

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18127

研究課題名（和文）去勢抵抗性前立腺癌への革新的挑戦 ～AR依存性ホルモン感受性再獲得因子の導入～

研究課題名（英文）Innovative Challenge to Castration-resistant Prostate Cancer: Introduction of AR-dependent Hormone Sensitivity Reacquisition Factor

研究代表者

高原 健（Takahara, Kiyoshi）

藤田医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90418939

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）：【目的】前立腺癌がホルモン治療抵抗性となるメカニズムを細胞実験で検討した。【方法】細胞実験において、ターゲット因子（AMACR、ASCT2）の抑制や、抗癌剤、ホルモン剤との併用療法を施行し、前立腺癌細胞増殖抑制効果を検討した。【結果】ターゲット因子（AMACR、ASCT2）を抑え、また抗癌剤やホルモン剤を併用することにより、前立腺癌細胞増殖を抑制できる可能性が示された。【結語】前立腺癌におけるホルモン抵抗性獲得メカニズムの解明に繋がる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

今回の結果は、前立腺癌のホルモン抵抗性獲得メカニズムの解明に役立つ可能性があり、治療に難渋する進行性前立腺癌患者にとって有益と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Using cell proliferation and Western blot analysis, we demonstrated that a-methylacyl-CoA racemase (AMACR) inhibition and docetaxel treatment, under androgen deprivation conditions, significantly reduced the proliferation of androgen receptor V7 (ARV7) positive cancer cells and decreased the levels of AR and ARV7 expression, possibly via downregulation of heat shock protein 27.

In vitro experiments indicated that the growth of LNCaP cells after combination therapy of alanine-serine-cysteine transporter 2 (ASCT2) siRNA and enzalutamide treatment was significantly reduced, compared to that following treatment with enzalutamide alone or ASCT2 siRNA transfection alone. After ASCT2 inhibition by siRNA transfection, the growth of 22Rv1 cells was significantly suppressed as compared with negative control siRNA via downregulation of ARV7 both in fetal bovine serum and androgen-deprivation conditions.

研究分野：Urology

キーワード：prostate cancer

1. 研究開始当初の背景

申請者らはホルモン依存性を喪失した去勢抵抗性前立腺癌 (Castration Resistant Prostate Cancer : CRPC) の発生機序解明を最重要課題と考え、研究に取り組んだ。申請者らの研究で使用頻度の高いホルモン依存性前立腺癌細胞株として LNCaP がある。申請者らは、カナダ・プリティシュコロンビア大学との共同研究で、LNCaP のアンドロゲン非依存性株である C4-2 を譲り受け、LNCaP との遺伝子発現の違い (18000 の遺伝子) をマイクロアレイ法を用いて解析し、そのうち C4-2 において明らかに発現の強かった遺伝子 - methylacyl-CoA racemase (AMACR) と ETS 転写因子の一つである ELF5 についてそれらの機能を検討した。AMACR を抑制することにより、アンドロゲンレセプター (AR) の発現の上昇と GH/IGF-1 系の抑制を誘発し、ホルモン不応性前立腺癌からホルモン依存性前立腺癌へと特徴的に変換することを示し、AMACR の発現を抑制することが、ホルモン不応性前立腺癌患者の治療において、新たな戦略の一つになりえる可能性があることを示した (2009 Takahara K. et al. Anticancer Res.)。今後、AMACR を抑制し、AR 発現レベルが上昇することでホルモン感受性再獲得の可能性が示唆されているが、この間に GH/IGF-1 系が抑制されていることに注目したい。また申請者らは、GH/IGF-1 系と前立腺癌との関連性について報告し、GH/IGF-1 系の leading factor が PI3K/AKT pathway であることを示している (2010 Takahara K. et al. Prostate, 2013 Takahara K. et al. Prostate Cancer Prostatic Dis.)。この PI3K/AKT pathway の活性化は包括的 OMICS データより、CRPC 発症の重要 factor であり、CRPC におけるホルモン感受性再獲得の機序として AMACR 抑制 GH/IGF-1 系の活性低下 AR 発現増加の相互関連を検討することは重要であると考え。また ELF5 に関して、ELF5 を抑制することにより、AR corepressor である period circadian protein homolog 1 の発現低下を認め、AMACR 抑制時と同様に、ホルモン不応性状態からホルモン依存性状態への可逆性を認めた (2015 Takahara K. et al. Prostate Int.)。ETS 遺伝子も包括的 OMICS データから CRPC に関連する key factor であり、その一つである ELF5 の役割を引き続き解析することは意義深い。一方近年、抗アンドロゲン剤抵抗性のメカニズムとして、AR-V7 の発現レベル、またその function が影響を及ぼすという研究結果が報告されている。また他のターゲットとして、申請者らは ASCT2 (Alanine-serine-cysteine transporter 2) に着目した。ASCT2 は、アラニン、セリン、システイン、グルタミン等の中性アミノ酸の細胞内取り込みに関与する Na⁺ 依存性トランスポーターであり、癌細胞においては、グルタミンを取り込む重要な役割を担っている。また、癌細胞ではその発現が上昇していることが報告されており、前立腺癌においてもその関連性については検討されているが、明確なメカニズムについては解明されていない。本研究に先駆け、cBioPortal を用いて、前立腺癌患者 108 例で、腫瘍組織内の ASCT2 発現レベルと前立腺癌の生化学的再発までの期間を検討したところ、グリソンスコア 7 以上の ASCT2 高発現群で、再発までの期間が有意に短いことが示され、ASCT2 発現と前立腺癌の病勢進行との何らかの関連性が示唆された。

以上より、本研究において、2015 年包括的 OMICS データあるいは申請者らのこれまでの報告に基づき、AMACR、ELF5、AR-V7、ASCT2 に焦点を絞り、その関連性を解明することは、CRPC のホルモン抵抗性獲得メカニズムの解明に非常に独創的かつ有意義であると考え。

2. 研究の目的

近年、アンドロゲン遮断療法 (ADT) 抵抗性のメカニズムの一つとして、完全長アンドロゲン受容体のバリエーションの一種で、リガンドを介さずに AR を活性化させる AR-V7 が着目されている。また、CRPC において AMACR は高発現を認めていることが多く、CRPC における AMACR と AR-V7 の関連性を、前立腺癌細胞株を用いて、AMACR 抑制試験、ならびに Docetaxel 併用下での増殖抑制に対する効果を検討した。また、去勢感受性前立腺癌 (CSPC : castration-sensitive prostate cancer) および、CRPC と、ASCT2 の関連性を検討するため、前立腺癌細胞株を用い、その細胞増殖と、ASCT2、AR 等の発現レベルを比較、検討した。

3. 研究の方法

AR と AR-V7 の両方を発現している前立腺癌細胞である 22RV1 を用い、AMACR、AR、AR-V7、AR の核内移行に関与する heat shock protein-27 (HSP-27) の各種タンパク発現レベルを Western blotting 法 (WB) を用いて検討した。次に、22RV1 の AMACR を 10nM の siRNA を用いて抑制し、通常血清 (FBS) とアンドロゲン枯渇血清 (CSS) で培養を行い、細胞増殖能、遊走能、各種タンパク発現レベルを検討した。最後に、AMACR 抑制後に Docetaxel (10nM) を併用し、同様の検討を行った。

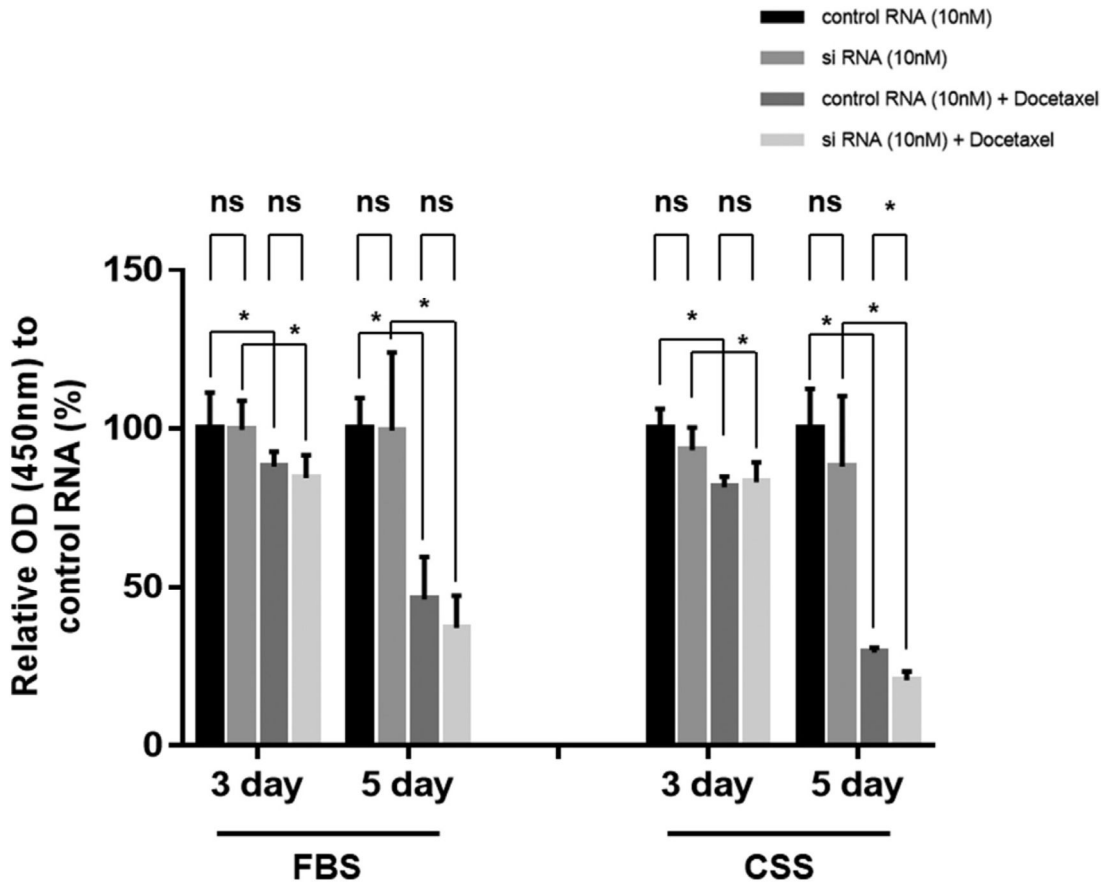
次の実験系として、ヒト前立腺癌細胞株である LNCaP (CSPC 細胞株) と 22Rv1 を用い、in vitro で ASCT2 を標的とした siRNA による発現抑制療法と、AR の antagonist である Enzalutamide (Enz) を使用した実験を行い、単独、または併用での細胞増殖形態や Western Blotting を用いたタンパク発現レベルの解析を行った。細胞培養は、FBS もしくは CSS を含

む RPMI 培地を使用した。

4. 研究成果

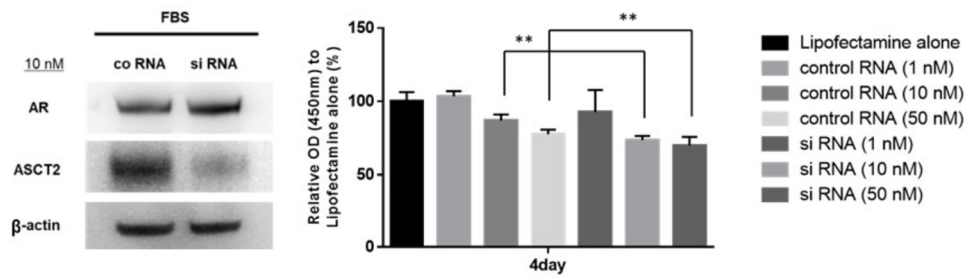
AMACR 抑制後の 22RV1 の細胞増殖能は control RNA と比較し、FBS、CSS 使用時で共に有意差を認めなかった。遊走能は AMACR 抑制後、CSS 下でのみ control RNA と比較し、約 60% の抑制を認めた。また AMACR 抑制後、CSS 下において、HSP-27 の発現は control RNA と比較し、約 35% の低下を認めた。AMACR 抑制後に Docetaxel を併用すると、22RV1 の細胞増殖能は CSS 下で control RNA と比較し、約 33% の低下を認めた。また同条件において、HSP-27、AR-V7、AR の発現レベルは control RNA 使用時と比較し、それぞれ約 79%、75%、62% の低下を認めた。

LNCaP において、FBS 培地下で siRNA を用いた ASCT2 抑制療法では、コントロール群と比較し、細胞増殖能の著明な低下を認めたが、WB において AR 発現の低下は認めなかった。LNCaP に AR antagonist である Enz を付加した実験系では、AR 発現の低下に伴い、LNCaP 細胞増殖能の著明な低下が認められたが、ASCT2 発現に影響を及ぼさなかった。これらの結果を踏まえ、LNCaP において ASCT2 抑制と Enz 付加による併用療法を施行したところ、細胞増殖能は、単独療法と比較し有意に低下し、それに伴い、AR の更なる発現低下を認めた。ASCT2 抑制と Enz の相乗効果により、LNCaP の細胞増殖能が、さらに抑制される可能性があることが示唆された。次に、CRPC 細胞株である 22Rv1 を用い、同様の ASCT2 抑制療法を行い、その細胞増殖形態と AR、ARV7 発現について WB を用い検討した。22Rv1 の細胞増殖能は、FBS、CSS 培地下ともに、コントロール群と比較し ASCT2 抑制下で有意な低下を認めた。また、いずれの培地下においても、ASCT2 抑制下で、ARV7 の発現低下を認めた。しかしながら、AR 発現レベルに影響を及ぼさなかった。これらの結果から、前立腺癌細胞において、ASCT2 抑制が CSPC だけでなく、ARV7 陽性 CRPC においても細胞増殖を抑制できる可能性が示唆された。

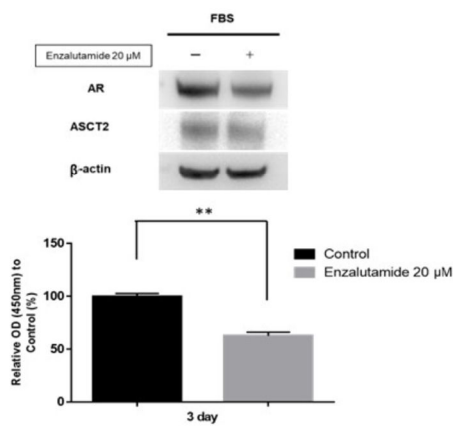


Effect of the combination therapy of AMACR transfection and docetaxel treatment in 22Rv1 cells. The proliferation of 22Rv1 cells with AMACR transfection alone or the combination therapy of AMACR transfection and docetaxel treatment were assessed on Days 3 and 5 using the cell counting kit-8. The percentage of cells with 22Rv1 in each group has been expressed as relative proliferation activity with the negative control siRNA alone. Histograms represent the mean \pm SD (ns: not significant; *P < 0.05). AMACR, amethylacyl-CoA racemase; CSS, charcoal-stripped serum; FBS, fetal bovine serum.

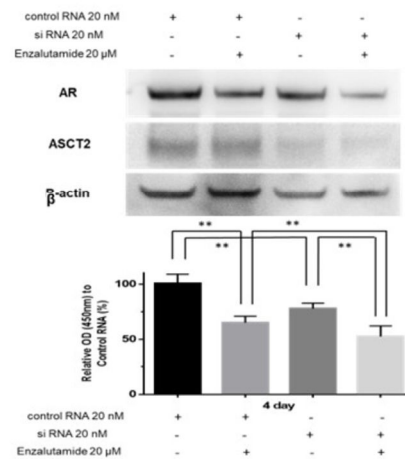
A



B

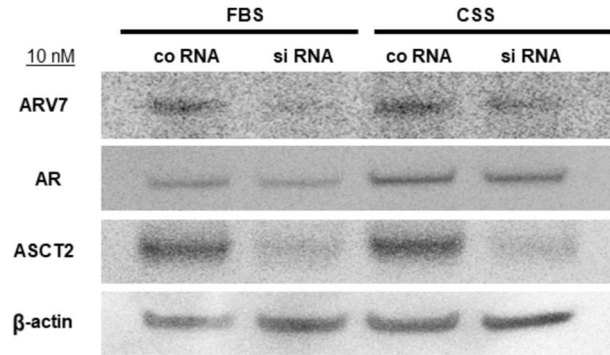


C

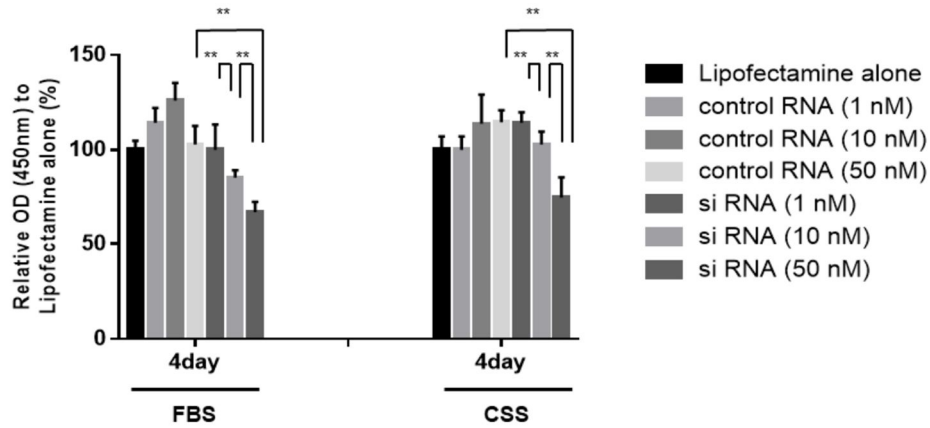


Effect of ASCT2 transfection and enzalutamide treatment in LNCaP cells. (A) Representative images of Western blot analyses of LNCaP cells after transfection of ASCT2 siRNA (10 nM) or negative control siRNA (10 nM). The proliferation of LNCaP cells transfected with ASCT2 siRNA (1, 10, 50 nM) or negative control siRNA (1, 10, 50 nM) or Lipofectamine alone was assessed on day 4 using the cell counting kit-8. The percentage of cells is expressed as proliferation activity relative to Lipofectamine alone. Histograms represent the mean \pm SD (** $p < 0.01$). (B) Representative images of Western blot analyses of LNCaP cells after enzalutamide treatment (20 μ M). AR, androgen receptor; FBS, fetal bovine serum. The proliferation of LNCaP cells after enzalutamide treatment (20 μ M) or control (no treatment) was assessed on day 3 using the cell counting kit-8. The percentage of cells is expressed as proliferation activity relative to control. Histograms represent the mean \pm SD (** $p < 0.01$). (C) Representative images of Western blot analyses of LNCaP cells after combination therapy with ASCT2 siRNA (20 nM) or negative control siRNA (20 nM) and enzalutamide treatment (20 μ M).

A



B



Effect of ASCT2 siRNA transfection in 22Rv1 cells. (A) representative images of Western blot analyses of 22Rv1 cells after transfection with ASCT2 siRNA (10 nM) or negative control siRNA (10 nM); (B) The proliferation of 22Rv1 cells transfected with ASCT2 siRNA (1, 10, 50 nM) or negative control siRNA (1, 10, 50 nM) or Lipofectamine alone was assessed on day 4 using the cell counting kit-8. The percentage of cells is expressed as proliferation activity relative to Lipofectamine alone. Histograms represent the mean \pm SD (** $p < 0.01$).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Saruta Masanobu, Takahara Kiyoshi, Yoshizawa Atsuhiko, Niimi Atsuko, Takeuchi Toshiyuki, Nukaya Takuhisa, Takenaka Masashi, Zennami Kenji, Ichino Manabu, Sasaki Hitomi, Kusaka Mamoru, Suzuki Motoshi, Sumitomo Makoto, Shiroki Ryoichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Alanine-Serine-Cysteine Transporter 2 Inhibition Suppresses Prostate Cancer Cell Growth In Vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 5466 ~ 5466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11185466	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 -

1. 著者名 Yoshizawa Atsuhiko, Takahara Kiyoshi, Saruta Masanobu, Zennami Kenji, Nukaya Takuhisa, Fukaya Kosuke, Ichino Manabu, Fukami Naohiko, Niimi Atsuko, Sasaki Hitomi, Kusaka Mamoru, Suzuki Motoshi, Sumitomo Makoto, Shiroki Ryoichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Combined -methylacyl-CoA racemase inhibition and docetaxel treatment reduce cell proliferation and decrease expression of heat shock protein 27 in androgen receptor-variant-7?positive prostate cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Prostate International	6. 最初と最後の頁 18 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pnrl.2020.07.001	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0件

〔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
---------	---------