが可能である。

#### (2) CRPC の docetaxel に対する耐性獲得の分子機構に基づく新規治療の開発

上記の実験により、CRPC の docetaxel に対する耐性獲得に重要な役割を果たす可能性のある分子が同定される予定である。本研究では、それらの候補分子の活性を阻害し得る様々な方法を用いて、docetaxel 耐性克服を目指した新規治療の確立に向けた検討を行う。具体的には、特異的阻害剤、アンチセンスオリゴ、siRNA および中和抗体等を用いることが想定される。また、活性阻害の対象となる標的分子は、細胞増殖関連シグナル伝達等、生体内で重要な生理的機能を担っている可能性が高く、システムックにその機能を抑制すると重大な副作用の原因となり得るので、臓器特異的な発現抑制が必要となる可能性もある。これらに加え、経済性、我々の過去の経験と実績および臨床応用の可能性等を考慮すると、アンチセンスオリゴを用いた分子標的治療開発が本研究には最も適した戦略であると考えている (Miyake H et al, Expert Opin Investig Drugs 2006; 15: 507-17, Miyake H et al, Expert Rev Anticancer Ther 2005; 5: 1001-1009)。In vitro における検討：活性阻害手段の種類を問わず、まず耐性株における標的分子の活性が濃度依存的に阻害されることを確認する。その上で、耐性株の docetaxel に対する感受性が、標的分子の活性阻害により亢進するか否かを解析し、耐性株の cabazitaxel に対する感受性とも比較する。また、耐性克服に基づくより強力な治療戦略の確立に向けた検討を行う。つまり、各種分子標的薬等の作用機序の異なる薬剤に対する耐性株の交叉耐性の有無を検討し、適切な併用あるいは逐次治療のレジメを明らかにする。さらに、研究代表者が以前に開発した clusterin、bcl-2、bcl-xL、IGFBP-2、IGFBP-5 および HSP27 等の遺伝子を標的にしたアンチセンスオリゴ (Miyake H et al, Cancer Res 1999; 59: 4030-4034, Miyake H et al, Int J Cancer 2000; 86: 855-862) や他の異なる分子標的治療 (Miyake H et al, J Urol 1999; 162: 2176-2181) と標的分子の活性阻害との併用効果も検討する。In vivo における検討：において docetaxel に対する耐性克服を示唆する所見が得られた標的分子の活性阻害の効果を in vivo で検討する。母細胞株および耐性株を皮下および同所移植等の方法でマウスに移植し (Miyake H et al, J Urol 1998; 160: 1562-1566)、docetaxel 単独、cabazitaxel 単独および docetaxel と耐性獲得標的分子の活性阻害の併用投与を行い、その抗腫瘍効果を比較解析する。また、摘出腫瘍組織を用いて、標的分子の in vivo における活性阻害効果を検証する。

#### 4. 研究成果

CRPC 細胞株を、docetaxel に持続的に暴露させ、薬物濃度を段階的に上昇させることにより、docetaxel に対する耐性株を樹立したが、cabazitaxel に対しては交叉耐性を示さず、母細胞株と同等の感受性を示すことを確認した。上記の結果は in vivo における皮下腫瘍モデルでも同様に確認された。次いで、耐性株においては、docetaxel 暴露の有無にかかわらず、Akt および MAPK が恒常的にリン酸化されていることを明らかにし、特に特異的 Akt 阻害剤を併用することにより docetaxel の耐性株に対する感受性は顕著に亢進することを示した。現在、docetaxel 耐性に関与することが示唆された遺伝子に対するアンチセンスオリゴ療法の効果を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 三宅秀明	4. 巻 78
2. 論文標題 mCRPCに対する逐次治療におけるタキサン系抗がん薬の役割	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 1012-1018
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三宅秀明
2. 発表標題 進行前立腺癌治療に関する最近の話題
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会四国地方会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------