

平成 23 年 5 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791495

研究課題名（和文）前立腺癌の薬剤耐性（タキサン系）の機序についての研究

研究課題名（英文）Research of the mechanisms of taxan drug resistance in prostate cancer

研究代表者

三輪 聡太郎（MIWA SOTARO）

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：80507070

研究成果の概要（和文）：ホルモン非依存性前立腺癌の親株 PC-3 とパクリタキセル耐性株 PC-3-TxR の遺伝子発現の違いを cDNA microarray analysis で調べた結果、CTEN という遺伝子の発現が耐性株で減弱し、耐性化の原因のひとつではないかと推測された。この CTEN 遺伝子発現減弱によるパクリタキセル耐性化の機序には actin の発現の増強、および EGFR の発現の増強が観察された。それらの遺伝子の発現の変化が耐性化に影響を与えているかを調べるため、siRNA を用いて actin や EGFR をノックダウン、また EGFR 特異的チロシンリン酸化阻害剤を耐性株に対して使用した結果、パクリタキセルに対する感受性が回復することが確認された。

研究成果の概要（英文）： To determine the mechanisms of paclitaxel resistance in PC-3-TxR cells, we compared the gene expression profiles between PC-3 and PC-3-TxR cells. Our results indicated that expression of the C-terminal tensin like protein (CTEN, tensin 4) gene was down-regulated by 10-fold in PC-3-TxR cells. CTEN expression was inversely correlated with F-actin and EGFR expression. Then knockdown of actin and EGFR in PC-3-TxR cells recovered paclitaxel sensitivity, indicating that CTEN down-regulation mediates paclitaxel resistance through elevation of EGFR and actin expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

進行前立腺癌の治療はホルモン療法が主流であり 90%以上が反応し効果をあげるがその多くの症例はアンドロゲン非依存癌へと

進行し女性ホルモン剤、ステロイドなどをしていた第二次ホルモン療法へと移行する。さらに再燃したホルモン抵抗性前立腺癌に対してはタキサン系薬剤が有効であり本邦においてもドセタキセルが 2008 年より保険適応

となっている。タキサン系薬剤は微小管の重合をより安定化させることによって細胞分裂を停止させ、抗腫瘍効果を発揮すると言われている。しかし、その治療効果満足のものではなく、多くは数ヶ月間の奏功期間後やがて抵抗性となり、さらに前立腺癌は進行する。また、この抗癌剤に初めから反応しない前立腺癌も存在する。タキサン系抗癌剤に抵抗性となると、いよいよ有効な治療法はなく、予後はきわめて不良で患者は最終的に死に至る。つまり現在、このタキサン抵抗性をいかに克服し、患者の QOL を改善し延命を図るかが、タキサン系薬剤を使用するにあつての課題である。それに対応するためには、前立腺癌のタキサン系薬剤に対する耐性の機序を明らかにし、それを克服するための対策をとる必要がある。

2. 研究の目的

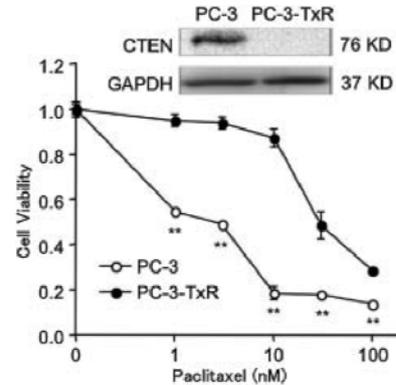
今後再燃前立腺癌の治療としてタキサン系抗癌剤を使用したものが主流になると予想され本邦においてもドセタキセルが2008年より保険適応となった。しかし奏功率は比較的良いものの、やがてタキサン系抗癌剤に抵抗性となり再発する。我々は、同じタキサン系のパクリタキセル抵抗性の機序を明らかにするために、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株PC-3細胞を用いて、パクリタキセルを少量から加えて徐々に増量し、約1年かけてパクリタキセル抵抗性前立腺癌細胞株を樹立することに本邦で初めて成功した（なおこの細胞株はドセタキセルでも交差耐性を示した）。本研究では、この細胞株を用いて前立腺癌のパクリタキセル抵抗性の機序を明らかにし、抵抗性克服のための基礎的研究を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

PC-3 と PC-3-TxR (パクリタキセル抵抗性前立腺癌細胞株) の遺伝子の発現の違いを調べるため cDNA microarray を行ったところ、多くの遺伝子の発現の違いが確認できた。PC-3-TxR で2倍以上発現が亢進していた遺伝子は202個、発現が減弱していた遺伝子は219個確認できた。これらの遺伝子のうち、耐性株で発現の亢進していた tensin、immunoglobulin superfamily, member 4 (IGSF4)、耐性株で発現の減弱していた interleukin 23, alpha, calbindin、CTEN の発現を RT-PCR で再確認した。これらの遺伝子のうち tensin の発現は耐性株でも極めて

低く、今後の研究に除外した。

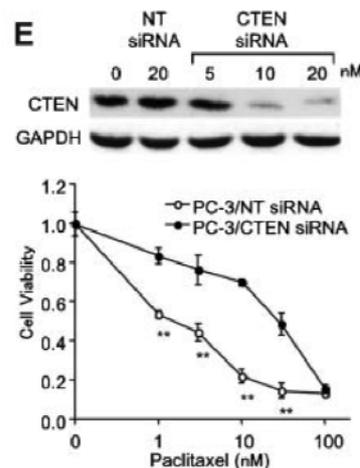
文献検索を行い CTEN が apoptosis に関与しているとの論文があったため、CTEN の発現を減弱、亢進させるための siRNA や強制発現ベクターを購入し、PC-3 あるいは PC-3-TxR に導入した細胞株を樹立した。



(図1)

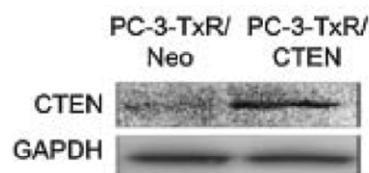
4. 研究成果

PC-3 に CTEN siRNA を導入すると CTEN の発現が減弱するのを観察した。この細胞ではパクリタキセルに対する感受性が減弱していた。



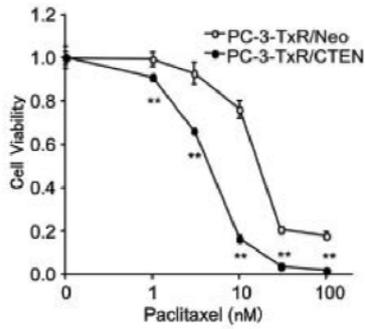
(図2)

また、PC-3-TxR には発現ベクターを安定導入し、overexpression を western blotting で確認した。



(図3)

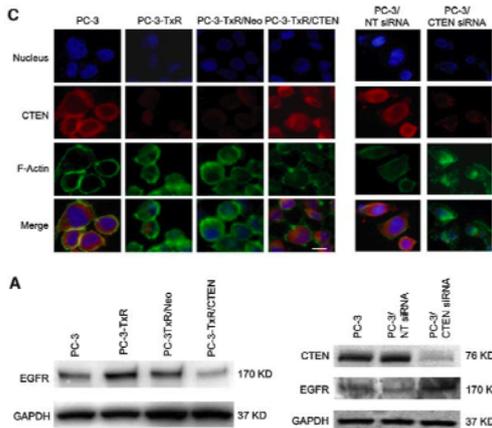
この細胞ではパクリタキセルに対する感受性が回復していた。



(図 4)

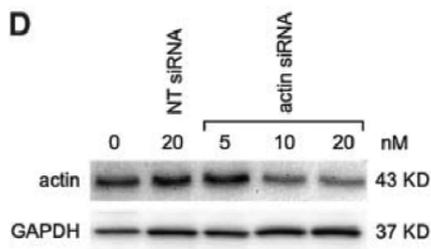
以上より CTEN という遺伝子の発現が耐性株で減弱し、その減弱が耐性化の原因のひとつの機序であることを、強制発現や siRNA によるノックダウン実験により明らかにした。

この CTEN 遺伝子発現減弱によるパクリタキセル耐性化の機序には actin の発現の増強、および EGFR の発現の増強が観察された。

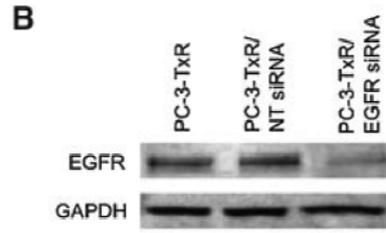


(図 5)

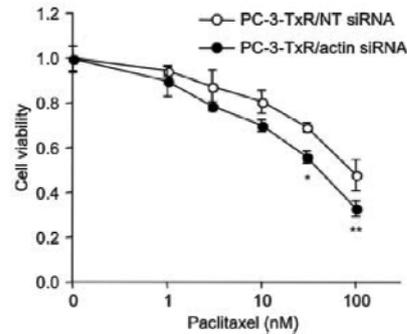
それらの遺伝子の発現の変化が耐性化に影響を与えているかを調べるため、actin や EGFR に対する siRNA を用いてノックダウン株を樹立し確認したところ感受性は回復していた。



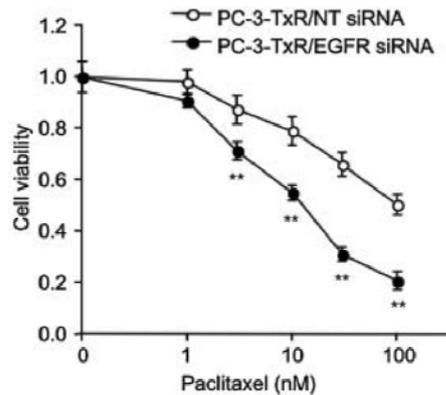
(図 6)



(図 7)

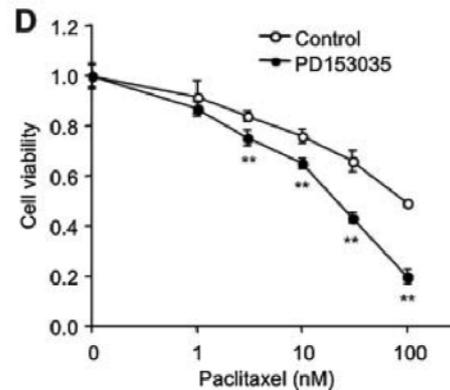


(図 8)



(図 9)

また EGFR 特異的チロシンリン酸化阻害剤を耐性株に対して使用すると、パクリタキセルに対する感受性が回復することを確認した。



(図 10)

以上より、パクリタキセル耐性化克服には EGFR 阻害剤も有効である可能性が示唆された。また、耐性株に対する他の薬剤の抗腫瘍効果を確認するために包虫症 (エキノコッカ

ス) 治療薬であるアルベンダゾールを用いて抗腫瘍効果の有無を確認した。臨床的に用いられる用量で達成することのできる血清濃度の範囲内で実験を行ったところ、 $0.2 \mu\text{M}$ でも親株と同様に50%以上の増殖抑制を示し、耐性株でも同等の抗腫瘍効果を観察した。この結果は別のアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株であるDU145、及びその耐性株でも同様であった。アルベンダゾールは前立腺癌のタキサン耐性に有効である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 聡太郎 (MIWA SOTARO)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：80507070