

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590176

研究課題名(和文) がん幹細胞特異的発現トランスポーターを標的とした化学療法の基盤構築

研究課題名(英文) New rationale for chemotherapy targeting transporters expressed in cancer stem cells

## 研究代表者

中西 猛夫 (Nakanishi, Takeo)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：30541742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：栄養要求性の变化に応答する生理的輸送体とがん増殖・進展との関係が検討された。アンドロゲン不含培地で培養されたヒト前立腺癌由来LNCaP細胞において、dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) を認識する有機アニオン輸送体OATP1A2の発現が増加した。OATP1A2発現抑制により、細胞増殖、コロニー形成および浸潤能に対するDHEASの効果は有意に減少した。さらに、アンドロゲン不含培地においてOATP1A2に輸送される抗がん剤メソトレキセートに対する感受性が増加したため、OATP1A2は新しい去勢抵抗性前立腺癌治療の開発に有用であることが期待された。

研究成果の概要(英文)：The studied aimed to establish a role of nutrient transporter in adapted cell growth of cancer. OATP1A2 mRNA expression increased in human prostate cancer LNCaP cells under androgen-depleted condition. Knockdown of OATP1A2 mRNA in LNCaP cells resulted in loss of the DHEAS sensitivity of cell growth, colony formation and invasion capacity. Finally, the upregulation of OATP1A2 expression was also useful to deliver an OATP1A2 substrate cytostatic drug, methotrexate, to LNCaP cells, resulting in reducing their sensitivity to MTX. In summary, cell population with higher activity of OATP1A2 may be selected under androgen-depleted condition; therefore, combination therapy of complete androgen blockade with OATP1A2 substrate chemotherapeutic may be a new rationale to eradicate prostate cancer cells resistant to castration.

研究分野：薬学

キーワード：薬物動態・代謝学 輸送体 前立腺癌 ホルモン 去勢抵抗性 化学療法

## 1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は腫瘍形成、細胞増殖、浸潤・転移に重要な役割を果たすため、がん幹細胞を治療標的とした化学療法の開発は急務である。近年、慢性骨髄性白血病由来幹細胞様細胞に有機カチオンを輸送する分子(Organic Cation Transporter)の高い発現が基質薬物であるイマチニブに対する感受性を増大させることや、未分化性維持に重要な転写因子の異状発現により腫瘍組織のエネルギー代謝が活性化されアミノ酸輸送体を介したエネルギー源の供給が盛んになるなど、がん幹細胞の生命維持機構と輸送体のとの興味深い発見がなされていた。一方で、申請者が所属する研究室において、有機アニオンを認識する輸送体 organic anion transporting polypeptide (OATP)がヒト乳癌細胞に発現し、エストラジールの前駆物質であるエストロン硫酸を細胞に取り込み、細胞増殖を支えていることが報告されていた。

## 2. 研究の目的

がん幹細胞特異的に発現する輸送体の機能調節やそれを利用した薬物送達法の開発は、がん幹細胞標的化の有効な手段となり得る。したがって、がん幹細胞特異的に発現し栄養輸送などその生命維持および分化に関わる輸送体遺伝子の同定と腫瘍形成における役割の解明は、輸送体を標的分子とした新しい化学療法の基盤構築に有益な知見を与える。そこで、本研究では、ヒト前立腺癌由来細胞におけるホルモン輸送体として、有機アニオン輸送体(OATP)の発現とその基質である副腎皮質ホルモンであるデヒドロエピアンドロステロン硫酸(dehydroepiandrosterone sulfate、以下 DHEAS)の輸送を検討した。DHEASの血中濃度はアンドロゲンの約数百倍から千倍高い濃度で維持されており、前立腺癌患者に実施されるアンドロゲンシグナルを遮断する内分泌療法において、変動しない。そのため、前立腺癌細胞におけるDHEASを輸送するOATP分子の発現は、その増殖や進展に寄与することが考えられた。したがって、本研究において、以下の4つの項目について検討を行った。

- (1) アンドロゲン枯渇による前立腺癌細胞におけるDHEAS輸送体発現変動
- (2) 細胞増殖に対するOATP1A2の役割
- (3) OATP1A2基質抗がん剤(メソトレキセート)に対する前立腺癌細胞の感受性
- (4) OATP1A2の転写調節

## 3. 研究の方法

去勢抵抗性前立腺癌モデルとしてアンドロゲン受容体陽性LNCaPおよび22Rv1細胞を用いた。アンドロゲン枯渇条件下での細胞増

殖は、活性炭処理で処理されたウシ胎児血清を含む培地(フェノールレッド不含)培地で細胞を培養し、検討した。DHEASの細胞取込みについては、トリチウム標識されたDHEAS( $^3\text{H}$ DHEAS)を用いて評価した。2. 研究の目的に掲げた(1)-(4)の実験方法については以下の通りである。

(1) **DHEAS輸送体発現変動** アンドロゲン不含培地を用いて培養されたLNCaP細胞における遺伝子発現をcDNAアレイにより網羅的に解析し、通常培地での結果と比較した。さらに、アンドロゲン枯渇下で発現が増加する個別のDHEAS輸送体遺伝子発現はqRT-PCRにより確認した。OATP1A2についてはタンパク量をWestern Blotにより測定した。

(2) **OATP1A2の役割** 前立腺癌細胞の増殖・進展は、細胞増殖、軟寒天培地上でのコロニー形成能、in vitro浸潤試験により評価した。OATP1A2の役割については、OATP1A2の発現抑制株を作製して検討した。

(3) **メソトレキセートに対する感受性** アンドロゲン不含または通常培地で培養されたLNCaP細胞に対するメソトレキセートの細胞毒性を細胞増殖を50%抑制する濃度(IC<sub>50</sub>)値をそれぞれ測定して、評価した。

(4) **OATP1A2の転写調節** OATP1A2転写開始点の上流450bp(プロモーター領域)をルシフェラーゼをコードする遺伝子の上流に挿入したコンストラクトをLNCaP細胞へ導入し、プロモーターの転写活性を測定した。さらに、アンドロゲン受容体の関与を明らかにするために、AR陰性の前立腺癌細胞であるPC3と比較した。

## 4. 研究成果

得られた成果を以下の4つの項目に分けて記述する。

(1) **DHEAS輸送体発現変動** cDNA網羅的解析により、通常培地で培養されたLNCaP細胞と比較して、アンドロゲン不含培地において発現が2倍以上増加したDHEASを認識する輸送体遺伝子は、SLC10A1(4.9倍)、OATP5A1(4.4倍)、OATP1A2(3.9倍)、OATP1B1(2.5倍)であった。アンドロゲン受容体(AR)陽性LNCaPにおけるqRT-PCR解析の結果、培養後3日、6日後においてOATP1A2 mRNA発現上昇が最も顕著であることが示された。さらに、OATP1A2の発現はWestern Blotにおいて検討した。In vitro培養細胞のみならず、去勢したマウスに作製されたLNCaP細胞xenograftモデルにおいてもOATP1A2タンパク質発現増加が確認された。一方、アンドロゲン不含培地で培養されたLNCaP細胞における $^3\text{H}$ DHEASの取込みは有意に増加したことから、OATP1A2の発現増加が $^3\text{H}$ DHEAS取込みを促進することが

示唆された。ことから、以下に示す(2)-(4)の検討において、前立腺癌の増殖進展に関わる輸送体として OATP1A2 に着目した。

(2) **OATP1A2 の役割** アンドロゲン不含培地に DHEAS を添加した結果、LNCaP 細胞の増殖 (7-9 日間培養) は有意に増加した。DHEAS を DHEA に加水分解するステロイドサルファターゼ (STS) 阻害剤である STX64 (10  $\mu$ M) 存在下において、DHEAS の LNCaP 細胞増殖刺激効果は有意に減少した。したがって、DHEAS は前立腺癌細胞内で DHEA を経由してアンドロゲンとして利用されることが示された。OATP1A2 の発現を抑制した LNCaP 細胞では、DHEAS の細胞増殖刺激効果が消失したことから、アンドロゲン枯渇状態において、OATP1A2 が細胞増殖に重要な役割を果たすことが証明された。したがって、アンドロゲンレベル低下という環境の変化に応答して、OATP1A2 の発現が高く腫瘍形成能を有した細胞が選択され、アンドロゲンの前駆物質である DHEAS を摂取することにより、生存を維持することが示唆された。

(3) **メソトレキセートに対する感受性** メソトレキセートは OATP1A2 により細胞内へ蓄積することが知られている。したがって、アンドロゲンの枯渇による OATP1A2 の発現増加は細胞の増殖に寄与するが、同時にメソトレキセートの毒性効果を増加させるとの仮説を検証した (成果は後日公表する予定である)。

(4) **OATP1A2 の発現調節** 培地からアンドロゲンを除去したとき、ルシフェラーゼの活性は有意に増加した。活性型アンドロゲンである dihydrotestosterone (DHT) を添加すると上昇の程度は有意に減弱したことから、これまで LNCaP 細胞で観察されたアンドロゲン枯渇下で培養された LNCaP 細胞での mRNA 発現変動と対応した。さらに、AR のアンタゴニストであるピカルタミド (BIC) を DHT と同時添加し検討を行った。すると、DHT による mRNA 発現およびプロモーター転写活性の抑制効果は、消失した。一方、AR 陰性 PC-3 細胞ではアンドロゲンを枯渇させた場合においても mRNA 発現およびルシフェラーゼの活性に変化は見られなかった。またルシフェラーゼの活性は DHT や BIC 添加時において影響されなかった。以上より、OATP1A2 の発現はアンドロゲンによって負の発現制御を受け、その制御には AR が関与する可能性が推察された。

アンドロゲン枯渇下において、OATP の発現が上昇し、最も増大傾向が顕著であった OATP1A2 が血中に豊富に存在する DHEAS を効率的に取りこむことで細胞増殖を促進させ、アンドロゲン枯渇下での細胞増殖を維持していることが示唆された。OATP1A2 発現

抑制により、細胞増殖に対する DHEAS の効果が消失したことから、アンドロゲンレベル低下という環境の変化に応答して、OATP1A2 の発現が高く腫瘍形成能を有した細胞が選択され、アンドロゲンの前駆物質である DHEAS を摂取することにより、生存を維持することが示唆された。逆に、この特性を利用すれば、OATP1A2 基質薬物との併用により、腫瘍形成能を有する細胞画分を効率良く死滅させる化学療法の開発が期待される。

#### 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 4 件)

- (1) Nakanishi T, Tamai I. Putative roles of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in cell survival and progression of human cancers. *Biopharm Drug Dispos*, 35(7):391-404, 2014. (査読有)
- (2) Nakanishi T, Tamai I. A putative role of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in cells survival of hormone-dependent breast and prostate cancers. *J Cancer Res Thera Oncol*, 1:1-6, 2013. (査読有)
- (3) Arakawa H, Nakanishi T, Yanagihara C, Nishimoto T, Wakayama T, Mizokami A, Namiki M, Kawai K, Tamai I. Enhanced expression of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in androgen receptor-positive prostate cancer cells: possible role of OATP1A2 in adaptive cell growth under androgen-depleted conditions. *Biochem Pharmacol*, 84(8):1070-1077, 2012. (査読有)
- (4) Nakanishi T, Tamai I. Solute carrier transporters as targets for drug delivery and pharmacological intervention for chemotherapy. *J Pharm Sci*, 100(9):3731-3750, 2011. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 中西猛夫, 荒川大, 玉井郁巳 アンドロゲン受容体陽性前立腺がん細胞の増殖における OATP の役割 日本薬学会医療薬科学シンポジウム, 2013 年 11 月 23-24 日、東北大学 (仙台)
- (2) 柳原千泰, 中西猛夫, 西本朋弘, 早川人希, 玉井郁巳 Negative transcriptional regulation of organic anion transporting polypeptide (OATP1A2) in androgen receptor (AR)-positive prostate cancer cells. 2013 年 10 月 9-11 日、タワーホール船堀 (千葉)
- (3) 中西猛夫 新しい化学療法を目指したがん細胞における輸送体の機能特性と

- 発現調節に関する研究、日本薬物動態学会第 27 年会奨励賞受賞講演、2012 年 11 月 20-22 日、タワーホール船堀（千葉）
- (4) 西本朋弘、中西猛夫、柳原千泰、荒川大、玉井郁巳 前立腺癌細胞におけるトランスポーターを介したアンドロゲン供給調節機構の解明、日本薬剤学会第 27 年会、2012 年 5 月 24-26 日、神戸国際会議場（神戸）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

中西 猛夫（NAKANISHI, Takeo）

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：30541742

### (2)研究分担者

玉井 郁巳（TAMAI, Ikumi）

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：20155237

### (3)連携研究者

相澤 信（AIZAWA, Shin）

日本大学・医学部・教授

研究者番号：30202443