

**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：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670700

研究課題名(和文)ライブラリースクリーニングを用いたCRPCに対する新規創薬標的分子の探索

研究課題名(英文)Identification of new therapeutic molecules for CRPC by using library screening methods

研究代表者

中村 英二郎(Nakamura, Eijiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90293878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌はこの20年間に全悪性新生物で最も死亡数が増加した癌腫であり、その対策が重要である。進行症例に対しては、抗アンドロゲン療法が標準治療として施行され一定の治療奏功期間が得られるが、殆どの症例が同療法に治療抵抗性を示す去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)に移行する。CRPCは予後不良であり、同増殖機構の解明に基づいた新規薬剤の開発が急務となっている今回、アンドロゲン依存性LNCaP細胞を用いたshRNAライブラリースクリーニングを行いAR、及び、PSAの亢進を認め、実臨床のCRPCに近い細胞の樹立に成功した。今後、shRNA fragmentの解析を進め、CRPC増殖機構の解明を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：It is important to establish new therapeutic strategy for prostate cancer since the number of patients is most rapidly increased among all types of cancer disease in these 20 years. Although the androgen ablation therapy is performed as a standard therapy for patients with advanced disease, however, cancer cell finally acquire resistance in most cases, so called Castration Resistant Prostate Cancer (CRPC). We have succeeded in establishing several CRPC cell lines expressing abundant PSA and AR by using LNCaP cells and shRNA library. We are planning to clarify the mechanisms of androgen-independent growth of prostate cancer cells through the analysis of these cells.

研究分野：前立腺癌

キーワード：CRPC Androgen

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、この 20 年間に全悪性新生物の中で最も死亡数が増加した癌腫となっている。2020 年には 2 万人以上が死亡すると推定されており、その対策が重要である。初診時において、既に転移巣や周囲臓器浸潤を認める病期進行症例に対しては、手術療法ではなく抗アンドロゲン療法が標準治療として施行される。これらの患者においても同療法により一定の治療奏功期間が得られるが、殆どの症例が抗アンドロゲン療法に治療抵抗性を示す去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) へと移行する。近年、Enzalutamide、Abiraterone などの新規治療薬が本邦においても保険適応となり一定の治療効果を示しているものの CRPC は未だ予後不良の疾患であり、その増殖機構の解明に基づいた新規薬剤の開発が急務となっている。

### 2. 研究の目的

前立腺癌細胞はアンドロゲン依存性に増殖するため、実臨床において抗アンドロゲン療法が治療効果を示す。しかし、殆どの症例がアンドロゲン非依存性増殖最終的には CRPC へと移行しその予後は極めて不良である。CRPC の克服に向けて薬剤耐性の分子機構解明が必須となるが、これまでのところ明らかとなっていない。その理由として、xenograft を含めて、患者腫瘍組織からの CRPC 細胞株樹立が *in vivo*、*in vitro* とも、非常に困難である事が挙げられる。そこで、今回、抗アンドロゲン依存性 LNCaP 細胞を用いて CRPC 発症の分子機構の解明を行うことを目的として、shRNA ライブラリースクリーニングを中心とした実験を行った。

### 3. 研究の方法

Collecta 社の Pooled Lentiviral shRNA Libraries (<http://www.collecta.com/>) を使用しスクリーニングを行った。Virus supernatant は、titer を 1 細胞に対して 1 個の Fragment が Integration される様に multiplicity of infection (MOI) を調整した上でアンドロゲン依存性 LNCaP 細胞に感染を行った。Infection を行った LNCaP 細胞をライブラリーの selection marker である Puromycin 処理を行った。その後ステロイドホルモンが除去された csFBS (Charcoal stripped FBS) 下での培養に切り替えた。同条件下において長期間の培養を行い、shRNA の発現によりアンドロゲン非依存性増殖能を獲得した LNCaP 細胞クローンを顕微鏡下に観察を行いながら colony の pick up を行い、csFBS での培養を更に継続した。

### 4. 研究成果

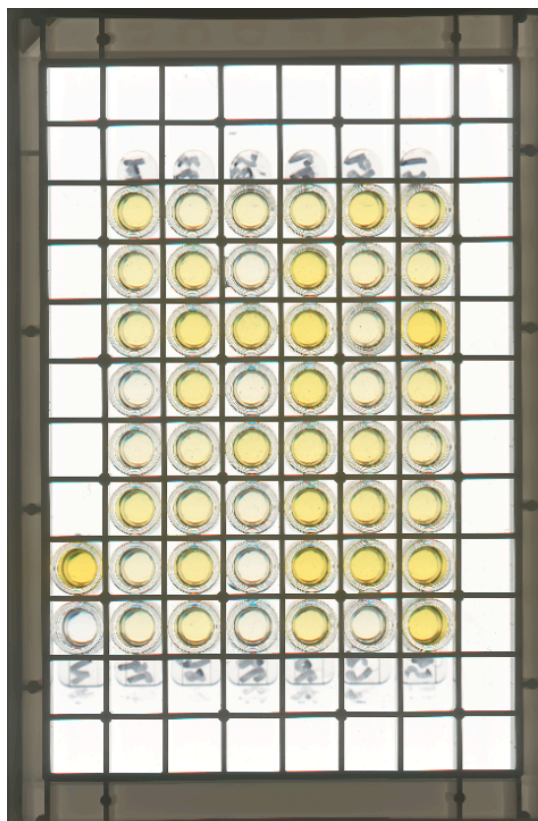


図1 クローンの培養上清を用いた PSA EISA 結果

i) Pick up を行ったクローンは 48well plate を用いて培養を開始した。同 Plate において細胞密度が 60-70%にまで増殖した後に上清を回収し、1次スクリーニングとして ELISA 法により、各クローンからの Prostate specific antigen (PSA) 産生の検出を行った (図1)。

ii) 上清中への PSA 産生が確認されたクローンは 24well、12well と split を行いながら csFBS 下での培養を継続した。最終的には 6well plate まで増殖を行った時点で、2次スクリーニングに向けた蛋白抽出を行った。

iii) 2次スクリーニングとしてウェスタンブロット法により、PSA、及び、アンドロゲン受容体 (AR) の発現解析を行った。コントロールとしては、親株の LNCaP 細胞に shGFP の Infection を行い、更に Puromycin での selection を行った後に csFBS で 10 日間の培養を行った細胞から抽出された蛋白を使用した。図2に示す様に、複数の LNCaP 細胞クローンにおいてアンドロゲン非存在下での培養を行っているにも関わらず、コントロール細胞に比較して PSA、及び、AR の発現亢進が認められることより、実臨床における CRPC に近い細胞株が樹立されたものと考えられた。

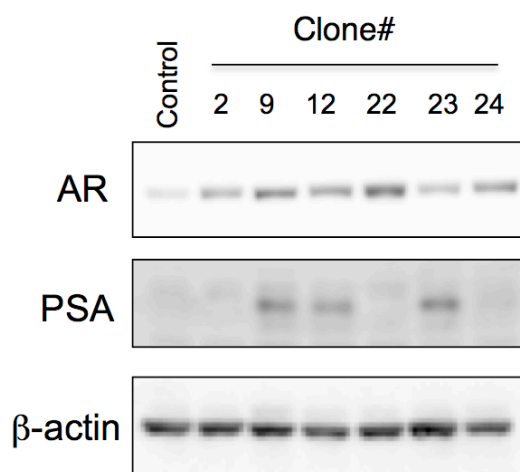


図2 shRNA ライブラリースクリーニングにより得られたクローンの whole cell extract を用いた WB 結果

iv) 2次スクリーニングの WB 結果において、AR、PSA が共に発現亢進を示した細胞からの shRNA fragment の回収を行った。方法としては、まず各々の細胞から genomic DNA を抽出、ゲノムに integrate されている shRNA ライブラリーの plasmid である、

pRS112-U6-(sh)-HTS4-UbiC-TagRFP-2A-Puro の共通配列に対する PCR primer を作製し、shRNA fragment を含む領域の増幅を行った。PCR 産物を直接、または、plasmid に組込んだ後に sequencing を行い、shRNA fragment の配列を同定した。

v) 上記の実験で得られたシーケンス情報をもとに BLAST Search を行ったところ、Epigenetics に関連する遺伝子などが標的 mRNA となっていることが明らかとなった。

今後は、shRNA ライブラリースクリーニングで抽出された CRPC 増殖機構に関連すると考えられる遺伝子群の機能解析を進め、前立腺癌におけるアンドロゲン非依存性増殖機構の解明を行っていく予定である。

#### 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2件)

1, Shibasaki N, Yamasaki T, Kanno T, Arakaki R, Sakamoto H, Utsunomiya N, Inoue T, Tsuruyama T, E Nakamura, Ogawa O, and Kamba T. Role of IL13RA2 in Sunitinib Resistance in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *PLoS One*. Jun 26;10(6):e0130980. 2015

2, M Nakashima, Y Matsui, T Kobayashi, R Saito, S Hatahira, K Kawakami, E Nakamura, H Nishiyama and O Ogawa.

Urine CXCL1 as a biomarker for tumor detection and outcome prediction in bladder cancer. *Cancer Biomark.* Jun 2;15(4):357-64. 2015

〔学会発表〕（計 1 件）

第 53 回日本癌治療学会学術集会

2015 年 10 月 29 日 京都国際会議場

臓器別シンポジウム：腎がん治療個別化の多様なアプローチ

VHL 病患者由来 iPS 細胞を用いた疾患モデルの確立

中村英二郎 小川修

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dsk.med.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村英二郎 (NAKAMURA EIJIRO)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：90293878

### (2) 研究分担者

室伏善照 (MUROFUSHI YOSHITERU)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：50448578

### (3) 連携研究者

井上 貴博 (INOUE TAKAHIRO)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：80511881