

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462472

研究課題名(和文)フラボノイドを用いた前立腺癌再燃の予防とドセタキセル感受性増強への応用

研究課題名(英文)Prevention of CRPC and application for docetaxel treatment using flavonoids

研究代表者

溝上 敦(MIZOKAMI, Atsushi)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：50248580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌が進行すると、その後の治療に難渋する。従来ドセタキセルを中心とした抗癌剤が有効であったが、それを使用した後は予後不良である。我々は、フラボノイドの一種である2'-hydroxyflavanone (2'-HF)を使用して、前立腺癌細胞に対する効果を調査した。2'-HFはアンドロゲン感受性前立腺癌細胞LNCaPだけでなく、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞PC-3、DU145においても抗腫瘍効果を示した。さらに、LNCaPにおいてPSA promoterによって誘導されるルシフェラーゼアッセイを行ったところ、2'-HFはアンドロゲンによるアンドロゲン受容体活性亢進を阻害した。

研究成果の概要(英文)：After progression of CRPC during hormonal treatment and docetaxel treatment, we face difficulty of these treatments. Therefore, it is important to develop new medicines next to taxanes. Then we focused on one of flavonoids, 2'-hydroxyflavanone (2'-HF). 2'-HF inhibited not only cell proliferation of androgen-sensitive prostate cancer LNCaP but also androgen-independent prostate cancer cells PC-3 and DU145. We also examined effect of 2'-HF on androgen receptor (AR) activity. When LNCaP cells transfected with PSA promoter-driven luciferase reporter were treated with 2'-HF in the presence of androgen, AR activity was reduced by 2'-HF. These data indicate that 2'-HF is candidate to treat CRPC after docetaxel treatment.

研究分野：腫瘍学

キーワード：前立腺癌 2'-hydroxyflavanone 誘導体 AR-V7

1. 研究開始当初の背景

進行前立腺癌の治療はアンドロゲン除去療法 (ADT) が主流で、約 90% 以上の症例でその効果をあげている。しかし、やがて去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) へと進行する。この前立腺癌の再燃の機序は徐々に明らかになりつつある。特に、アンドロゲン受容体 (AR) の発現の亢進 (Chen, CD. *Nature Med* 10: 33-39 2004)、androgen 感受性の亢進 (Taplin, ME. *J Cell Biochem* 91: 483-90 2004) により、AR および副腎性 androgen がこの再燃に重要な役割を果たしていることが報告されてきた。これまでに我々も、日本で始めて AR に対する抗体を作成し、(溝上 *日本泌尿器科学会雑誌* 83: 1801-7 1992)、AR プロモータの解析 (Mizokami A. *Mol Endocrinol* 8: 77-88 1994)、AR 非翻訳領域での翻訳調節機構 (Mizokami A. *J Biol Chem* 269: 25655-9 1994) の解析を行い、前立腺癌における AR の発現、機能解析を進めてきた。さらに副腎性アンドロゲンの再燃への関与の可能性 (Mizokami A. *Cancer Res* 64:765-71 2004)、前立腺癌組織内での間質細胞と協調しての副腎性アンドロゲンから DHT 生合成など、アンドロゲン、AR、前立腺癌再燃の機序の研究を精力的に進めてきた。最近、副腎性アンドロゲン合成阻害剤の有効性が USA の FDA に認可され、副腎性アンドロゲンの再燃への関与が再認識されている。この事実は我々の研究結果の重要性を示している。しかし、現在臨床に応用されているもの、あるいは今後応用されつつある薬剤は、再燃後の 2nd, 3rd line としてのホルモン療法薬や抗癌剤で、CRPC となった後の治療を考えた薬剤である。患者は CRP となると、次に使用する薬剤の有効性に関する不安、副作用に対する不安、予後が限られるという不安を強く抱く。そこで、再燃後に治療するというよりも、再燃を予防するという視点に立った考え方は患者にとって極めて重要である。また再燃後に抗癌剤を使用する場合でも、抗癌剤による副作用を軽減し、抗癌剤の効果を増強させることも抗癌剤を安全に長期間使用するためにも重要である。このような観点から、前立腺癌の再燃の予防、また再燃後の 2nd, 3rd line ホルモン療法や抗癌剤の感受性を亢進させるための基礎的研究を行うことは極めて重要と考える。フラボノイドは柑橘類、野菜などに含まれる有機化合物で、抗酸化作用や、抗炎症作用、抗腫瘍効果など様々な作用を持つことが知られている。また、柑橘類に多く含まれるフラボノイドの誘導体であるフラバノン系の物質は、アンドロゲン合成酵素 Type 5 17 -Hydroxysteroid dehydrogenase (HSD17B5) の活性を阻害すると報告された。この様々なフラボノイドを用いることで、再燃予防や、抗癌剤感受性を亢進させることができるのではないかと、いう仮説のもとに基礎的研究を行い、将来の臨床応用をしていきたいと考えた。

2. 研究の目的

今回使用する様々な植物フラボノイドは、柑橘類、野菜、漢方薬にも多く含まれており、抗酸化作用や様々な癌腫で抗腫瘍効果を持つことが実験的に確かめられている。我々は予試験で前立腺癌細胞に柑橘類に含まれるある種のフラボノイドを添加して、抗腫瘍効果があることを既に確認している。さらにアンドロゲン生合成に関与する酵素 Type 5 17 -Hydroxysteroid dehydrogenase (HSD17B5) の活性阻害も *in vitro* で確認している。植物性フラボノイドは様々なものがあることが知られているが、比較的副作用の軽いと考えられるフラボノイドで、低濃度で抗腫瘍効果、アンドロゲンシグナルを遮断する必要がある。Fig. 1 のように、本研究では、柑橘類や漢方薬に含まれる様々なフラボノイドを前立腺癌細胞に処理して、低濃度で抗腫瘍効果を持つものを同定するとともに、抗腫瘍効果を示す機序を細胞周期の変化、アポトーシスの面から明らかにしていく。さらにアンドロゲンによる増殖シグナルが植物フラボノイドでどのように変化するかを明らかにしていく。このとき、細胞内での DHEA から DHT に至るアンドロゲン生合成の過程から、DHT と結合した AR がアンドロゲン応答性遺伝子を活性化させるまでの過程における植物性フラボノイドの作用点を解明する予定である。抗腫瘍効果、アンドロゲンシグナル遮断作用を示す副作用の少ない薬物を使用することで、CRPC とならないよう予防的に服用することが可能となることを調査していく。さらに前立腺癌細胞に対して抗癌剤 (ドセタキセル等) と植物フラボノイドを併用することにより抗腫瘍効果を示すことが期待できるが、その場合、相加的あるいは相乗効果になるのか明らかにする。また我々の施設で樹立したタキサン系抗癌剤耐性前立腺癌細胞株に植物フラボノイドを使用した時、タキサン系抗癌剤に対する感受性を回復させるかどうかを明らかにし、どのような機序で耐性を克服させるのかを検討する予定である。これらの結果をもとに、植物フラボノイドの抗腫瘍効果やドセタキセルとの併用効果を、前立腺癌担癌マウスを使用した実験系で副作用も含めて観察し、臨床応用に向けての基礎的検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

アンドロゲン合成酵素 Type 5 17 -HSD を阻害すると言われ、我々もその効果を確認している植物フラボノイドやその他の様々な植物フラボノイドを用い、アンドロゲン感受性・非感受性前立腺癌細胞に対する抗腫瘍効果を確認するとともに、抗腫瘍効果を誘導する機序をアポトーシスの面から解析した。その中で、androstenedione を testosterone に変換する酵素 AKR1C3 が AR の活性を高め

るかどうかを検討した。さらに AR の発現、AR 活性の影響を調査する。AR のすおうライソバリエーションである AR-V7 への影響を検討するために、AR-V7 発現プラスミド作製する。また、去勢抵抗性前立腺癌に使用される抗癌剤カバジタキセルと植物フラボノイドとの併用によるカバジタキセル感受性の変化、ドセタキセル抵抗性前立腺癌細胞株でのフラボノイドによるドセタキセル感受性の回復の有無を観察し、その回復の機序を明らかにする。最終的に植物フラボノイドによる CRPC とならないような予防法の確立とともに、抗癌剤感受性増強作用を観察し、臨床応用への基礎的検討を行う。

4. 研究成果

androgen 感受性前立腺癌細胞 LNCaP、非依存性前立腺癌細胞 PC-3、DU145 にフラボノイドの一種であるフラバノンを追加して抗腫瘍効果を検討した。PC-3、DU145 では $10 \mu\text{M}$ 2'-hydroxyflavanone が非常に強い抗腫瘍効果を示した。この抗腫瘍効果はアポトーシスを誘導することで引き起こされていることが観察された。さらに、LNCaP では $10 \mu\text{M}$ 2'-hydroxyflavanone は中程度に増殖を抑制したが、アポトーシスを誘導させるまでには至らなかった。(Fig. 1A-D)

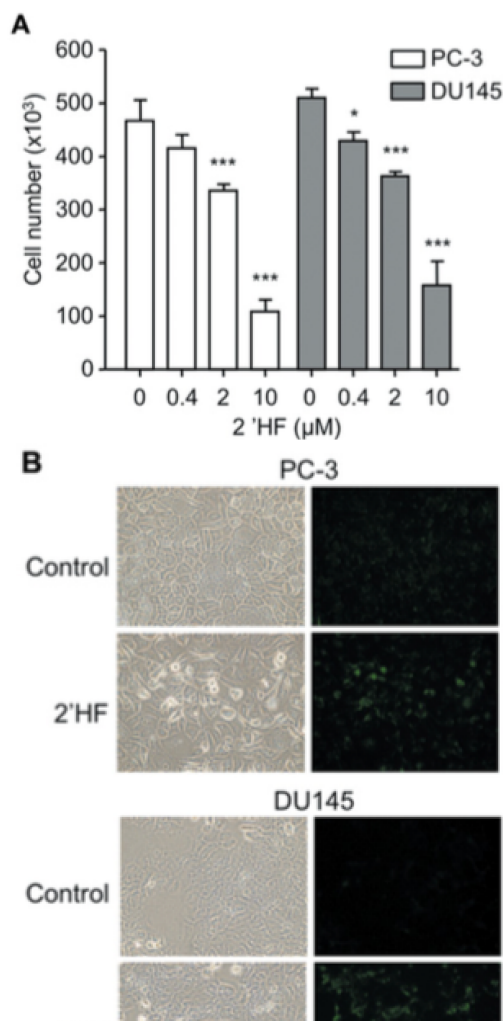
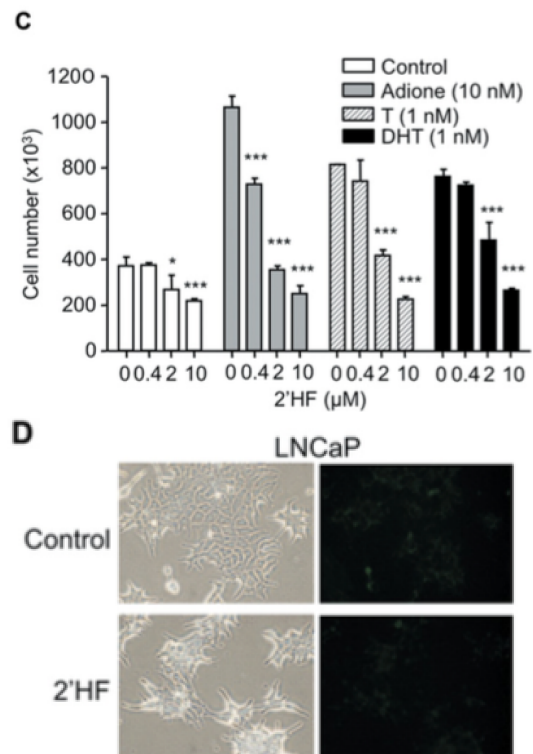


Fig. 1A-D 2'-hydroxyflavanone の抗腫瘍効果



次に、2'-hydroxyflavanone は副腎性アンドロゲン DHEA から代謝された androstenedione を testosterone に変換する酵素 AKR1C3 の活性を阻害すると報告されているため、LNCaP に DHEA を添加し、androgen receptor (AR) 活性が阻害されるかを観察したところ、その効果が十分に観察された。しかし、control として添加した DHT による AR 活性誘導も 2'-hydroxyflavanone により阻害されたことにより、2'-hydroxyflavanone による AR 活性阻害は装うことなく活性阻害機序が考えられた。実際、2'-hydroxyflavanone は LNCaP 細胞内で添加した androsterone が testosterone に変換されることを阻害しなかった。

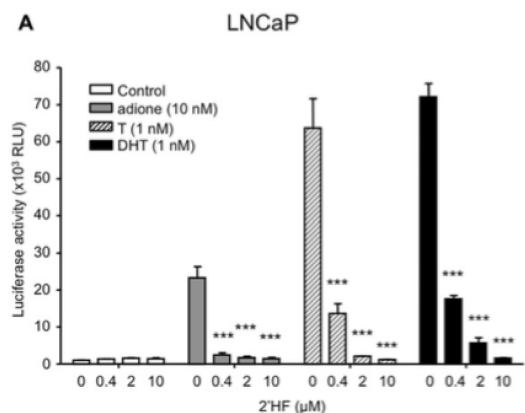


Fig. 2 2'-hydroxyflavanone の AR に対する効果

また、これらの結果を示す過程において androstenedione を testosterone に変換する酵素 AKR1C3 が AR の活性を高める作用があることを発見した。つまり、LNCaP で AKR1C3 強制発現プラスミドを導入し、AR 活性を調べると、DHT による AR の活性化をさらに増床させることを突き止めた。文献的にも、AKR1C3 は CRPC にて発現が亢進することが知られているため、CRPC になると AKR1C3 の影響により androgen 高感受性になる可能性があることを突き止めた。

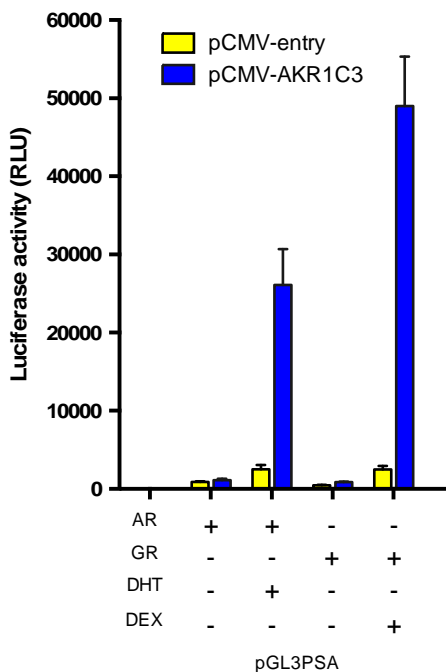


Fig. 3 PC-3におけるAKR1C3によるAR活性増強作用

次に、2'-hydroxyflavanone の抗腫瘍効果、androgen receptor (AR) の活性阻害効果を確認したため、この分子に対する様々な誘導体を合成し (12 種類)、アンドロゲン感受性前立腺癌 LNCaP 細胞やアンドロゲン非依存性前立腺癌 PC-3、DU145 細胞に対する抗腫瘍効果を 2'-hydroxyflavanone と比較確認した。多くの誘導体は 2'-hydroxyflavanone と同等あるいはそれ以下の抗腫瘍効果しかなかった。さらに DHT による AR 活性亢進に対する阻害作用も同様であった。しかし、2 種類の誘導体 (2'-HF-D1, 2'-HF-D3) のみ PC-3、DU145 細胞に対する抗腫瘍効果が 2'-hydroxyflavanone より強く認められた (Fig. 4 A, B)。さらに DHT による AR 活性増強作用は 2'-hydroxyflavanone で抑制されたが、これらの二つの誘導体ではさらに強く阻害することが確認された (Fig. 5)。

今後、さらに誘導体の側鎖を変えることにより、新たな誘導体を合成し、より低濃度で作用するものを開発する予定である。

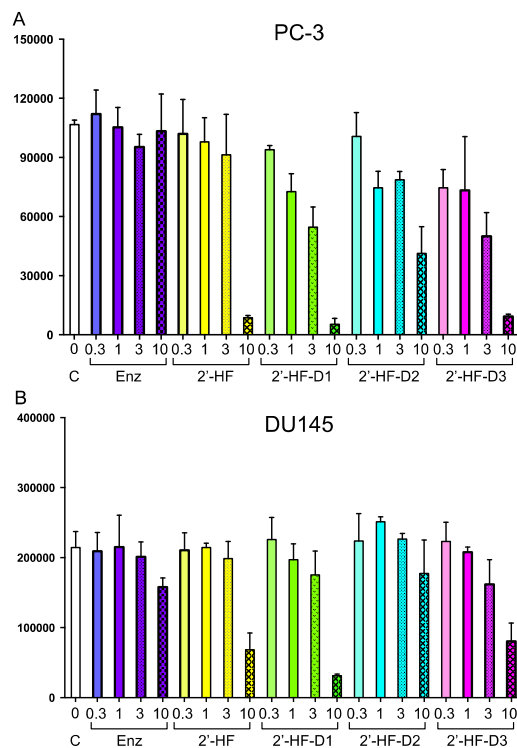


Fig. 4 Effect of 2'-hydroxyflavanone (2'-HF) and its derivatives (2'-HF-D1, D2, D3) on PC-3 and DU145 cell growth. Enz: Enzalutamide.

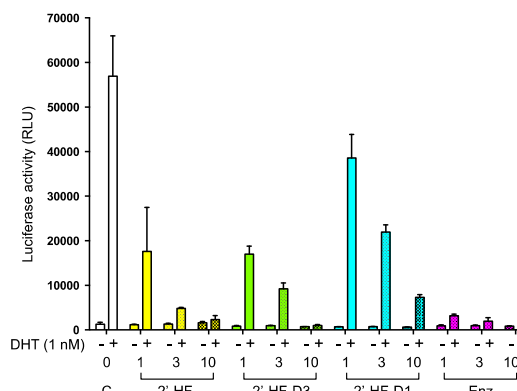


Fig. 5 Effect of 2'-HF and its derivatives (2'-HF-D1, D3) on AR activity in LNCaP cells

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 1 件)

Repression of cell proliferation and androgen receptor activity in prostate cancer cells by 2'-hydroxyflavanone.

Ofude M, Mizokami A, Kumaki M, Izumi K, Konaka H, Kadono Y, Kitagawa Y, Shin M, Zhang J, Keller ET, Namiki M.

Anticancer Res. 2013; 33 (10): 4453-61.

(査読有)

DOI: 10.1158/1538-7445.AM2014-617

〔学会発表〕(計 1件)

Repression of cell proliferation and androgen receptor activity by 2'-hydroxyflavanone in prostate cancer cells. Mitsuo Ofude, Atsushi Mizokami, Misako Kumaki, Kouji Izumi, Hiroyuki Konaka, Yoshifumi Kadono, Minkyong Shin, Jian Zhang, Evan T. Keller, and Mikio Namiki. AACR Annual Meeting, San Diego, California, USA, April 5 - 9, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：2'-hydroxyflavanone によるアンドロゲン受容体発現抑制とアンドロゲン応答性抑制による前立腺がん再燃予防
発明者：溝上 敦
権利者：金沢大学
種類：特許権
番号：特開 2015-199692
出願年月日：2014年4月10日
国内外の別：国内

6. 研究組織

- (1) 研究代表者：溝上 敦
(MIZOKAMI, Atsushi)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：50248580
- (2) 研究分担者：泉 浩二 (IZUMI, Kouji)
金沢大学・医学系・特任助教
研究者番号：80646787
- 小中 弘之 (KONAKA, Hiroyuki)
金沢大学・大学病院・講師
研究者番号：40334768