

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462432

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌のcholesterol代謝経路解明による個別化医療の確立

研究課題名(英文) Establishment of order-made therapy by mediating cholesterol metabolism pathways in castration-resistant prostate cancer cells

研究代表者

住友 誠 (Sumitomo, Makoto)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：5025535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)細胞を用いて、docetaxel (DOC)とLDH阻害薬の併用投与による細胞増殖抑制効果を検討した。LDH阻害薬であるsodium oxamate (SO)により、全ての細胞株で細胞増殖抑制が認められた。DOC (1 nM)とSO (50 mM)の併用では、単独投与より細胞増殖抑制が認められた。CRPC株のLN-CSSではDOCとSOの併用投与における相乗効果、細胞周期解析ではG2M arrestおよびアポトーシスの誘導が観察された。以上より、CRPC治療において、DOCとSOの併用投与は有用な治療法となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of LDH-A in mediating castration resistance of human prostate cancer (PC) cells by analyzing PC cell lines. LDH expression is strongly associated with docetaxel (DOC) sensitivity in PC cells. A specific LDH-A inhibitor sodium oxamate (SO) inhibited cell growth in PC cells, which was presumably caused by the inhibition of LDH-A protein expression. Synergistic cytotoxicity was observed after the combination therapy with DOC and SO in castration resistant LN-CSS cells, but not in parental LNCaP cells. The combination with DOC and SO caused cell cycle arrest in G2-M and SO promotes DOC-induced apoptosis in LN-CSS cells, which was partially caused by inhibition of DOC-induced increases in LDH-A expression. Our study may provide valuable information for the future development of targeted therapies for CRPC.

研究分野：尿路悪性腫瘍

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 嫌気性解糖系 乳酸脱水素酵素 アポトーシス タキサン

1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) などの進行前立腺癌では嫌気性解糖系において重要な乳酸脱水素酵素 (LDH) が活性化することが報告されている。血清LDHの上昇は、脂質合成ひいてはde novo androgen合成優位な環境下から嫌気性解糖にバランスシフトせざるを得ないCRPCが切迫した細胞内状態であることを反映している可能性があり、このような状況下でde novo androgen合成を含めた脂質合成・代謝経路が活性化することは不合理である。しかしながら、これらの事象を解明するための研究成果には確立されたものはない。CRPCに対する治療体系はdocetaxelに加え、cabazitaxel, abiraterone acetate (AA), enzalutamideなどの新規薬剤の登場により大きな転換期を迎えた。一方で、CRPCには去勢抵抗性かつAR非依存性 (HRPC) のタイプが含まれているはずであり、このようなタイプには本来docetaxelのようなタキサンが使用されることが合理的であるがその抗腫瘍効果には限界も指摘されている。最近、他癌種における研究ではあるが、血清LDH上昇初期にタキサン系抗癌薬を使用する方が予後良好であり、LDH活性を修飾することによりタキサンに対する感受性が増強されるとの報告もなされており、LDH自体がCRPCに対するdocetaxel治療感受性バイオマーカーとしてだけでなく、治療ターゲットとしても有望である可能性が強く示唆される。

2. 研究の目的

前立腺癌 (PC) における docetaxel (DOC) 治療抵抗性に LDH が関与するのかどうかを LDH 阻害作用を有する薬剤を使用して検討し、CRPC などのmPC における治療抵抗性の機序としての嫌気性解糖系の重要性を明らかにする。

3. 研究の方法

PC 株 (PC3, DU145, LNCaP) と、当施設で樹立したホルモン耐性前立腺癌株 (LN-CSS) を用い、LDH 阻害薬である sodium oxamate (SO)、DOC をそれぞれ単独投与、あるいは、併用投与による細胞増殖抑制効果を WST-1 assay で検討した。また、cell cycle への影響、アポトーシス誘導能については、DNA 染色法、あるいは、AnnexinV 染色法によりフローサイトメトリーで検討、さらに、細胞内 LDH 量の変化等については、ウエスタンブロット法で検討した。

4. 研究成果

SO (50 mM) により、全ての細胞株で細胞増殖抑制 (PC3 ~ 35%, DU145 ~ 50%, LNCaP ~ 20%, LN-CSS ~ 55%) が認められた。DOC (1 nM) と SO (50 mM) の併用では、単独投与より細胞増

殖抑制 (PC3 ~ 60%, DU145 ~ 60%, LNCaP ~ 45%, LN-CSS ~ 75%) が認められた。LN-CSS の細胞増殖抑制結果から combination index (CI) を算出した結果、CI < 1.0 であり、DOC と SO の併用投与における相乗効果が観察された。さらに、細胞周期解析では LN-CSS において、DOC と SO の併用投与により、G2M arrest が観察され、アポトーシスの誘導が観察された。また、LN-CSS マウス移植腫瘍では SO (15 mg/kg) 投与で抗腫瘍効果を認めた。

1) 前立腺癌細胞株における DOC 感受性と LDH タンパク発現との相関。

PC 株 (PC3, DU145, LNCaP) と、当施設で樹立したホルモン耐性前立腺癌株 (LN-CSS) を用い、DOC との感受性 WST-1 アッセイに検討した。DOC にて治療後 72 時間での検討ではすべての PC 細胞株において濃度依存的な細胞増殖抑制効果が認められたが、IC50 は DU145 と LNCaP で 2.5 nM だったのに対し、PC-3 で 7.5 nM, LN-CSS で 10 nM であり、LN-CSS と PC3 では比較的 DOC に対し抵抗性を示した (図 1 上)。Western blot 法による LDH タンパク発現の検討では、LN-CSS と PC3 における LDH タンパク発現は LNCaP and DU145 におけるそれよりも高いことが示された (図 1 下)。以上より、PC 細胞株における DOC 抵抗性と LDH タンパク発現レベルとの相関性が示唆された。

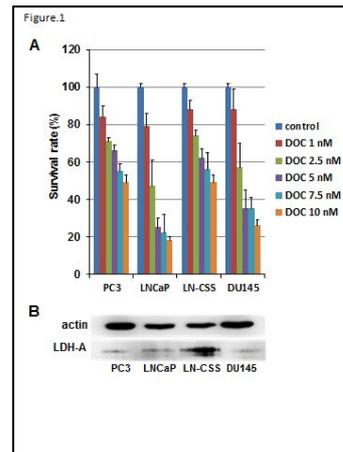


図 1

2) LDH 阻害薬 SO の PC 細胞に対する抗腫瘍活性および LDH タンパク発現変化および健常人リンパ球に対する毒性検討。

LDH 阻害薬として sodium oxamate (SO) を用い、同薬剤の PC 細胞株における感受性を WST-1 アッセイにて検討した。図 2A に示すように、SO は mM レベルの濃度で PC 株に濃度依存的な増殖抑制効果を示した。PC-3 における SO の LDH タンパク発現レベルの変化を Western blot 法にて検討したところ、SO により濃度依存的な LDH タンパク発現低下が認

められた。相対的濃度が高いことを懸念し、健常人リンパ球に対する SO の感受性を検討したところ、10-50 mM の濃度範囲では SO はリンパ球に対する毒性が低いことが示された (図 2C)。以上から、以後の実験系では SO の濃度を最大 50 mM に設定して施行することにした。

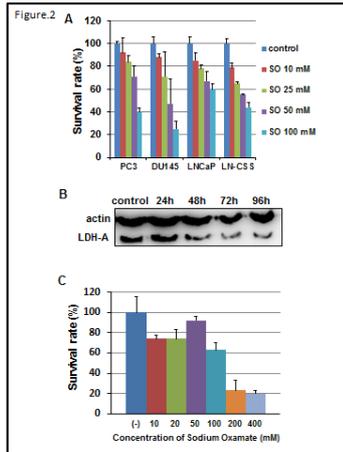


図 2

3) PC 細胞株に対する DOC と SO 併用効果の検討：細胞増殖と細胞周期への影響

次に、PC 細胞株における SO/DOC 併用による細胞増殖抑制効果を検討した。増殖抑制効果の評価には、Chou-Talalay combination index (CI) 法を用いた。すなわち $CI = 1$ では相加効果、 $CI < 1$ では相乗効果、 $CI > 1$ では拮抗効果として判定した。図 3 に示したように、DOC (1 nM) と SO (50 mM) による併用治療効果 (CI) は、LN-CSS で 0.5 と相乗効果が得られたのに対し、親株の LNCaP では 6.5 と拮抗作用を示すことが明らかになった。

次に同併用治療が細胞周期に影響するかどうかを細胞周期解析で検討した。図 4 に示すように、治療 72 時間後、LNCaP では細胞周期に大きな変化が認められないのに対し、LNCSS では G2-M 期での細胞周期停止および Sub-G1 期細胞の増加が認められた。

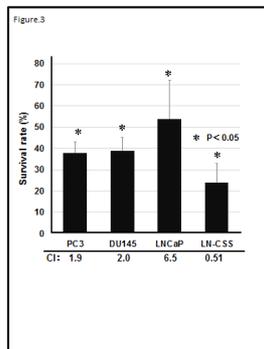


図 3

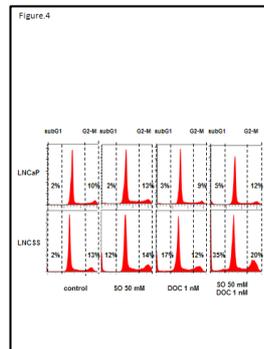


図 4

4) PC 細胞株に対する DOC と SO 併用によるアポトーシス誘導効果の検討：SO による LDH

タンパク発現制御との関連性

上記の細胞周期解析での検討から、SO/DOC 併用によるアポトーシス誘導効果が認められることが示唆されたため、Annexin V アッセイによるアポトーシス誘導効果を検証した。LNCaP では SO/DOC 併用によるアポトーシス率が 21.8%だったのに対し、LN-CSS ではその約 2 倍の 40.4%に増加した。以上から、SO/DOC 併用による抗腫瘍効果の機序の一つに、アポトーシス増強効果が発現していることが示された (図 5)。

さらに、このアポトーシス増強効果の機序として、DOC による LDH タンパク発現の増強を SO が抑制する効果があるとの仮定に基づき、Western blot 法による LDH タンパク発現変化を検討した。予想通り、LN-CSS では DOC により LDH タンパク発現の増加が認められたが、SO はこの増加を強力に抑制することが示された (図 6)。以上から、SO/DOC 併用による相乗的な抗腫瘍効果およびアポトーシス増強効果には、DOC による LDH タンパク発現の増強を SO が抑制することが重要な機序になっていることが示唆された。

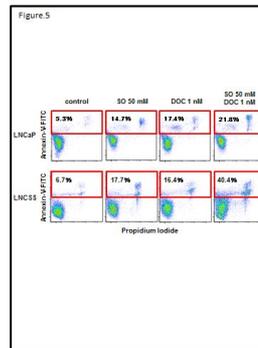


図 5

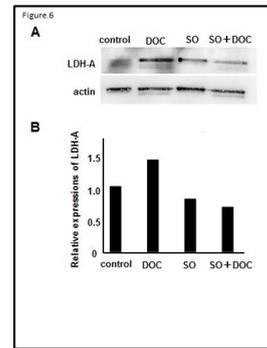


図 6

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. [Muramatsu H](#), [Sumitomo M](#), [Morinaga S](#), [Kajikawa K](#), [Kobayashi I](#), [Nishikawa G](#), [Kato Y](#), [Watanabe M](#), [Zennami K](#), [Kanao K](#), [Nakamura K](#), [Suzuki S](#), [Yoshikawa K](#). Targeting lactate dehydrogenase-A promotes docetaxel induced cytotoxicity predominantly in castration-resistant prostate cancer cells. *Oncology Reports* (in revision)

[学会発表] (計 10 件)

1. [村松洋行](#), [住友 誠](#), [全並賢二](#), [森永](#)

- 慎吾, 梶川圭史, 小林郁生, 西川源也, 吉澤孝彦, 加藤義晴, 渡邊將人, 金尾健人, 中村小源太, 吉川和宏. 前立腺癌の嫌気性解糖系に対する LDH 阻害薬の細胞増殖抑制効果の検討. 第 103 回日本泌尿器科学会総会. 金沢. 2015.04.21
2. 村松洋行, 住友 誠, 森永慎吾, 梶川圭史, 小林郁生, 西川源也, 吉澤孝彦, 加藤義晴, 渡邊將人, 金尾健人, 中村小源太, 吉川和宏. 前立腺癌細胞株における docetaxel と LDH 阻害薬の併用投与による抗腫瘍効果の検討. 第 104 回日本泌尿器科学会総会. 仙台. 2016.04.25
 3. 村松洋行, 住友 誠, 斎藤政信, 杉江美穂, 森永慎吾, 小林郁生, 梶川圭史, 西川源也, 加藤義晴, 渡邊將人, 金尾健人, 中村小源太, 吉川和宏. 前立腺癌細胞株に対する LDH 阻害薬と docetaxel による抗腫瘍効果の検討. 第 105 回日本泌尿器科学会総会. 鹿児島. 2017.04.22
 4. 村松洋行, 住友 誠, 全並賢二, 森永慎吾, 梶川圭史, 小林郁生, 西川源也, 吉澤孝彦, 加藤義晴, 渡邊將人, 金尾健人, 中村小源太, 吉川和宏. 前立腺癌の嫌気性解糖系に対する LDH 阻害薬の細胞増殖抑制効果の検討. 第 24 回泌尿器科分子・細胞研究会. 東京. 2015.02.28
 5. 村松洋行, 住友 誠, 森永慎吾, 梶川圭史, 小林郁生, 西川源也, 吉澤孝彦, 加藤義晴, 渡邊將人, 金尾健人, 中村小源太, 吉川和宏. 前立腺癌細胞株における docetaxel と LDH 阻害薬の併用投与による抗腫瘍効果の検討. 第 25 回泌尿器科分子・細胞研究会. 大阪. 2016.02.27
 6. 村松洋行, 住友 誠, 森永慎吾, 梶川圭史, 小林郁生, 西川源也, 加藤義晴, 渡邊將人, 金尾健人, 中村小源太, 吉川和宏. 前立腺癌細胞株における docetaxel と LDH 阻害薬の併用投与による抗腫瘍効果の検討. 第 26 回泌尿器科分子・細胞研究会. 大分. 2017.03.10
 7. 村松洋行, 住友 誠, 杉江美穂, 森永慎吾, 小林郁生, 梶川圭史, 西川源也, 加藤義晴, 渡邊將人, 全並賢二, 金尾健人, 中村小源太, 吉川和宏. 前立腺癌細胞株に対する docetaxel と LDH 阻害薬による抗腫瘍効果の検討. 第 27 回泌尿器科分子・細胞研究会. 東京. 2018.02.03
 8. Muramatsu H, Sumitomo M, Zennami K, Morinaga S, Kajikawa K, Kobayashi I, Nishikawa G, Yoshizawa T, Kato Y, Watanabe M, Kanao K, Nakamura K, Yoshikawa K. Warburg effect in chemosensitivity: Targeting lactate dehydrogenase-A promotes docetaxel-induced cytotoxicity in prostate cancer cells. 2015 annual meeting for European Association of Urology. Madrid. 2015.03.21
 9. Muramatsu H, Sumitomo M, Morinaga S, Saito M, Sugie M, Kajikawa K, Kobayashi I, Nishikawa G, Kato Y, Watanabe M, Kanao K, Nakamura K, Yoshikawa K. Warburg effect in chemosensitivity: Targeting lactate dehydrogenase-A promotes docetaxel-induced cytotoxicity in prostate cancer cells. 2017 annual meeting for American Association for Cancer Research. Washington. 2017.04.03
 10. Muramatsu H, Sumitomo M, Morinaga S, Sugie M, Kajikawa K, Kobayashi I,

Nishikawa G, Kato K, Watanabe M, Zennami K, Kanao K, Nakamura K, Yoshikawa K. Warburg effect in chemosensitivity: Targeting lactate dehydrogenase-A promotes docetaxel-induced cytotoxicity in prostate cancer cells. 2018 annual meeting for European Association of Urology. Copenhagen. 2018.03.16

6 . 研究組織

(1)研究代表者

住友 誠 (SUMITOMO MAKOTO)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：50255535

(2)研究分担者:

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

村松 洋行 (MURAMATSU HIROYUKI)
愛知医科大学・医学部・助教
研究者番号：60714847