

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 25 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591779

研究課題名（和文） NF κ B-IL6 系を標的とした難治性前立腺癌の進展と癌随伴症
に対する新規治療戦略研究課題名（英文） Therapeutic strategy targeting NF κ B-IL6 pathway against
progression and paraneoplastic syndrome in prostate cancer

研究代表者

中島 淳 (NAKASHIMA JUN)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10167546

研究成果の概要（和文）：

前立腺癌における NF κ B-IL6 系の病態生理学的意義の解明や dihydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) などの NF- κ B 阻害剤の抗癌剤としての有用性などを検討した。DHMEQ は前立腺癌細胞において濃度依存性かつ時間依存性に有意な抗腫瘍効果を示し、G2/M arrest を増加させ、docetaxel の抗腫瘍効果を有意に増強した。また、DHMEQ は放射線による抗腫瘍効果を増強し、この作用は放射線により誘導される NF- κ B 活性の抑制ならびに G2/M arrest の増強を介することなどが示唆された。これらの結果から NF- κ B の阻害が前立腺癌に対する有用な治療戦略となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This study was undertaken to elucidate the pathophysiological role of NF κ B-IL6 pathway and antitumor effects of NF κ B inhibitors including dihydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) in prostate cancer. DHMEQ showed significant cytotoxic effects on prostate cancer cells in dose dependent and time dependent manners, produced a significant increase in G2/M arrest in the cell cycle and enhanced the cytotoxic effects of docetaxel on prostate cancer cells. DHMEQ significantly enhanced cytotoxic effects of radiation on prostate cancer, presumably through inhibiting the increased NF κ B activity induced by radiation and enhancing the proportion of G2/M arrest in the cells in combination with radiation. Inhibition of NF κ B activity may become a new therapeutic modality for treating prostate cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、前立腺癌、NF κ B、内分泌治療、放射線治療

1. 研究開始当初の背景
前立腺癌は本邦においても増加の一途をた

どっており、進行性前立腺癌においては当初
は内分泌治療が奏効するもののひとたび再

燃するとその予後は不良である。進行性前立腺癌においては、予後の改善、QOLの維持、治療の侵襲性が重要な診療指針であると考えられ、現在の癌医療においては、癌拠点病院の設置と癌治療認定医による専門的かつ集学的治療が不可欠である。同時に再燃癌における緩和医療においては緩和ケアチームの結成や訪問看護の充実が目指されており、悪液質やDICなどを克服し在宅医療を可能にする方策も当面の課題である。すなわち、癌の克服と副作用の軽減ならびに患者のQOLの維持が重要な臨床的課題である。具体的には、これまでの社会生活を維持し、より少ない投与量で副作用を最小限に抑制し、有効な効果を引き出し、QOLを維持し、外来ベースで継続的に長期間にわたって施行できる癌に負けない新規治療の開発が急務である。

2. 研究の目的

再燃前立腺癌の治療において docetaxel が standard care として認められたことは画期的であるが、約 2.5 ヶ月の予後の延長は満足できるものではない。再燃癌治療の新時代の黎明期において、更なる予後の改善と QOL を維持できる治療を同時に開発することが求められている。研究者らはこれまでホルモン抵抗性前立腺癌において NF κ B 活性や NF κ B 依存性サイトカインである IL6 や TNF の発現が増加しており、予後や悪液質、凝固異常の病態生理などにおいて重要な役割を果たしていることを報告してきた。本研究においては NF κ B-IL-6 pathway を標的とした抗癌治療戦略の確立を目指し、さらには NF κ B-IL-6 阻害剤を併用することにより、現在臨床において再燃癌に対して中心的役割を果たしている docetaxel などの抗癌化学療法剤の増強効果を検討する。また、前立腺癌においては放射線治療が汎用されるが、NF κ B-IL-6 阻害剤の併用によるさらに強力な放射線治療の確立を目指す。これらの研究を通して、この NF κ B-IL6 pathway を分子標的とした新規の治療戦略を開発し、さらには抗癌化学療法剤や放射線治療との併用により、単独治療に比べて投与量の軽減を可能にし、かつより強力な抗癌治療効果を引き出すことにより、再燃癌の増殖・進展を抑制し、QOL の維持を目指した新規治療戦略を確立する。

3. 研究の方法

本研究においては、ホルモン抵抗性前立腺癌の増殖・進展を抑制し QOL の維持を目指して、in vitro ならびに in vivo の実験系において NF κ B-IL-6 pathway を阻害することによる治療効果を検討する。さらには、NF κ B-IL-6 阻害剤を併用することにより、現在注目されている taxane 系薬剤などの効果を増強し、投与量の軽減と治療の低侵襲化を目指した

NF κ B-IL-6 阻害剤併用抗癌化学療法の有用性を検証する。また、前立腺癌においては放射線治療が汎用されるが、in vitro ならびに in vivo において放射線治療の効果を検討し、さらには NF κ B-IL-6 阻害剤を併用することにより放射線治療の抗腫瘍効果の増強を検証する。これらの実験では研究者らがホルモン抵抗性前立腺癌において強力に NF κ B 活性を阻害することを見出した NF κ B 阻害剤である dihydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) を中心とした NF κ B 阻害剤に加えて、放射線治療や既存の抗癌化学療法剤を用いて、新規治療の有用性を基礎実験において検討する。

4. 研究成果

再燃前立腺癌の治療に docetaxel が導入されたことは臨床的には画期的であるが、その効果には限界がある。一方 NF κ B はホルモン非依存性前立腺癌の増殖・進展や docetaxel の薬剤抵抗性に関与していることが示唆されている。本研究では、まず in vitro の実験系においてホルモン非依存性前立腺癌 (PC3, DU145, JCA-1) に対する docetaxel の抗腫瘍効果を検討した。0.8, 4, 20, 100, 500 nM の docetaxel を 24 時間作用させたときの細胞生存率 (%) はコントロールを 100 (%) としたとき、DU145 細胞では、102 \pm 2.7, 95 \pm 1.3, 59 \pm 1.3, 37 \pm 1.3, 27 \pm 0.7, JCA-1 細胞では 93 \pm 2.1, 90 \pm 1.3, 85 \pm 1.1, 75 \pm 0.5, 60 \pm 1.0, PC3 細胞では 93 \pm 2.3, 88 \pm 2.1, 78 \pm 2.8, 59 \pm 2.0, 52 \pm 2.2 であり、濃度依存性の抗腫瘍効果が示された。また時間依存性も認められた。一方、2.5, 5, 10, 20, 40 μ g/ml 濃度の NF κ B 阻害剤である DHMEQ を作用させたときの抗腫瘍効果 (%) は DU145 細胞では 5%, 8%, 21%, 45%, 98%, JCA-1 細胞では 5%, 9%, 18%, 70%, 96%, PC3 細胞では 0%, 3%, 34%, 92%, 98% であり、濃度依存性に抗腫瘍効果が示された。また、時間依存性の抗腫瘍効果の増強も示された。さらには、DU145 細胞において 5 μ g/ml の DHMEQ 単独治療は 10% の抗腫瘍効果を示し、docetaxel 4nM 単独の 24 時間後の抗腫瘍効果は 5%、72 時間後では 51% であったが、5 μ g/ml の DHMEQ を併用することにより 24 時間後 34%、72 時間後は 84% に増強された。これらの結果から、再燃前立腺癌において NF κ B 阻害剤である DHMEQ は抗腫瘍効果を示し、さらには標準治療である docetaxel の効果を DHMEQ は増強しうることが示唆された。前立腺癌はホルモン治療に良好に反応するが、臨床的にはホルモン治療に抵抗性を獲得した前立腺癌の治療には難渋する。In vitro の実験系において、新規に開発した NF κ B 阻害剤である DHMEQ は 2.5~40 μ g/ml 濃度範囲でホルモン非依存性前立腺癌細胞株である PC-3 細胞に対して殺細胞効果を示したが、これらの濃度で DHMEQ の cell

cycle に及ぼす作用を調べるために細胞を BrdU にてラベルし、flow cytometric analysis を行った。PC-3 細胞においてコントロールにおける G2/M arrest が 32%であったのに対して、2.5 $\mu\text{g/ml}$ の DHMEQ を作用させたときには、G2/M arrest が 39%にみられ、DHMEQ が cell cycle に影響を及ぼす可能性が示唆された。ついで我々は新たに合成した薬剤について、殺細胞効果の有無を検討し、その結果により NF- κ B の阻害実験の必要性を検討した。まず、in vitro の実験系において殺細胞効果を検討した。5x10³(3)個の PC-3 細胞を 96 well マイクロプレートに播種し 24 時間の preincubation の後 5, 10, 20, 40 microM 濃度の新規薬剤を作用させ、spectrophotometric assay にて殺細胞効果を検討した。24 時間後の殺細胞効果は 12%, 1%, 25%, 20%であり、48 時間後では 8%, 4%, 20%, 25%, 72 時間後の殺細胞効果はコントロールに比べて 9%, 0%, 26%, 30%であった。ついで JCA-1 細胞に対する新規 NF- κ B 阻害剤について同様に殺細胞効果を測定した。5, 10, 20, 40 microM 濃度の薬剤を作用させたときの 24 時間後の殺細胞効果は -20%, -10%, 10%, 28%であり、48 時間後では 11%, 1%, 21%, 25%, 72 時間後の殺細胞効果はコントロールに比べて 13%, -9%, 28%, 28%であった。今後は更に強力な薬剤を開発し、その殺細胞効果や NF- κ B 活性への影響を含めた作用機序の解明などが必要と考えられた。前立腺癌に対して放射線治療が汎用されるが、その照射線量には限界がある。治療効果を最大限に引き出し、有害事象を軽減するために、放射線治療に NF- κ B 阻害剤を併用することによりさらに強力な放射線治療の効果誘導の可能性を検討した。本実験においては、NF- κ B 阻害剤である DHMEQ は前立腺癌細胞である LNCaP 細胞に対して 20 $\mu\text{g/ml}$ 以上で、PC-3 細胞に対しては 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で有意な抗腫瘍効果を示した。Colony formation assay にて、放射線治療 4Gy に加えて、LNCaP 細胞では 2.5 $\mu\text{g/ml}$ の DHMEQ を、PC-3 細胞では 5 $\mu\text{g/ml}$ の DHMEQ を併用したときは放射線単独より有意に抗腫瘍効果が增强された。Electrophoresis mobility shift assay では、両前立腺癌細胞においては放射線治療 4 時間後に NF- κ B 活性が上昇し、5 $\mu\text{g/ml}$ の DHMEQ により NF- κ B 活性の上昇が抑制された。Cell cycle に及ぼす影響を検討してみると、両細胞において 4Gy の放射線治療により誘導される G2/M arrest の割合は、無処置群や DHMEQ 単独群のそれらに比べて高く、さらには放射線治療に DHMEQ を併用することにより G2/M arrest の割合は放射線治療単独に比べてさらに高まった。LNCaP 細胞では p53、p21 の発現が 4Gy の放射線治療で增强され、DHMEQ を併用することでさらにその発現が增强した。

次いで、PC-3 細胞をヌードマウスの背部に移植し、放射線 8Gy を 2 回に分けて照射し、DHMEQ 4 mg/kg を腹腔内投与した。放射線治療と DHMEQ 併用群では、無治療群、DHMEQ 単独群、放射線単独群に比べて有意に腫瘍の大きさが小さかった。今回の実験結果から、前立腺癌細胞において放射線治療により NF- κ B 活性が增强され、DHMEQ によりその增强された NF- κ B 活性が抑制され、抗腫瘍効果が增强されると考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 13 件)

(1) Matsushima M, Kikuchi E, Maeda T, Nakashima J, Sugawara A, Ando T, Mizuno R, Nagata H, Miyajima A, Shigematsu N, Oya M. A Prospective Longitudinal Survey of Erectile Dysfunction in Patients with Localized Prostate Cancer Treated with Permanent Prostate Brachytherapy. 査読有、J Urol. 2013, 189(3): 1014-1018

(2) Kozakai N, Kikuchi E, Hasegawa M, Suzuki E, Ide H, Miyajima A, Horiguchi Y, Nakashima J, Umezawa K, Shigematsu N, Oya M. Enhancement of radiosensitivity by a unique novel NF- κ B inhibitor, DHMEQ, in prostate cancer. Br J Cancer. 査読有、2012 Aug 7;107(4):652-7. doi : 10.1038/bjc.2012

(3) 下平憲治、中島淳、大堀理、小津兆一郎、大野芳正、堀口裕、並木一典、吉岡邦彦、秦野直、橋政昭。ホルモン治療が施行された進行性前立腺癌の予後因子の検討。泌尿器外科 24 (8)、1381-1383、2011

(4) Sugawara A, Nakashima J, Kunieda E, Nagata H, Mizuno R, Seki S, Shiraishi Y, Kouta R, Oya M, Shigematsu N. Incidence of seed migration to the chest, abdomen, and pelvis after transperineal interstitial prostate brachytherapy with loose 125I seeds. Radiat Oncol. 査読有、2011 Oct 5;6(1):130

(5) 中島淳、堀口裕、大野芳正、権藤立男、竹内尚史、橋政昭。進行前立腺癌に対する新戦略。NF- κ B 阻害剤。日本臨床 69 巻 160-164, 2011

[学会発表] (計 13 件)

① Jun Nakashima, Issei Takizawa, Kazuyoshi Ko, Yoshihiro Nakagami, Makoto Ohori, Yoshio Ohno, Kunihiro Yoshioka, Masaaki Tachibana. Prediction of leukopenia after docetaxel chemotherapy in patients with castration-resistant prostate cancer. American Urological

Associaiton 2012 annual meeting, May 19-May 23, 2012, Atlanta (米国)

②黄和吉, 中島淳, 中神義弘, 大堀理, 小津兆一郎, 大野芳正, 堀口裕, 並木一典, 吉岡邦彦, 秦野直, 橘政昭。去勢抵抗前立腺癌におけるドセタキセル治療後のPSA値の検討。日本泌尿器科学会総会 2012. 4. 21-24, 横浜

③中島淳。去勢抵抗性前立腺癌に対する治療戦略。泌尿器癌カンファレンス 2011. 11. 10、東京

④中島淳。特別講演「去勢抵抗性前立腺癌に対する治療戦略」 前立腺癌座談会 2011. 10. 24、東京

⑤下平憲治, 中島淳, 大堀理, 小津兆一郎, 大野芳正, 堀口裕, 並木一典, 吉岡邦彦, 秦野直, 橘政昭。内分泌治療が施行された進行性前立腺癌の予後因子の検討。日本泌尿器科学会総会、2011. 4. 21、名古屋

⑥濱田理宇, 中島淳, 大堀理, 小津兆一郎, 大野芳正, 並木一典, 堀口裕, 吉岡邦彦, 秦野直, 井上理恵, 船橋健二郎, 池田龍介, 橘政昭。High risk 限局性前立腺癌における根治術後のPSA再発を予測する術前因子の検討。日本泌尿器科学会総会、2011. 4. 21、名古屋

⑦中島淳, 菅原章友, 水野隆一, 長田浩彦, 鹿島剛, 大久保秀紀, 下平憲治, 橋本剛, 伊関亮, 大堀理, 茂松直之, 大家基嗣, 橘政昭。早期前立腺癌に対する密封小線源永久挿入治療後のD90の検討。日本泌尿器科学会総会、2011. 4. 21、名古屋

⑧中神義弘、大堀理、橋本剛、井関亮、中島淳、秦野直、橘政昭。骨痛のある再燃前立腺癌におけるドセタキセル療法の意味。第26回前立腺シンポジウム。2010. 12. 11-12、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 淳 (NAKASHIMA JUN)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：10167546

(2) 研究分担者

橘 政昭 (TACHIBANA MASA AKI)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：70129526

(3) 連携研究者

堀口 裕 (HORIGUCHI YUTAKA)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60229234

(4) 連携研究者

大野 芳正 (OHNO YOSHIO)
東京医科大学・医学部・准教授