

令和元年5月24日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10999

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌のドセタキセルとカバジタキセル耐性化の機序とその克服

研究課題名(英文) Mechanism of docetaxel and cabazitaxel-resistance in castration-resistant prostate cancer

研究代表者

角野 佳史 (KADONO, Yoshifumi)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：10397218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CRPCに対する2nd line化学療法としてカバジタキセルが使用される。ドセタキセル抵抗性前立腺癌細胞株からカバジタキセル耐性株を2種類樹立した。この細胞株を用いてカバジタキセル耐性化の機序を明らかにすることを目的とした。カバジタキセル耐性細胞株において、1,000以上の遺伝子の発現変化が認められた。特に、MDR1過剰発現がカバジタキセル耐性細胞株において確認された。MDR1をノックダウンし、感受性が回復するかどうかを観察したところ、カバジタキセルの感受性が部分的に回復した。以上より、カバジタキセルに対する耐性化にはMDR1の過剰発現が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

まず、カバジタキセル耐性株を樹立して、そのキャラクタライズを行えたということは、今後の耐性化克服のための足がかりにあると考えている。また、今回の成果においてMDR1の発現過剰がCRPCのカバジタキセル耐性の機序の一つであるということを明らかにすることができた。MDR1の関与があるということで、MDR1機能を阻害する薬物を併用することによって、抗腫瘍効果を高めたり、副作用の軽減ができる可能性があり、臨床的、社会的に意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The elucidation of the mechanism of the cabazitaxel-resistance and the conquest are important themes to improve the prognosis of the patients. We tried to establish cabazitaxel-resistant CRPC cells and characterized them. We established two cabazitaxel-resistant cells, PC-3-TxR/CxR and DU145-TxR/CxR. PC-3-TxR/CxR and DU145-TxR/CxR cells became resistant for cabazitaxel by 11.8 and 4.4-fold, respectively. The TxR/CxR cells showed cabazitaxel-resistant using SCID mice in vivo. Expression of MDR1 gene was up-regulated in PC-3-TxR compared with PC-3 cells and was further up-regulated in PC-3-TxR/CxR. Comparison of cDNA microarray between PC-3-TxR and PC-3-TxR/CxR cells or between DU145-TxR and DU145-TxR/CxR cells revealed that many genes were up-regulated or down-regulated. Knockdown of MDR1 recovered the sensitivity to cabazitaxel not only in PC-3-TxR/CxR cells but also DU145-TxR/CxR cells. Together, regulation of MDR1 gene is important for conquest of the cabazitaxel-resistance.

研究分野：泌尿器科

キーワード：前立腺癌 CRPC ドセタキセル カバジタキセル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行前立腺癌の初期治療にはアンドロゲン除去療法 (ADT)が選択され 90%以上の症例で奏功するが、多くの症例で、その後 CRPC へと進行する。ドセタキセルを中心とした抗癌化学療法は CRPC 治療の選択肢のひとつであり、近年、内臓転移を含む進行症例における初期治療での予後改善効果も報告されている。CRPC 治療のみならず、高度進行症例での ADT 併用療法など、ドセタキセルの使用範囲が広がる可能性のある一方、耐性化した後の治療には難渋しているのが現状である。つまりドセタキセル耐性の克服や、耐性化が起こる場合でも、その後の治療戦略を確立することは、患者の延命や QOL 向上を図るための重要なテーマと考えられる。ドセタキセル耐性となった前立腺癌に対する治療戦略として新規ホルモン薬も有効とされているが、完全にアンドロゲン非依存性となった癌組織では奏功せず、やがて進行する。抗癌剤として別のタキサン系抗癌剤としてカバジタキセルが有効であることが証明され、2014 年秋に本邦でも認可された。カバジタキセルはドセタキセルの側鎖がわずかに異なるだけで、抗腫瘍効果が異なる。また P 糖蛋白に対する親和性も低いので、カバジタキセルは細胞内から排出されにくいと報告されている (Cisternino S et al. Br J Pharmacol 138:1367-75,2003)。しかし、カバジタキセルでも同様に前立腺癌は耐性化し病状は悪化する。

これまで、当該教室では前立腺癌のタキサン系抗癌剤に対する耐性化の機序を明らかにするために、アンドロゲン非依存性前立腺癌 PC-3 と DU145 を用いてパクリタキセル耐性細胞株を樹立した。これらの細胞株はドセタキセルにも同じ耐性を示すことを既に確認している。耐性化の機序として、多剤耐性遺伝子 MDR1 プロモータ領域に結合する YB-1 核内移行の亢進に伴う MDR1 の発現の亢進と、MDR1 プロモータ領域のメチレーションの低下による MDR1 の発現亢進により、MDR1 からコードされる P 糖蛋白の発現が亢進することが一因である、ということ明らかにしてきた (Takeda et al. Prostate 2007,67: 955-67)。

さらに耐性化の別の機序を明らかにするために、親株とパクリタキセル耐性細胞株の遺伝子発現プロファイルを用いて cDNA microarray を用いて調査し、多くの発現の異なる遺伝子を同定した。その中で C-terminal tensin like protein (CTEN, tensin 4) の発現低下が耐性化を誘導することも明らかにした (Li et al. Prostate 70:48-60,2010)。しかし、microarray の結果からも、他に発現量の変化する遺伝子は存在し、パクリタキセル耐性化の原因となる遺伝子が十分に解析できていない。また、2014 年から保険承認されたカバジタキセルに関しては、ドセタキセルの使用後もその有効性が証明されているが、やがて、また耐性化が誘導される。カバジタキセルに対する耐性化の機序はまだ全く明らかになっていないのが現状である。

そこで、当該教室では、パクリタキセル耐性前立腺癌細胞株からカバジタキセル耐性前立腺癌細胞株を樹立した。

2. 研究の目的

これまで当該教室ではパクリタキセル耐性前立腺癌細胞株 PC-3-TxR について遺伝子発現を検討してきた。本研究では、研究成果をさらに発展させるために、同耐性株 DU145-TxR においても cDNA microarray を用いて遺伝子発現プロファイルを作成し、耐性化に関与する可能性が高いと考えられる PC-3-TxR と DU145-TxR の両細胞で共通に発現の変化した遺伝子を調査する。さらに、それらが耐性の原因となる遺伝子かどうか、強制発現あるいはノックダウンすることにより、その働きを確認する。また、パクリタキセル耐性前立腺癌細胞を、カバジタキセル存在下で細胞培養することにより、カバジタキセルに対する耐性株をすでに樹立しているが、その耐性株の characterize はまだ未施行である。それらカバジタキセル耐性細胞株を用い、もとのドセタキセル耐性株と比較して変化する遺伝子について、cDNA microarray のみならず、遺伝子の転写後発現調節に関与するとされる microRNA(miRNA)についても miRNA microarray を用いて網羅的に解析する。最終的にはドセタキセル、カバジタキセルに対する耐性化の原因となる遺伝子を同定し、耐性化を克服する手段を発見して、治療に結びつけたい。

3. 研究の方法

樹立されたカバジタキセル耐性株の characterization

新しく樹立されたカバジタキセル耐性前立腺癌細胞株 DU145-TxR/CxR と PC-3-TxR/CxR の増殖速度、ドセタキセルやカバジタキセルに対する IC50 の決定し、今後の研究のベースとなる情報を得る。

SCID マウスを用いての in vivo での耐性化の確認

親株や新しく樹立されたドセタキセルやカバジタキセルに対する耐性株を SCID マウスの皮下に移植して、in vivo でも耐性化を示しているかどうかを確認する。

ドセタキセル・カバジタキセル耐性化の機序解明

パクリタキセル感受性細胞株(PC-3)とドセタキセル耐性細胞株(PC-3-TxR)の遺伝子発現プロファイルは既に作成しているが、DU145 と DU145-TxR の遺伝子発現プロファイルをまだ作成していないため、この遺伝子発現プロファイルを用いて作成する。

同様にカバジタキセル耐性化された細胞株 PC-3-TxR/CxR, DU145-TxR/CxR の遺伝子発現プロファイルを用いて作成し、親株、パクリタキセル耐性株、カバジタキセル耐性株での遺伝子発現プロファイルを比較し、パクリタキセル、カバジタキセル耐性細胞株で共通に発現の亢進・減弱、あるいは特異的に亢進・減弱している遺伝子を明らかにする。

耐性化の原因となる遺伝子の発現を siRNA を用いて制御し、耐性化の原因遺伝子を同定 cDNA microarray から得られた結果をもとにカバジタキセル耐性株で発現の亢進している遺伝子を同定し、その siRNA により耐性株での発現を制御して耐性化の原因遺伝子かどうかを確認する。

4. 研究成果

カバジタキセル耐性前立腺癌細胞株のカバジタキセルに対する IC50

PC-3-TxR と DU145-TxR のカバジタキセルに対する感受性を調べると、IC50 はそれぞれ 1.3nM と、7.09nM であり、TxR 細胞株は wild type の細胞株に比べてカバジタキセルに対して高い抵抗性を示した。臨床的にはドセタキセル耐性の前立腺癌に対してのみカバジタキセルを使用している。PC-3-TxR と DU145-TxR はともにパクリタキセル耐性株ではあるが、ドセタキセルにも同じように交叉耐性を示しており、我々は TxR 細胞株から段階的に(0.1nM から)濃度上昇させる方法でカバジタキセル抵抗性細胞株を作成することを試みた。カバジタキセル抵抗性細胞株(PC-3-TxR/CxR、DU145-TxR/CxR)はカバジタキセルによる処理を始めてから樹立までに6か月を要した。最終的に、細胞増殖抑制の実験ではPC-3-TxR/CxR と DU145-TxR/CxR はTxR 細胞株に比べてそれぞれ11.84倍と、4.34倍になった(Table 1 and Figure 1)。

IC50	PC-3-TxR	PC-3-TxR/CxR	Fold difference
cabazitaxel(nM)	1.3	15.4	11.84
	DU145-TxR	PC3-TxR/CxR	
cabazitaxel(nM)	7.09	30.8	4.34

Table 1 ドセタキセル耐性株、カバジタキセル耐性株の IC50

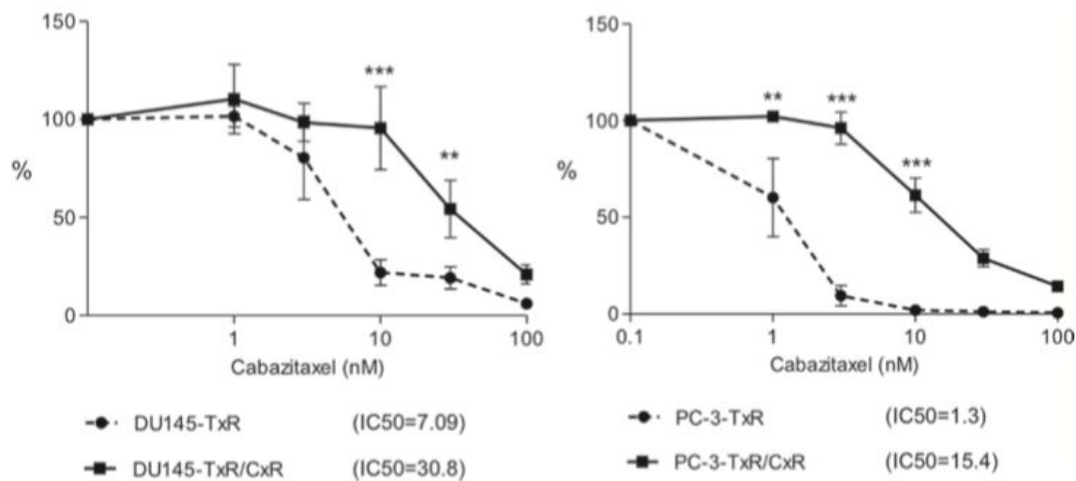


Figure 1 DU145-TxR, DU145-TxR/CxR, PC-3-TxR, PC-3-TxR/CxR は24時間カバジタキセルに暴露し、2日後に細胞数をカウントした。

カバジタキセル耐性株の in vitro での増殖

PC-3(wild type, TxR, TxR/CxR)と、DU145(wild type, TxR, TxR/CxR)のそれぞれの in vitro での増殖速度を調べたところ、PC-3-TxR/CxR の増殖速度はPC-3 wild type に対し有意に高い速度を認めた。一方、DU145 では wild type がもっとも高い速度を示し、TxR/CxR はTxR よりわずかに速い増殖速度を示したが有意差は認めなかった(Figure 2)。

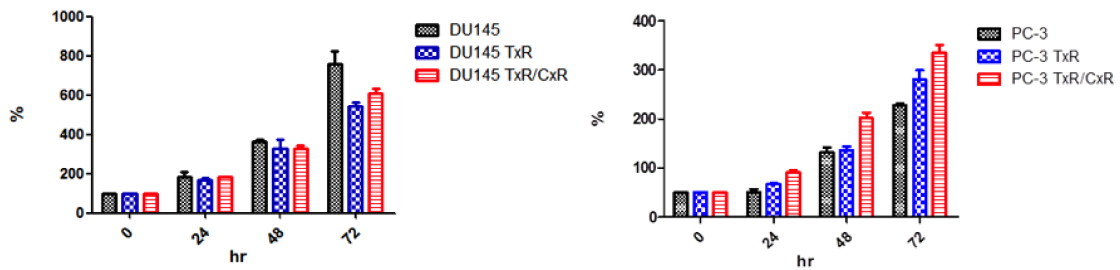


Figure 2 親株、耐性株の増殖スピード

SCID マウスを用いての *in vivo* での耐性株の造腫瘍性
 SCID マウスを用いて TxR および TxR/CxR の細胞株の耐性度を実際に確認した。PC-3, DU145 では control 群が経過で腫瘍が増殖していくのに対し、docetaxel および cabazitaxel 投与群は腫瘍の増殖を認めなかった。PC-3-TxR, DU145TxR は control 群、docetaxel 投与群は経過で腫瘍が増殖していくのに対し、では、control, docetaxel, cabazitaxel 投与群のいずれもが経過で腫瘍の増殖がみられ、その発育速度に有意な差は認められなかった。DU145 TxR は cabazitaxel を 1 週間毎に 10 mg/kg の量で腹腔内投与した際に、腫瘍の増大を認めたため、15 mg/kg の量で投与した。(Figure 3)

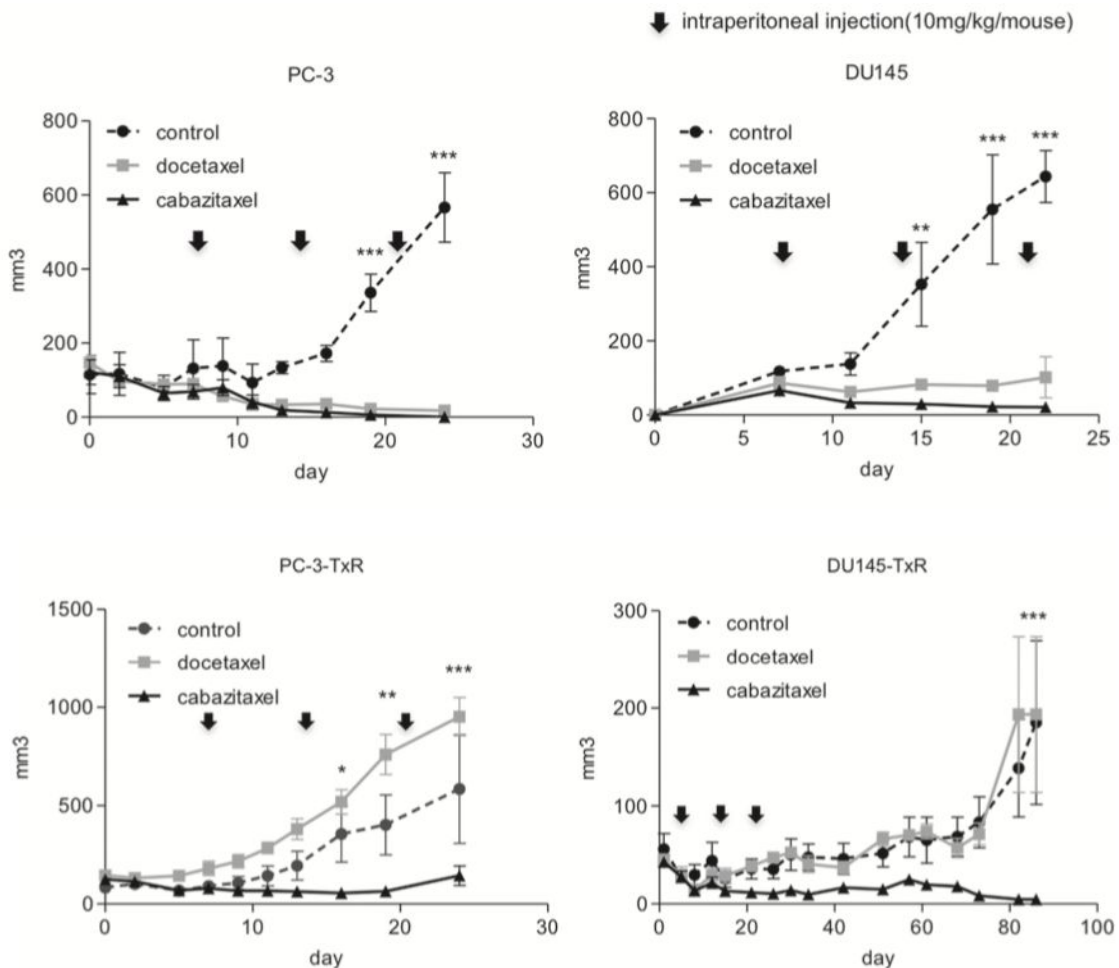


Figure 3 *in vivo* でのカバジタキセル耐性株の耐性化の確認

抗癌剤耐性関連遺伝子の発現の変化
 抗癌剤耐性に関与すると考えられる遺伝子、MDR1, MRP1-7 の発現レベルの違いを RT-PCR で確認したところ、Figure 4 のように親株と比較してカバジタキセル耐性株で共通の発現亢進した遺伝子は MDR1 のみであった。それに伴い、MDR1 のコードするタンパク質 P-Gp の発現が亢進していた。

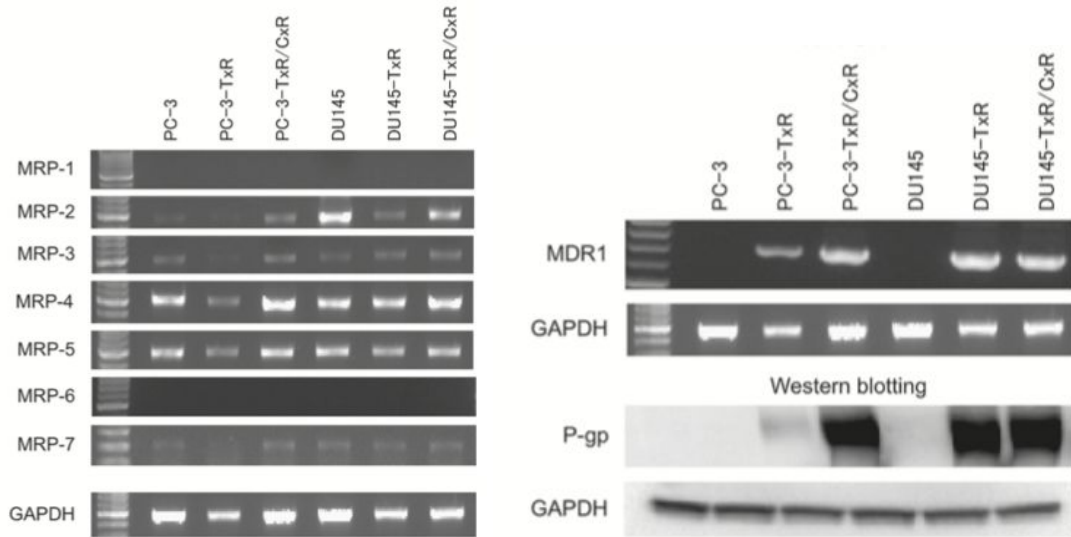


Figure 4 抗癌剤耐性関連遺伝子の発現の変化

cDNA microarray による耐性株の遺伝子発現プロファイルの確認
 親株、TxR、TxR/CxR の細胞株を用いて cDNA microarray による耐性株の遺伝子発現プロファイルを作成し、遺伝子発現の変化を観察した。上述の抗癌剤耐性関連遺伝子の発現パターンは RT-PCR とほぼ同様であった。
 また、PC-3-TxR と PC-3-TxR/CxR および DU145-TxR と DU145-TxR/CxR を cDNA microarray で比較した。PC-3-TxR/CxR では 4470 種の遺伝子が、DU145-TxR/CxR では 1345 種の遺伝子が 3 倍以上の発現を示した。また PC-3-TxR/CxR では 4683 種の遺伝子が、DU145-TxR/CxR では 1537 種の遺伝子が 0.3 倍の発現抑制を示した。特に、ABCB1(MDR) 遺伝子は DU145 と比して DU145-TxR が 500 倍であったが DU145-TxR/CxR ではそれ以上の上昇は認められなかったことに対し、PC-3 と比して PC-3-TxR が 20 倍の上昇を示し、PC-3-TxR/CxR は PC-3-TxR よりもさらに 40 倍の上昇を示した。

カバジタキセル耐性株で発現の亢進している遺伝子の制御によるカバジタキセル感受性の変化
 カバジタキセル耐性株 PC-3-TxR/CxR と DU145-TxR/CxR で共通して 2 倍以上発現の亢進している遺伝子は以外と少なく 20 個しかなかった。その中の遺伝子を siRNA を用いてノックダウンすることによってカバジタキセルに対する感受性がどのように変化するかを調査したが、どの遺伝子のノックダウンによっても感受性は変化しなかった。このことから、PC-3-TxR/CxR と DU145-TxR/CxR においてカバジタキセル耐性に寄与する遺伝子は異なることが示唆された。
 一方、PC-3-TxR/CxR において PC-3-TxR より発現の亢進していた MDR1 は、DU145-TxR/CxR では DU145-TxR よりも発現はそれほど亢進はしていなかった。しかし、親株である DU145 よりも発現は 400 倍亢進していたため、MDR1 の発現を siRNA にてノックダウンしたところ、明らかにカバジタキセルに対する感受性が回復した (Figure 5)。このことからカバジタキセル耐性化にも MDR1 の発現亢進が関与していることが示唆された。

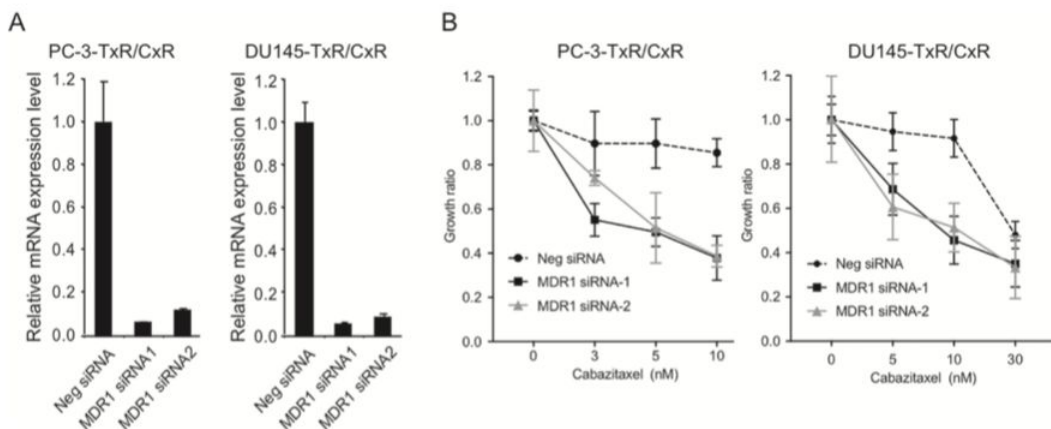


Figure 5 MDR1 siRNA による MDR1 発現抑制とカバジタキセル感受性の変化

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Machioka K, Izumi K, Kadono Y, Iwamoto H, Naito R, Makino T, Kadomoto S, Natsagdorj A, Keller ET, Zhang J, Mizokami A. Establishment and characterization of two cabazitaxel-resistant prostate cancer cell lines. Oncotarget 2018;9(22):16185-16196. 査読有 doi: 10.18632/oncotarget.24609.

[学会発表] (計 1 件)

1. Establishment of cabazitaxel-resistant prostate cancer cell lines Machioka K, Izumi K, Kadono Y, Iwamoto H, Naito R, Makino T, Kadomoto S, Natsagdorj A, Keller ET, Zhang J, Mizokami A. AACR Annual Meeting 2017, Apr, Washington, D.C.USA

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：溝上 敦

ローマ字氏名：MIZOKAMI Atsushi

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：教授

研究者番号 (8 桁) : 50248580

研究分担者氏名：泉 浩二

ローマ字氏名：IZUMI Kouji

所属研究機関名：金沢大学

部局名：附属病院

職名：講師

研究者番号 (8 桁) : 80646787

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。