

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16686

研究課題名(和文) HSF1阻害によるARバリエントを標的とした去勢抵抗性前立腺癌の新規治療の開発

研究課題名(英文) Novel therapy targeting androgen receptor splice variants by inhibiting heat shock factor 1 (HSF1) for the treatment of castration-resistant prostate cancer

研究代表者

木島 敏樹 (Kijima, Toshiki)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：90569500

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)：前立腺癌の去勢抵抗性獲得機序の一つとして、アンドロゲン結合部位を持たずに恒常的活性状態となる、アンドロゲン受容体スプライスバリエント(AR-Vs)がある。熱ショック因子(Heat shock factor1:HSF1)は、AR-Vsの成熟・安定化に必要な熱ショック蛋白質HSPの発現を調節する転写因子である。低分子化合物ライブラリーより有効なHSF1阻害剤を見だし、前立腺癌細胞株動物モデルを用いて、HSF1阻害剤のAR-Vs抑制効果および抗腫瘍効果を示した。AR-Vsをターゲットとした新規治療の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化に伴い前立腺癌の患者数は増加の一途を辿っている。去勢抵抗性前立腺癌は根治不能であり、病勢維持に有効な薬剤も限られているため、去勢抵抗性前立腺癌に対する新規治療法の開発は多くの患者に貢献する。本研究は去勢抵抗性前立腺癌に対する新規治療の可能性を示すのみならず、熱ショック因子(HSF1)という抗癌治療における新規標的分子を提唱した点で意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Inhibition of the molecular chaperone heat shock protein (HSP) 90 could provide a multifaceted approach to target castration resistant prostate cancer (CRPC) by degrading full-length AR (AR-FL) as well as various oncoproteins. Yet HSP90 inhibition has been shown to be ineffective in degrading AR variants (AR-Vs), suggesting that the stability and function of AR-Vs depend on other molecular chaperones. We tested whether inhibition of heat shock factor 1 (HSF1), the master transcription factor regulating all HSPs, could show antitumor activity by degrading AR-Vs. Functional knockdown of HSF1 resulted in degradation of both AR-FL and AR-Vs. Among the small molecule library, HSF1 inhibitor triptolide was found to effectively inhibit both AR-FL and AR-Vs at nM concentrations. Triptolide, alone or combined with HSP90 inhibitor STA-9090 showed synergistic antitumor activity on xenograft model of AR-Vs expressing prostate cancer cells.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 ホルモン療法 化学療法 熱ショック因子 熱ショックタンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 前立腺癌細胞の増殖には、アンドロゲン受容体 (Androgen receptor: AR) を介した刺激が重要であり、血中アンドロゲン濃度を低下させるアンドロゲン除去療法 (去勢療法) が治療に広く用いられている。去勢療法は開始直後には有効であるものの、一定の治療期間後にはほぼ全ての患者が治療抵抗性を獲得する。この状態は去勢抵抗性前立腺癌 (Castration-resistant prostate cancer: CRPC) と呼ばれ、臨床上大きな問題となっている。去勢抵抗性癌化の機序として、AR 自体の変化による AR 経路の活性化が重要と考えられており、AR 遺伝子の増幅、リガンド (アンドロゲン) との結合性を高める AR 遺伝子変異、リガンド結合部位をもたずに恒常的活性化状態となる AR-splice variant (AR-Vs) などが知られている。現在の CRPC 治療に用いられる内分泌療法薬は、リガンド結合部位に対する競合的阻害薬、もしくはリガンド合成阻害薬であるため、これらの薬剤は AR-Vs を介した増殖刺激を理論上阻害できない。AR-Vs の発現が実際の CRPC 患者の予後不良予測因子となることが、臨床研究によっても示されており、AR-Vs をターゲットとした新規治療の開発が急務である。

(2) 熱ショック蛋白質 (Heat shock protein; HSP) は分子シャペロンと呼ばれ、様々な蛋白質の成熟、安定化、修復を担っている。なかでも HSP90 は、チロシンキナーゼ受容体や転写調節因子など、癌細胞の生存・増殖に関わる多くの癌原蛋白質をターゲット (クライアント蛋白) としており、HSP90 阻害剤は複数の癌増殖経路を同時に阻害する抗悪性腫瘍薬として高い注目を集めてきた。HSP90 のクライアント蛋白には AR も含まれるため、HSP90 阻害剤は、CRPC 治療においても AR 経路と AR 以外の癌増殖経路を同時に阻害する薬剤として注目されており、その CRPC に対する抗腫瘍効果は基礎研究、臨床研究にて示されてきた。AR-Vs 発現を有する CRPC 症例に対する治療戦略としても、HSP 阻害が有用であることが期待されるが、近年、HSP90 阻害剤は AR の発現を抑えるものの、AR-Vs の発現は阻害しないことが示された。

(3) HSP90 阻害剤が AR-Vs 発現の阻害に有効でない原因は現在まで明らかにされていないが、以下の、必ずしも排他的でない 2 つの要因が考えられる。

① AR-Vs 成熟に、HSP90 以外の HSP (HSP70 や HSP40) が重要である可能性

HSP90 は AR の C 末端 (リガンド結合部位) に結合することが知られている。これは、HSP90 が主に C 末端の成熟、安定化に関与しており、N 末端側の成熟・安定化には HSP90 以外の HSP が重要な役割を果たしている可能性を示唆する。AR の成熟過程では HSP90 に加え、HSP70、HSP40 などが重要であることが知られているため、C 末端を持たない AR-Vs の成熟・安定化の阻害のためには、これらの HSP がターゲットとなる可能性がある。

HSP90 阻害に伴う熱ショック因子 (HSF1) の活性化

熱ショック因子 (Heat shock factor1: HSF1) とは、HSP90 を含むすべての HSP 群の発現を調節する転写調節因子である。HSP90 阻害剤が一時的に HSF1 活性を増加させる現象は以前から知られていたが、近年申請者らは、HSP90 阻害剤が、HSF1 と DNA との結合を安定化させることにより HSF1 の転写活性を長時間維持し、結果的に HSP70、HSP40 などの発現を増加させることを示した。これらの仮説から、HSP90 阻害剤と HSF1 阻害剤の併用が、AR および AR-Vs の成熟、安定化に必要な HSP 群を抑制し、AR と AR-Vs 両者の発現を低下させる、AR-Vs 発現を有する CRPC に対する新規治療となる可能性が示唆される

2. 研究の目的

HSP90 阻害剤と HSF1 阻害剤の併用による、前立腺癌細胞中の AR および AR-Vs 発現に対する阻害効果を明らかにし、その抗腫瘍効果を *in vitro*、*in vivo* にて示すこと

3. 研究の方法

(1) 基礎的実験: HSP90/70 と AR-FL, AR-Vs の関連

免疫沈降ウエスタンブロット法により HSP90/70 と AR-FL, AR-Vs の結合性を調べ、さらに HSP90 阻害剤単剤では AR-Vs を阻害できないことを確認した。

(2) HSF1 阻害剤のスクリーニング

HSF1 に対する優れた特異的阻害剤はこれまで開発されていないが、HSF1 の活性化、DNA 結合、転写活性化などの各ステップを阻害する薬剤が複数報告されている。HSP90 阻害剤によって誘発される一過性の HSP70 発現亢進を指標として、CRPC 細胞株において、最も有効な HSF1 阻害剤をスクリーニングした。同時に HSF1 阻害剤による AR, AR-Vs 発現への影響も評価した。

(3) HSF1 Knock down による AR-Vs 抑制効果、強制発現 AR-Vs に対する HSF1 阻害剤の効果

HSF1 阻害剤による off target effect の可能性を評価するために、shRNA を用いた HSF1 の knock down を行い、AR-Vs 抑制が HSF1 阻害 (および HSP90 阻害剤との併用) を介したものであることを示した。HSF1 阻害剤による AR-Vs 発現抑制が腫瘍細胞株依存性ではなく、普遍的なものであることを示すために、AR 発現を持たない前立腺癌細胞株へ AR や AR-Vs を遺伝子導入し、強制発現させた AR, AR-Vs への抑制効果を示した。

(4) HSF1 阻害剤単剤および HSP90 阻害剤併用による抗腫瘍効果

スクリーニングにて選別された HSF1 阻害剤と HSP90 阻害剤を使用して、単剤および併用による

抗腫瘍効果を *in vitro* にて検証し、両者併用に相乗的な抗腫瘍効果が存在することを確認した。相乗効果は発揮するための至適な投与濃度や投与タイミングを検討した上で、治療効果を *in vivo* にて検証した。

4. 研究成果

(1) 基礎的実験：HSP90/70 と AR-FL, AR-Vs の関連

HSP90 は AR-FL と結合し、その結合が HSP90 阻害剤で阻害されること(図1) 一方 AR-Vs は HSP90 とは結合せず、HSP70 と結合すること(図2) HSP90 阻害剤は AR-FL のみ阻害し、AR-Vs を阻害しないこと(図3)を確認した。

図1

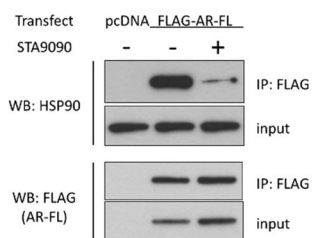


図2

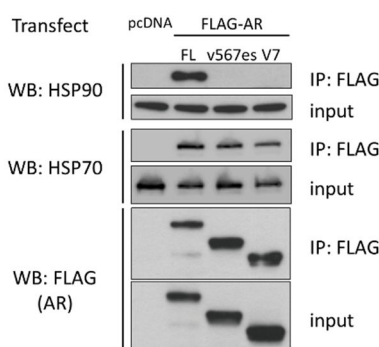
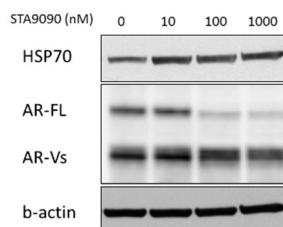


図3

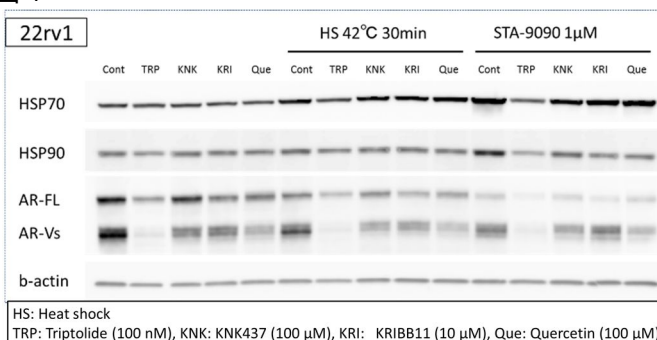


(2) HSF1 阻害剤のスクリーニング

AR-FL および AR-Vs 発現前立腺癌株(22Rv1)を用いて、熱ショック(HS)もしくは HSP90 阻害剤(STA-9090)刺激による反応性 HSP70 誘導を指標として、有効な HSF1 阻害薬を検索した。同時に HSF1 阻害剤による AR, AR-Vs 発現への影響も評価した。

図4

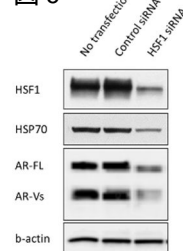
Triptolide が最も効率的に HSP70 発現を阻害し、同時に AR-Vs 発現を低下させることを確認した(図4)。以降の実験に HSF1 阻害剤として Triptolide を使用することとした。



(3) HSF1 Knock down による AR-Vs 抑制効果、強制発現 AR-Vs に対する HSF1 阻害剤の効果

HSF1 ノックダウン(図5)および HSF1 阻害剤による HSP 抑制効果、AR-Vs 抑制効果を確認した。

図5



さらに AR 非発現株 PC-3 を用いた AR-FL および AR-Vs の強制発現実験を行い、HSF1 阻害剤による AR-Vs 抑制効果を確認した。

(4) HSF1 阻害剤単剤および HSP90 阻害剤併用による抗腫瘍効果

HSF1 阻害剤 Triptolide と、HSP90 阻害剤(STA-9090)の併用療法の効果を、22Rv1 を用いた *in vitro* 実験(図6)および *in vivo* 実験(図7)にて検証した。

図6

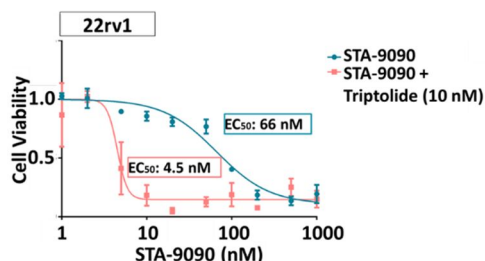
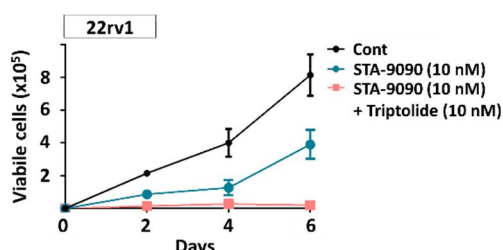


図7



Triptolide と STA-9090 の併用は、in vitro 実験において相乗的抗腫瘍効果を示し、マウス皮下腫瘍モデルにおいても相加的な腫瘍抑制効果を示した。有効投与濃度において、明らかな有害事象は認めず、AR-Vs 発現を伴う去勢抵抗性前立腺癌に対する有効な治療法となる可能性が示唆された。

本研究の成果は、HSF1 阻害により AR-Vs の発現を低下させるという、従来のホルモン療法および抗癌化学療法とは全く異なるアプローチによる去勢抵抗性前立腺癌の新規治療法開発を目指すものであり、新規性が高い。

HSP90 阻害剤は米国においては複数の薬剤が開発され、去勢抵抗性前立腺癌を含む複数の癌種に対して臨床試験が進んでいる。本研究の成果は去勢抵抗性前立腺癌に対する新規薬剤開発に貢献しうる。

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 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kijima T, Prince T, Neckers L, Koga F, Fujii Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 Heat shock factor 1 (HSF1)-targeted anticancer therapeutics: overview of current preclinical progress.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Expert Opin Ther Targets.	6. 最初と最後の頁 369-377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14728222.2019.1602119.	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 Kijima T, Prince TL, Tigue ML, Yim KH, Schwartz H, Beebe K, Lee S, Budzynski MA, Williams H, Trepel JB, Sistonen L, Calderwood S, Neckers L.	4. 巻 8
2. 論文標題 HSP90 inhibitors disrupt a transient HSP90-HSF1 interaction and identify a noncanonical model of HSP90-mediated HSF1 regulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6976
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-25404-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 Kijima T, Eguchi T, Neckers L, Prince TL.	4. 巻 1709
2. 論文標題 Monitoring of the Heat Shock Response with a Real-Time Luciferase Reporter.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 35-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-7477-1_3.	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木島敏樹、吉田宗一郎、横山みなと、石岡淳一郎、松岡陽、斎藤一隆、木原和徳、藤井靖久
2. 発表標題 Novel therapy targeting androgen receptor splice variants by inhibiting heat shock factor 1 (HSF1) for the treatment of castration-resistant prostate cancer
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----