

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861298

研究課題名(和文) AKR1C3に着目したステロイド生成系制御による難治性前立腺癌の新規治療戦略

研究課題名(英文) New therapeutic strategy for treatment of CRPC targeting the pathway for testosterone synthesis

研究代表者

江崎 太佑 (Ezaki, Taisuke)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50598422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アンドロゲン・アンドロゲンレセプター軸は去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)の進展における中心的な役割を担っており、アンドロゲン生合成系は治療標的として有用である。本研究は、アンドロゲン生合成系の抑制部位の違いによってもたらされる抗腫瘍効果の相違を検討し、CRPCにおけるステロイド産生系の意義のさらなる解明と、その制御によるCRPCの新規治療戦略の確立を目的とした。前立腺癌の進展プロセスを模倣した複数の前立腺癌細胞株で検討した結果、ステロイド産生系の酵素阻害剤やその系の生成物でありアンドロゲンレセプターのリガンドであるアンドロゲンが、それぞれの細部株に対して異なった反応を示すことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Androgen / androgen receptor axis plays a key role in progression of castration-resistant prostate cancer (CRPC). Inhibition of the pathway for testosterone synthesis represents a promising therapeutic strategy for CRPC. We investigated the therapeutic effect of targeting some parts of this pathway, using the human prostate cancer cell line, the human CRPC cell line, and the docetaxel-resistant CRPC cell line. It was found that enzyme inhibitor of this pathway, such as CYP17A inhibitor, or ligand of androgen receptor which is the product of this metabolic pathway, such as DHT, showed different effect between the types of cell lines.

研究分野：医学

キーワード：前立腺癌 去勢抵抗性前立腺癌 アンドロゲン・アンドロゲンレセプター軸 アンドロゲン生合成系

1. 研究開始当初の背景

(1) 去勢抵抗性前立腺癌の現状

去勢抵抗性前立腺癌

(castration-resistant prostate cancer; CRPC) は、アンドロゲン遮断療法 (androgen deprivation therapy; ADT) に対して抵抗性を示すが、アンドロゲン・アンドロゲンレセプター軸 (AR axis) は CRPC においてもその進展における中心的な役割を担っている。この点に着目してアピラテロン (CYP17 阻害剤) 等の新規抗アンドロゲン剤も開発されてきた。一方で、ジヒドロテストステロン (DHT) の生成阻害剤であるデュタステリド (5 α 還元酵素阻害剤) は高悪性度の前立腺癌の発生に寄与する可能性が示唆されていた。ステロイド生成系が CRPC に及ぼす影響は極めて重大であるが、その制御の意義に関していまだ十分には解明されていなかった。

(2) 去勢抵抗性前立腺癌に対する当教室の試み

当教室では前立腺癌細胞株 C4-2 をアンドロゲン除去下で培養継続し、独自に CRPC 株: C4-2AT6 を樹立していた (Kosaka et al. Prostate, 70, 162-9, 2010)。C4-2AT6 は PTEN 欠損、AR 増幅、PSA 産生を備えたアンドロゲン非依存性の増殖を呈するのみならず、通常酸素濃度下での HIF-1 \cdot Ets-1 発現上昇に伴う血管新生亢進及び各種化学療法に対する耐性を有する (Kosaka et al, J urol, 185, 2376-2381, 2011)。C4-2AT6 等を使用して、ホルモン感受性前立腺癌細胞株 LNCaP では 5 α 還元酵素阻害剤によって細胞増殖能は低下するが、C4-2 や C4-2AT6 といった CRPC 細胞株では低下を認めないことを示してきた (Kosaka et al, scientific reports, 3, 1268, 2013)。これらより、テストステロン生成系の制御は一元的に前立腺癌の進展に対して抑制的に作用するわけではないことが示唆され、同 pathway の詳細な生化学的解析が必要と考えられた。

(3) 去勢抵抗性前立腺癌における対するステロイド生成系の意義

テストステロン \cdot DHT が AR axis のリガンドとして作用するにも関わらず、リガンド供給源であるテストステロン生成系の抑制部位 (17 α -Hydroxylase or 5 α -reductase) によって得られる結果は必ずしも一致しない。テストステロン生成系が前立腺癌進展に対して担う役割について、各種阻害剤を用いて追究していく必要があった。

臨床応用されているアピラテロン \cdot デュタステリドに加えて、今回 Androstenedione (A-dion) からテストステロンへの代謝に関与する 17 α -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (17 HSD type 5: AKR1C3) に対する阻害剤を用いることとした。CRPC におけるステロイド生成の役割や PI3K-Akt-mTOR pathway との関係性を追究するとともに、AKR1C3 阻害に着目した新規治療戦略を確立

することを目指した。

2. 研究の目的

アンドロゲン \cdot アンドロゲンレセプター軸は去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) の進展における中心的な役割を担い、アンドロゲン生成系の解明は喫緊の課題である。当教室では、アンドロゲン除去化でドセタキセル抵抗性ヒト CRPC 株: CA-2AT6 を樹立し、この細胞株の解析から 5 α 還元酵素阻害によるジヒドロテストステロンの抑制は CRPC における癌の増殖に対して決して抑制的に作用しないことを示唆する知見を得た。そこで、本研究は、テストステロンを Androstenedione (A-dion) から生成する酵素である 17 HSD type 5 (AKR1C3) に着目し、CRPC におけるステロイド生成系の意義のさらなる解明と、その制御による CRPC に対する新規治療戦略の確立を目的とし、

CRPC における AKR1C3 阻害の意義の解明と他のテストステロン生成系阻害剤との比較検討

AKR1C3 阻害剤に着目した新規治療戦略の確立

の 2 つを目標とした。

前項で述べたように、当教室では、ホルモン感受性前立腺癌細胞株 LNCaP では、5 α 還元酵素阻害剤によって細胞増殖能は低下するが、C4-2 や C4-2AT6 といった CRPC 株では低下を認めないことを報告してきた。テストステロン生成系の制御が CRPC にもたらす抗腫瘍効果は、制御部位によって決して parallel ではない。今回用いることとした前立腺癌細胞株 LNCaP \cdot C4-2 \cdot C4-2AT6 は同様に PTEN 欠損、AR 増幅、PSA 産生の形質を備えつつ、それぞれホルモン感受性 \cdot 去勢抵抗性 \cdot 去勢抵抗性ドセタキセル抵抗性と異なった特徴を有する。この特徴は臨床における前立腺癌の進展プロセスと類似し、この実験系を用いることで進展プロセスに着目した CRPC に対する新規治療戦略の構築を可能とすると考えた。また、C4-2AT6 はドセタキセルへの感受性低下を認めるため、抗ガン化学療法抵抗性の 2nd line 確立の実験手法としても有用であり、ドセタキセル抵抗性の改善まで検討することが可能となる。今回、これらの前立腺癌細胞株に対して、A-dion からのテストステロン生成を促進する 17 HSD type 5 (AKR1C3) の阻害剤をはじめとするテストステロン生成系阻害剤を用い、前立腺癌の進展過程におけるテストステロン生成系の変遷を解明し、AKR1C3 阻害に着目した新規治療戦略の確立を試みた。

3. 研究の方法

(1) In vitro での前立腺癌細胞株 LNCaP \cdot C4-2 \cdot C4-2AT6 に対して、AKR1C3 阻害剤、アピラテロン、デュタステリドを使用した際の抗腫瘍効果の検討

アピラテロンとデュタステリド、およびそ

の中間での阻害作用を示す AKR1C3 阻害剤を用いて、LNCaP・C4-2・C4-2AT6 における殺細胞効果について、WST assay を用いて検討。また、その際の細胞内タンパクを抽出し、アポトーシス誘導効果として cleaved caspase3 や cleaved parp の発現を、細胞周期抑制効果として cyclin D1 や Rb のリン酸化の発現を、western blot を用いて比較検討。

(2)前立腺癌細胞株 LNCaP・C4-2・C4-2AT6 における 17 HSD 活性の同定とその解析

LNCaP・C4-2・C4-2AT6 に対して AKR1C3 阻害剤を使用した際の、17 HSD 活性と testosterone の産生能低下の効果の検討。安定同位体 13C で就職したステロイド前駆体 13C-[2,3,4]-androstendione:13C-Adion を細胞株の培養上清に添加し、その代謝産物である 13C-[2,3,4]-testosterone:13C-T を液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) で測定。17 HSD 活性の指標として、13C-Adion/13C-T 比を算出し、また、13C-[2,3,4]-dihydrotestosterone:13C-DHT も測定し、AKR1C3 を使用した状態で、C4-2 および C4-2AT6 における、13C-Adion, 13C-T, 13C-DHT の変化率を比較。

(3)前立腺癌細胞株 LNCaP・C4-2・C4-2AT6 における AKR1C3 阻害剤、アピラテロン、デュタステリドを使用した際のほかの pathway におけるシグナル伝達の評価

テストステロン生成系阻害剤を用いた際の PI3K/Akt/mTOR pathway をはじめとしたほかの pathway の活性の変化について、western blot 法を用いて、各 pathway のタンパクの発現を評価。

(4)In vitro での C4-2AT6 における AKR1C3 阻害剤、PI3K/mTOR pathway 阻害剤及びドセタキセル併用時の抗腫瘍効果の検討

AKR1C3 阻害剤と PI3K/mTOR pathway 阻害剤、AKR1C3 阻害剤とドセタキセル、さらに AKR1C3 阻害剤と PI3K/mTOR pathway 阻害剤とドセタキセル、それぞれの殺細胞効果を調べ、相加相乗効果を検討。殺細胞効果の評価には WST assay を用い、併用による combination index を求め、それぞれの相乗効果の有無を検討。

5)In vivo(皮下腫瘍マウスモデル)での AKR1C3 阻害剤、PI3K/mTOR pathway 阻害剤及びドセタキセル併用時の抗腫瘍効果の検討

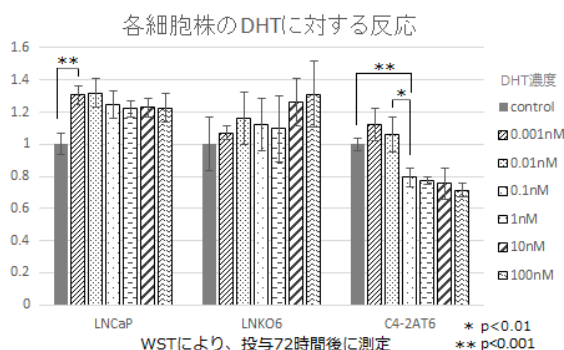
castration を施行した 6~8 週齢の雄の nude BALB/C mice に 1×10^6 乗個の細胞を腹部に皮下注射し、難治性去勢抵抗性前立腺癌細胞株 C4-2AT6 を用いた xenograft model を作成。下記の通り 4 群に分ける。コントロール、AKR1C3 阻害剤、AKR1C3 阻害剤 + AKR1C3 阻害剤投与群、AKR1C3 阻害剤 + AKR1C3 阻害剤 + ドセタキセル投与群。体重および腫瘍体積についてプロットし、4 群間での腫瘍増大速度を比較。皮下腫瘍の採取とともに、抽出した皮下腫瘍からタンパクを抽出し、western blot、免疫染色を行いそれぞれの腫瘍における cleaved parp, Ki67, pAkt, pS6 および AR の発現等を検討し、相乗効果の

分子メカニズムを解析。In vitro の検討で、AKR1C3 阻害剤よりもアピラテロン・デュタステリドのほうが有効性が高い場合には、これらの薬剤を用いて検討。また、濃度や投与タイミングについて検討を追加し、相乗効果の分子基盤を追及する。

4. 研究成果

平成 26 年度には、当教室においてアンドロゲン除去下での長期間培養により樹立された CRPC 細胞株モデル: LNK06 と、同じくアンドロゲン除去下で樹立されたドセタキセル抵抗性ヒト CRPC 株: CA-2AT6 の 2 種類の CRPC 株を含む、各種前立腺癌細胞株 (LNCaP・LNK06・CA-2AT6) において、まず、テストステロン生成系において AKR1C3 の上流の酵素である CYP17A の阻害剤 (アピラテロン) について、WST assay 法を用いて抗腫瘍効果を検討した。検討の結果、CYP17A 阻害剤は細胞株のアンドロゲンへの依存性に応じて効果が異なることが示唆された。

平成 27 年度は、ステロイド生成系酵素から離れて、その系の生成産物であり AR のリガンドであるテストステロン・DHT が、各種前立腺癌細胞株 (LNCaP・LNK06・CA-2AT6) に示す反応を検討した。その結果、テストステロンや DHT 自体が、それぞれの細胞株に対して異なった反応を示すという知見が得られた。



上記のように、DHT は本来 AR axis のリガンドとして作用するにも関わらず、進行 CRPC 細胞に対して抗腫瘍効果を発揮していた。その機序は完全には解明されていないが、CDK2 や CyclinA, Skp2, c-Myc といった細胞周期調節因子が関与して G1 arrest が生じることが示唆されており、ホルモン感受性 去勢抵抗性 去勢抵抗性ドセタキセル抵抗性と進行する各段階で、細胞内の代謝系が劇的に変化していることの反映とも考えられた。そこで今後は、細胞周期調節機構に着目して、そのシグナル伝達の変化が各種前立腺癌細胞にもたらす抗腫瘍効果および AR axis をはじめとする様々な pathway に与える活性変化を、比較・評価していくことを検討している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

(1) Ezaki T, Kosaka T, Mizuno R, Shinojima T, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M.
Efficacy of treatment with a GnRH antagonist in prostate cancer patients previously treated with a GnRH agonist. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 査読あり. 76(2):301-6. 2015.
DOI: 10.1007/s00280-015-2798-4.

〔学会発表〕(計4件)

(1) 江崎太佑
「転移性前立腺癌に対するホルモン療法における、初期の治療反応性と予後の関連」
第31回前立腺シンポジウム, 2015/12/13
東京コンファレンスセンター(東京都港区)

(2) 江崎太佑
「前立腺癌のホルモン療法における、GnRHアゴニストからGnRHアンタゴニストへの交替療法の検討」
第53回癌治療学会, 2015/10/29
国立京都国際会館(京都府京都市)

(3) 江崎太佑
「前立腺癌に対するホルモン療法における、PSA低下速度の予後予測因子としての可能性」
第103回日本泌尿器科学会総会, 2015/04/18
ホテル日航金沢(石川県金沢市)

(4) 江崎太佑
「ハイリスク前立腺癌に対するホルモン療法における、初期の治療反応性と予後の関連について」
第30回前立腺シンポジウム, 2014/12/14
東京コンファレンスセンター(東京都港区)

〔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〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 江崎太佑
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 50598422

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし