

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04325

研究課題名(和文) 前立腺癌微小環境内の細胞間クロストークをターゲットとした革新的治療薬の開発

研究課題名(英文) The development of the innovative therapeutic drugs which targete crosstalk in the prostate cancer microenvironment

研究代表者

溝上 敦 (MIZOKAMI, Atsushi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50248580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ホルモン感受性前立腺癌(HSPC)がCRPCとなる機序に癌組織内の微小環境が果たす役割は不明なため、間質細胞と癌細胞のクロストークだけでなく、HSPC細胞とCRPC細胞間のクロストークも重要なことを明らかにした。また、カバジタキセル抵抗性のメカニズムの解明するため、カバジタキセル耐性CRPC細胞株の樹立し、その特徴を明らかにした。我々は最近アンドロゲンシグナルの阻害、AR splicing variant (AR-V7)の阻害、増殖阻害など様々な作用を持つフラボノイド誘導体の合成に成功した。その作用機序を明らかにするとともに、薬剤の改良を進めてその効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行性前立腺癌(去勢抵抗性前立腺癌)に対する治療はまだ十分とは言えず、新聞で発表されるほど予後は良くないのが現状である。今回の我々の研究はこの前立腺癌の治療抵抗性の機序やその治療戦略を立てる上で極めて重要な成果を上げた。今後さらにこの研究が臨床応用されれば、前立腺癌の予後が改善されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The role of the microenvironment within the cancer tissue in the mechanism of hormone-sensitive prostate cancer (HSPC) developing into castration-resistant prostate cancer (CRPC) remains unclear. In this study, the differences in crosstalk between normal and HSPC-derived stromal cells and between CRPC-derived stromal cells and cancer cells were identified. Crosstalk between HSPC cells and CRPC cells was also revealed. In addition, we attempted to establish and characterize a cabazitaxel-resistant CRPC cell line because elucidating and overcoming the mechanism of cabazitaxel resistance is an important topic to improve patient outcomes. We have succeeded in synthesizing flavonoid derivatives with various actions such as inhibition of androgen signaling, inhibition of AR splicing variant (AR-V7), and proliferation inhibition. In the present study, we clarified the mechanism of action of the drug and confirmed its effect by improving the drug.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前立腺癌 微小環境 癌細胞間作用 フラボノイド誘導体 抗癌剤耐性

## 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)中の CRPC への移行の機序は徐々に明らかになりつつある。前立腺癌細胞内で AR の発現の亢進、アンドロゲン感受性の亢進が認められ、これらに副腎性アンドロゲンがこの再燃に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。我々は、この機序の中で、副腎性アンドロゲンから DHT への生合成には前立腺癌組織内の微小環境として存在する間質細胞が重要な役割を果たしていることを報告した (Mizokami A. *Endocr-Relat Cancer* 16:1139-55 2009)。さらに細胞外マトリックスが前立腺癌細胞の遊走能や浸潤に影響を及ぼしているということも報告してきた (Shin M. *Prostate* 2013;73:1159-1170)。最近ではアンドロゲン受容体 (AR) の alternative splicing によりアンドロゲン結合領域が欠損した splicing variant (AR-V7) が出現し、アンドロゲンの有無に関わらず、AR-V7 が恒常的に活性化し、標的遺伝子も恒常的に活性化され、前立腺癌が再増殖するという新しい機序も報告されている。事実、AR-V7 の発現は予後を悪化させ、新規ホルモン療法薬(エンザルタミドやアピラテロン)に対する耐性化の機序の一つとして重要視されている (Emmanuel S. *New Eng J Med* 371:1028-34 2014)。また、ドセタキセルをホルモン療法開始時に併用することで予後を改善させることができるという CHARTED trial の結果から、HSPC 細胞のほかに、治療前から存在しているアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞 (AIPC) が clonal selection により ADT 中に徐々に増殖していくという可能性も間接的に示されている。このように CRPC の進行していく過程には HSPC 周囲の微小環境が様々な影響を及ぼしているため、細胞間のクロストークの制御は CRPC 治療を考える上で非常に重要である。しかし、微小環境内の細胞間のクロストークがどのように CRPC 進行と関わっているかはまだ不明な点が多い。一方、現在の前立腺癌、特に CRPC に対する治療は、エンザルタミド、アピラテロンなどの新規ホルモン療法薬を含めた HSPC に対する ADT と、AIPC に対する抗癌剤治療に大別される。ドセタキセルによる化学療法後にもまだ新規ホルモン療法薬が有効であることから、ドセタキセルは HSPC に対する効果が不十分と考えられる。現在、本邦では HSPC に対する治療を開始し、CRPC となってから化学療法を行っている。しかし、CHARTED trial の結果から、AIPC も早期に治療の対象とすべきであると思われる。そこで考えられるのが、HSPC と AIPC を同時に治療できるような薬剤の開発である。さらに AR-V7 の活性を抑制することのできる薬剤の開発も望まれる。我々は、CRPC 進行の予防・治療薬として柑橘類や漢方薬に比較的多く含まれる植物フラボノイドに焦点を当て、様々なフラボノイドの抗腫瘍効果や、AR 活性阻害作用を検討した結果、2'-hydroxyflavanone (2'-HF) が AIPC である PC-3 や DU145 細胞においても強い抗腫瘍活性を示すことや、HSPC である LNCaP 細胞の AR タンパク質量を減少させることによる AR 活性抑制作用を示すことを示した (Ofude M. *Anticancer Research* 33: 4453-61 2013)。しかし、治療薬として使用するためにはまだ高濃度と考えられ、効果は不十分と考えられる。

## 2. 研究の目的

### A) 前立腺癌組織内で重要な働きをしている微小環境でのクロストークの解析

前立腺癌が疑われる患者に対して針生検を行うが、その際に得られる検体から正常前立腺由来間質細胞 (PrSC)、明らかな前立腺癌患者から得られる前立腺癌由来間質細胞 (PCaSC)、そして、局所再燃により CRPC となったと考えられる間質細胞 (CRPCSC) の primary culture はすでに成功している。これらの間質細胞を用いて市販の前立腺癌細胞 LNCaP、PC-3、DU145 と共培養し、前立腺癌細胞の増殖、遊走能、浸潤などがどのように異なるかを観察する。また total RNA を抽出し、cDNA microarray を行うことで間質細胞の遺伝子発現プロファイルを作成する。これらの細胞間で遺伝子発現の異なる遺伝子を同定し、その遺伝子発現を制御することで、前立腺癌細胞にどのような変化を及ぼすかを確認する。

さらに、HSPC 細胞と AIPC 細胞間でのクロストークも存在していると考えられるため、両細胞を共培養することでどのような相互作用があるかを観察し、クロストークをつかさどるタンパク質や遺伝子の同定を試みる。

### B) 2'-HF 誘導体の合成と、それらの AR 活性阻害と抗腫瘍効果確認

2'-HF が既に AR の活性を抑制し、かつ HSPC と AIPC 細胞の増殖抑制をすることを既に確認しているため、研究分担者と協力し、様々な 2'-HF の誘導体を合成する。合成された誘導体を用いて AIPC 細胞に対する抗腫瘍効果が最も強く、AR に対する阻害活性の強いものを選択する。さらにその構造をもとに、さらに強力な阻害活性の強い誘導体を順次作成していく。また、できあがった誘導体が AR-V7 の活性を阻害することができるかどうかを確認する。同時に、2'-HF の誘導体による抗腫瘍効果、AR 活性阻害効果を示す機序を明らかにしていく。

## 3. 研究の方法

A) 正常前立腺、前立腺癌、CRPC 組織からの間質細胞と前立腺癌細胞を供培養し、増殖、浸潤などの違いを観察し、これらの間質細胞間での遺伝子発現プロファイルを作成する。これらのプロファイルから発現の異なる遺伝子を同定し、その機能解析を行う。さらに HSPC 細胞と AIPC 細胞とのクロストークを観察するために LNCaP 細胞と AIPC 細胞との供培養によるアンドロゲン応答性の変化、増殖の変化を観察し、クロストークの成立する機序を明らかにする。B) 複数の 2'-HF 誘導体を合成し、HSPC と AIPC 細胞に対する抗腫瘍効果、HSPC に対する AR や AR-V7 に対する抑制効果のある化合物も同定する。B) の成果で得られた化合物を間質細胞と前立腺癌細胞、あるいは HSPC と AIPC 細胞の供培養に添加し、抗腫瘍効果を確認する。最終的には SCID マウスに移植した前立腺癌細胞への効果も観察し、癌細胞の周囲の微小環境を含めた前立腺癌再燃に対する治療戦略を構築する。

B) 2'-HF が既に AR の活性を抑制し、かつ HSPC と AIPC 細胞の増殖抑制をすることを既に確認しているため、研究分担者と協力し、様々な 2'-HF の誘導体を合成する。合成された誘導体を用いて AIPC 細胞に対する抗腫瘍効果が最も強く、AR に対する阻害活性の強いものを選択する。さらにその構造をもとに、さらに強力な阻害活性の強い誘導体を順次作成していく。また、できあがった誘導体が AR-V7 の活性を阻害することができるかどうかを確認する。同時に、2'-HF の誘導体による抗腫瘍効果、AR 活性阻害効果を示す機序を明らかにしていく。

#### 4. 研究成果

A) 前立腺癌組織内で重要な働きをしている微小環境でのクロストークの解析

ホルモン感受性前立腺癌(HSPC)が去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)となる機序に癌組織内の微小環境が果たす役割は不明な点が多い。本研究では、正常間質細胞と HSPC 由来間質細胞、CRPC 由来間質細胞と癌細胞のクロストークの違いを明らかにした。また HSPC 細胞と CRPC 細胞間のクロストークも明らかにした。さらに、我々は最近アンドロゲンシグナルの阻害、AR splicing variant (AR-V7)の阻害、増殖阻害など様々な作用を持つフラボノイド誘導体の合成に成功した。本研究では、その作用機序を明らかにするとともに、薬剤の改良を進めてその効果を確認した。まず、HSPC 細胞と CRPC 細胞を共培養することによりどのような相互作用があるかを調査した。その結果、CRPC 細胞は間質細胞のようにアンドロゲン合成を促進し、HSPC 細胞の増殖や、アンドロゲン応答性を高めた。また逆に HSPC 細胞も CRPC 細胞に影響を与えていたことから、相互作用 crosstalk が存在して、前立腺癌の進行に関与する可能性があることが示唆された。(参考文献 1)

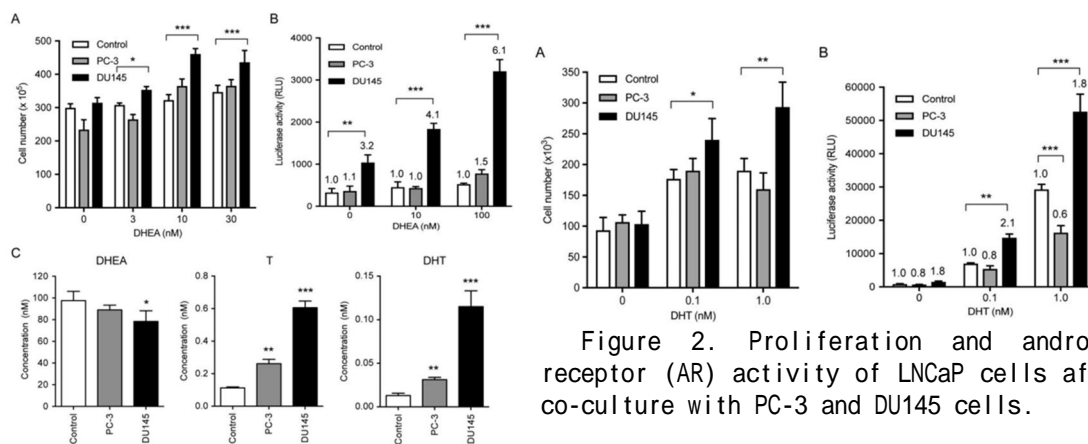


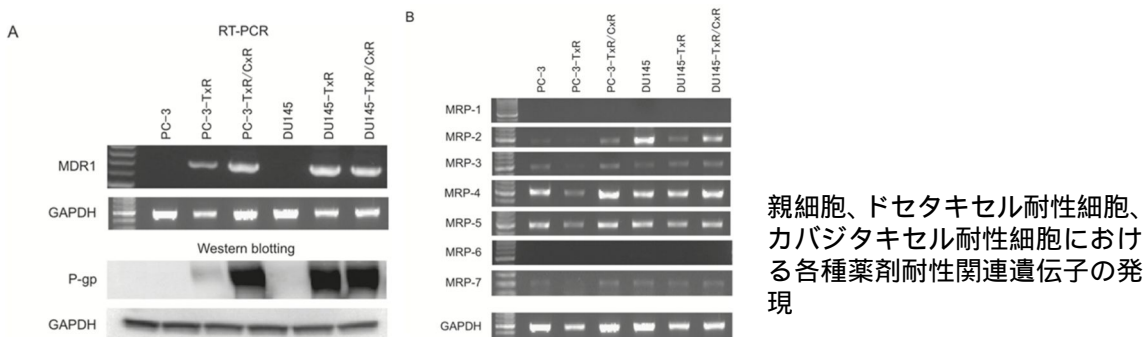
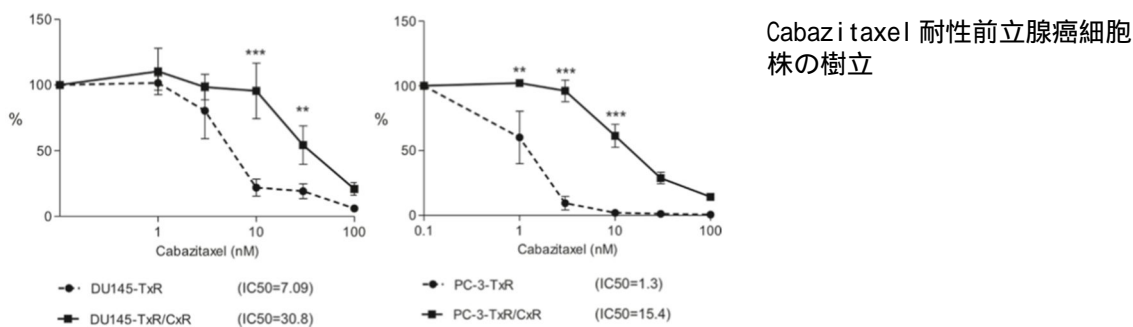
Figure 2. Proliferation and androgen receptor (AR) activity of LNCaP cells after co-culture with PC-3 and DU145 cells.

Figure 1 Proliferation and androgen receptor (AR) activity of LNCaP cells co-cultured with PC-3 and DU145 cells in the presence of (DHEA).

B) タキサン系抗癌剤耐性前立腺癌細胞株の樹立とその細胞株の特徴

去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) がカバジタキセル治療に抵抗性になると、患者は最善の支持療法を受けなければならなくなる。そのため、カバジタキセル抵抗性のメカニズムの解明と克服は、患者さんの予後を改善するための重要なテーマとなっている。そこで、カバジタキセル耐性 CRPC 細胞株の樹立を試み、その特徴を明らかにした。先に樹立した PC-3-TxR、DU145-TxR 細胞株から、PC-3-TxR/CxR、DU145-TxR/CxR の 2 つのカバジタキセル耐性細胞株を樹立した。PC-3-TxR/CxR 細胞は 11.8 倍、DU145-TxR/CxR 細胞は 4.4 倍、それぞれカバジタキセルに対して耐性化した。

TxR/CxR 細胞は、SCID マウスを用いて *in vivo* でカバジタキセル耐性を示した。多剤耐性遺伝子 1 (MDR1) の発現は、DU145 細胞と比較して DU145-TxR では増加していたが、DU145-TxR/CxR 細胞ではそれ以上増加していなかった。一方、PC-3-TxR では PC-3 細胞と比較して MDR1 遺伝子の発現がアップレギュレートされ、PC-3-TxR/CxR では PC-3-TxR 細胞と比較してさらにアップレギュレートされていた。PC-3-TxR 細胞と PC-3-TxR/CxR 細胞、または DU145-TxR 細胞と DU145-TxR/CxR 細胞の間で cDNA マイクロアレイを比較したところ、多くの遺伝子がアップレギュレートまたはダウンレギュレートされていることが明らかになった。最後に、MDR1 のノックダウンにより、PC-3-TxR/CxR 細胞だけでなく、DU145-TxR/CxR 細胞においてもカバジタキセルに対する感受性が回復した。以上のことから、MDR1 遺伝子の制御はカバジタキセル耐性の克服に重要であることが明らかになった。(参考文献 2)



C) 2'-HF 誘導体の合成と、それらの AR 活性阻害と抗腫瘍効果確認  
 2'-hydroxyflavanone の 30 種類を超える様々な誘導体を合成し、その誘導体の抗腫瘍効果やアンドロゲン感受性阻害、AR-V7 活性阻害を調査した。その結果、2 種類の誘導体が低濃度でも効果を発揮することを確認した。  
 さらに 2 種類の誘導体の *in vivo* での効果を確認した。またその作用機序を明らかにするために、アポトーシスの誘導の有無、cell cycle への影響も調べた。  
 それらのうち 2 種類のもっとも *in vitro* で抗腫瘍効果を有する化合物 16MS7F1924 と YS-71 を用いて様々な研究を行った。この 2 剤は *in vivo* においても皮下に移植した PC-3, DU145 の増殖を腹腔内投与で抑制した。次に同様の実験を経口強制法で投与したところ、YS-71 は抗腫瘍効果を示さなかったのに対して、16MS7F1924 は抗腫瘍効果を示した。つまり、16MS7F1924 は腸管から吸収されて効果を発揮することが示された。次にその作用機序として、Anexin を用いて Apoptosis の関与を調べたところ、16MS7F1924 は Apoptosis を誘導していた。16MS7F1924 による Apoptosis 誘導の機序として、LNCaP, DU145, PC-3 では 16MS7F1924 を加えると時間依存的に CASPASE3・PARP のリン酸化を亢進した。また *in vitro* においてドセタキセル、カバジタキセル耐性株に対する抗腫瘍効果を確認したところ、親株と同程度の抗腫瘍効果を確認し、16MS7F1924 は DU145 TxR, TxR/CxR において濃度依存的に CASPASE3・PARP のリン酸化を亢進し、Bcl-xL の発現を抑制した。  
 さらに Akt のリン酸化を抑制した。これらの結果から、16MS7F1924 は前立腺癌、タキサン剤耐性前立腺癌に対する有力な薬剤となり得ると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takezawa Y, Izumi K, Machioka K, Iwamoto H, Naito R, Makino T, Kadomoto S, Natsagdorj A, Kadono Y, Keller ET, Zhang J, Mizokami A.	4. 巻 38
2. 論文標題 Crosstalk Between Androgen-sensitive and Androgen-insensitive Prostate Cancer Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer research	6. 最初と最後の頁 2045-2055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Machioka K, Izumi K, Kadono Y, Iwamoto H, Naito R, Makino T, Kadomoto S, Natsagdorj A, Keller ET, Zhang J, Mizokami A	4. 巻 9
2. 論文標題 Establishment and characterization of two cabazitaxel-resistant prostate cancer cell lines.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 16185-16196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.24609	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 YUTA TAKEZAWA, KOUJI IZUMI, KAZUAKI MACHIOKA, HIROAKI IWAMOTO, RENATO NAITO, TOMOYUKI MAKINO, SUGURU KADOMOTO, ARIUNBOLD NATSAGDORJ, YOSHIFUMI KADONO, EVAN T. KELLER, JIAN ZHANG and ATSUSHI MIZOKAMI	4. 巻 38
2. 論文標題 Crosstalk Between Androgen-Sensitive and Androgen-Insensitive Prostate Cancer Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2045-2055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kazuaki Machioka, Kouji Izumi, Yoshifumi Kadono, Hiroaki Iwamoto, Renato Naito, Tomoyuki Makino, Suguru Kadomoto, Ariunbold Natsagdorj, Evan T. Keller, Jian Zhang, Atsushi Mizokami	4. 巻 9
2. 論文標題 Establishment and characterization of two cabazitaxel-resistant prostate cancer cell lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 16185-16196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	後藤 享子  (GOTO Kyoko)  (50180245)	金沢大学・薬学系・准教授   (13301)	
研究分担者	泉 浩二  (IZUMI Kouji)  (80646787)	金沢大学・附属病院・講師   (13301)	