

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09209

研究課題名（和文）前立腺癌におけるFUSE binding protein制御による治療戦略の確立

研究課題名（英文）Treatment strategy by controlling FUSE binding protein in prostate cancer

研究代表者

橋本 剛 (Hashimoto, Takeshi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：10421033

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）：本研究では去勢抵抗性前立腺癌の化学療法耐性の機序を突き詰めることが第一の目的と考えている。その過程でFUSE binding protein (FBP) に着目した。これまでFBPを介しc-myc, TNF発現が上昇していることを突き止め、FBPをノックアウトすることでc-myc, TNFを介したシグナリングが低下することで細胞増殖能が抑制されるか確認できた。また、FBPをノックダウンした細胞株ではその増殖能が著しく低下していることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌は一般的に死に至ることが少ない癌であるが去勢抵抗性前立腺癌に進行した場合3年で半数が死亡するといわれている。したがって去勢抵抗性前立腺癌の進行を食い止めることが前立腺癌死を減らすためにはとても重要となる。本研究では去勢抵抗性前立腺癌に行われる化学療法への抵抗性のメカニズムを解明する過程で増殖に關与すると考えられる新たなタンパク質を同定した。そのたんぱく質に変異を起こすことで細胞の増殖が制御され治療的意義があることが確認された。今後同たんぱく質の詳細なメカニズムを解明し治療へと役立てたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：The primary purpose of this study is to investigate the mechanism of chemotherapy resistance in castration-resistant prostate cancer. In the process, we focused on FUSE binding protein (FBP). Until now, it has been found that c-myc and TNF expression is increased via FBP, and it can be confirmed whether cell proliferation ability is suppressed by knocking out FBP and reducing signaling via c-myc and TNF. In addition, it was confirmed that the proliferative ability of the cell line in which FBP was knocked down was significantly reduced.

研究分野：泌尿器科

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌

1. 研究開始当初の背景

転写因子である NF- κ B は、癌の増殖、転移に重要な役割を持つことが知られている。我々はこれまで膀胱癌において NF- κ B が細胞増殖および、抗癌剤耐性機序に寄与している可能性を報告してきた。ホルモン不応性前立腺癌患者に対し Docetaxel による化学療法がおこなわれるが多くの患者において化学療法耐性となり治療困難となる。これまで我々の研究室ではタキサン系抗癌剤と NF- κ B 阻害剤の併用療法が予後の改善につながる可能性を示してきた。今回応募者らは細胞増殖の機序の一つとして FUSE binding protein (FBP) に注目した。本研究では前立腺癌増殖の機序として FBP を介し c-myc, TNF 発現が上昇していることを突き止め、FBP をノックアウトすることで c-myc, TNF を介したシグナリングが低下することで細胞増殖能が抑制されるか確認する。さらには、FBP 選択的結合剤を用いることで他の抗腫瘍薬剤との併用で抗腫瘍効果の増強を期待した新規治療戦略を確立する。

Docetaxel は現在ホルモン不応性前立腺癌に対して一般的な化学療法の一つとなっている。しかし、やはりその多くは経過中に Docetaxel 不応性前立腺癌へと進行し治療効果が乏しくなる。これまで Docetaxel 不応性前立腺癌に関して β -tubulin や PTEN loss、PI3K/AKT や mTOR が関連していると報告があるがそのメカニズムの解明は不十分である。これまで前立腺癌の増殖に NF- κ B が関与しているという報告があり (Cancer. 2014;120:3208-18.)、さらには抗癌剤耐性前立腺細胞株において High Mobility Group Box1 を介して NF- κ B が上昇する可能性が報告されている (Sci Rep. 2015;5:15085) 。今回研究代表者らは細胞増殖および薬剤耐性の機序の一つとして FUSE binding protein (FBP) に注目した。FBP は、標的遺伝子の転写調節に関与する遺伝子であり、肝細胞癌患者や肺癌患者では FBP の過剰発現は患者の予後不良と関連するという報告がある (Hepatology.2014;60:1241-50.、J Pathol. 2015;237:390-401) 。これまでの研究で FBP は c-myc や TNF に関与する可能性が示唆されている (Mol Carcinog. 2015;54:405-15.) 。研究代表者らはこれまでの研究結果から FBP が c-myc や TNF を介し NF- κ B 活性に影響を与え、FBP 選択的結合剤を用い FBP を脱リン酸化することで NF- κ B 活性が抑えられるのではないかと考えた (図1) 。したがって FBP が c-myc や TNF を制御しさらには、細胞増殖に関与しているのではないかと考えられた。

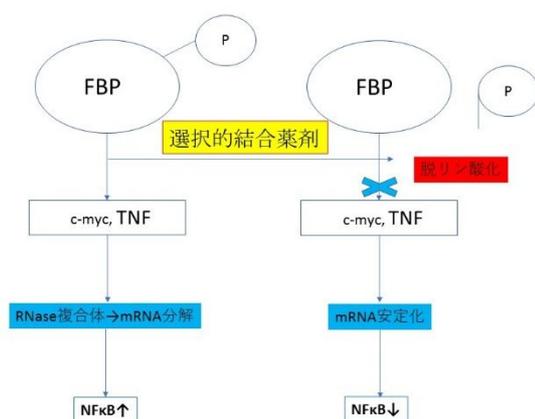


図1

2 . 研究の目的

これまで我々の研究で薬剤耐性および、増殖能の獲得に関して NF B 活性が関与していることが強く示唆された。しかし、それらのメカニズムはいまだ十分に解明されていない。現在我々は選択的 FBP 結合薬剤である新規抗癌剤を東京医科大学ケミカルバイオロジー講座の半田宏教授より供与され、泌尿器科癌の基礎研究を行っている。この新規薬剤はホルモン不応性前立腺癌細胞株である DU145、PC3 において単独で抗腫瘍効果をもたらした（図 2）。本研究では前立腺癌において FBP が c-myc および TNF を介したシグナリングを活性化することで細胞増殖を促すことを解明し、FBP ノックアウト前立腺癌細胞株、および過剰発現細胞株を作成し、それら細胞の増殖能を研究することで FBP が細胞増殖に関与しているか in vitro および in vivo で明らかにする。

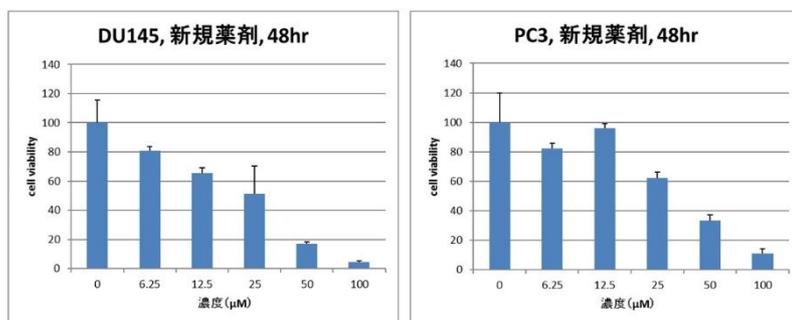


図 2

3 . 研究の方法

使用細胞株：前立腺癌細胞株（PC3, DU-145, LNCaP, C4-2）

本研究の第一段階として上記 4 種類の前立腺癌細胞株において FBP の発現を確認する。次いで FBP transfection 前立腺癌細胞株および、siRNA、CRISPR-Cas9 法を用いて FBP knock-down、knock-out 前立腺癌細胞株を 4 種類の前立腺癌細胞株で作成する。FBP に関するプラスミドは過去に報告されており（PLoS One. 2017;12:e0169852., Mol Med Rep. 2016;14:3759-68.）これらの報告を参考に商品化されているプラスミドを使用する。本研究では FBP の発現量は定量的 PCR、ウェスタンブロット、などで評価する。

これら 4 種類の前立腺癌細胞株で作成した FBP 過剰発現、および発現抑制株を用い細胞増殖能について評価する。本研究では細胞増殖は MMT Assay で行い、c-myc 活性や TNF 活性の定量は定量的 PCR、ウェスタンブロット、Transcription Factor Assay を用い評価する。

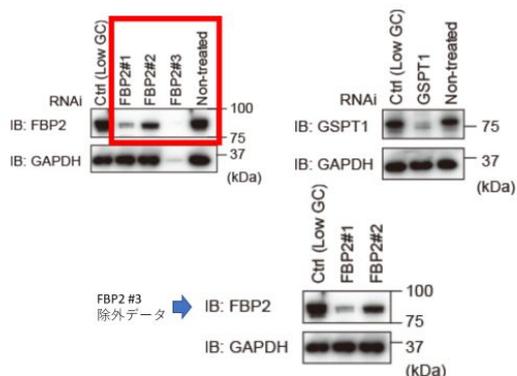
4 . 研究成果

我々の研究室にある FBP 阻害剤を用い再度前立腺癌に対して細胞増殖の抑制が確認できるか in vitro で確認したが前回の結果と同様の傾向がみられた。

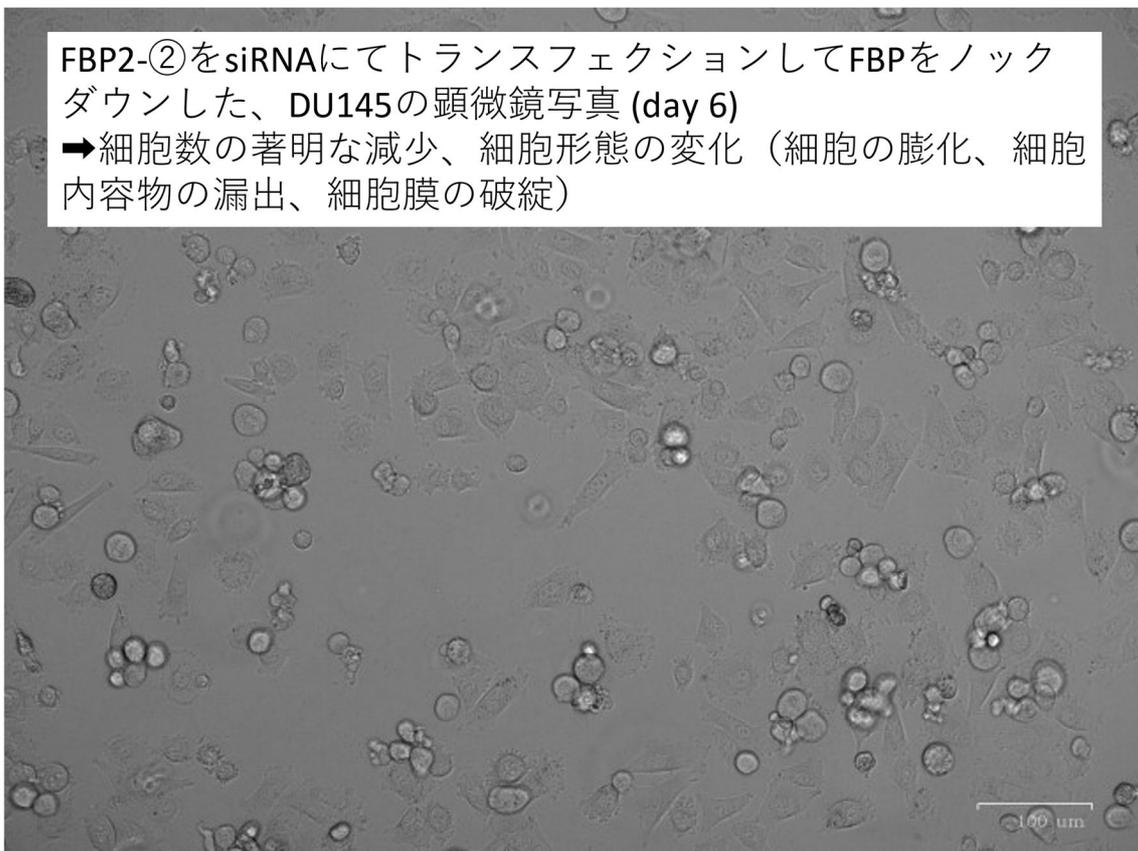
そこで siRNA を用い目的遺伝子部位の変異を起こした細胞を作成した。FBP では有効な切断候補部位が 3 か所みられたため 3 種類の siRNA を用いそれぞれ検討した。結果は 3 か所中 2 か所において有効な細胞増殖の抑制が確認できた。後者の 2 か所では細胞変形が著しくアポトーシ

スが誘導されている可能性が考えられた。

Western blotting



FBP2-②をsiRNAにてトランスフェクションしてFBPをノックダウンした、DU145の顕微鏡写真 (day 6)
→細胞数の著明な減少、細胞形態の変化 (細胞の膨化、細胞内容物の漏出、細胞膜の破綻)



次いで当施設の半田宏研究室と共同実験を行い FBP の作用点と思われる上記 2 部位に変異を起こした去勢抵抗性前立腺癌細胞株の樹立を行った。ウイルスベクターを用い同部位に変異を導入した細胞株が安定して増殖することを確認できた。

同細胞を用いた実験を計画していたがコロナの影響で FBP 阻害剤の供給が滞り現時点では薬剤の供給待ちとなっている。

今後薬剤が供給され次第研究を再開したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 McDevitt MR, Thorek DLJ, Hashimoto T	4. 巻 9
2. 論文標題 Feed-forward alpha particle radiotherapy ablates androgen receptor-addicted prostate cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-04107-w	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

1. 著者名 Mima Takashi, Ohori Makoto, Hirasawa Yosuke, Mikami Ryuji, Arai Ayako, Hashimoto Takeshi, Satake Naoya, Gondo Tatsuo, Nakagami Yoshihiro, Namiki Kazunori, Tokuyue Koichi, Ohno Yoshio	4. 巻 49
2. 論文標題 Salvage radiation therapy for prostate cancer patients after prostatectomy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 281 ~ 286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyy195	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kamoda Naohiro, Ohori Makoto, Hirasawa Yosuke, Inoue Rie, Hashimoto Takeshi, Satake Naoya, Gondo Tatsuo, Nakagami Yoshihiro, Nagao Toshitaka, Ohno Yoshio	4. 巻 49
2. 論文標題 Prognostic significance of the presence of tertiary Gleason grade 5 in robot-assisted radical prostatectomy specimens in Japanese patients with clinically localized prostate cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 276 ~ 280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyy194	査読の有無 有
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 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 橋本 剛
2. 発表標題 Predicting factors for progression to castration-resistant prostate cancer after biochemical recurrence in patients with clinically localized prostate cancer who underwent radical prostatectomy
3. 学会等名 米国泌尿器科学会（国際学会）
4. 発表年 2019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	大野 芳正 (Ohno Yoshio) (40266482)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	
研究 分担者	下平 憲治 (Shimodaira Kenji) (90532226)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	

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