慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	細胞周期調節に着目した、去勢抵抗性前立腺癌の進展プロセス解明・新規治療戦略の試み
Sub Title	New therapeutic strategy for treatment of CRPC targeting cell cycle regulation.
Author	江崎, 太佑(Ezaki, Taisuke)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	近年, 去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)ではアンドロゲン・アンドロゲンレセプター軸(AR axis)以外の遺伝子にも変異が認められることが報告され, CRPC治療の新たなtargetとして期待されている。本研究では細胞周期調節因子であるCDK4に着目し, CDK4阻害剤による抗腫瘍効果がホルモン感受性やドセタキセル抵抗性に関係なく発揮されることを明らかにした。CDK4阻害剤投与下でもAR発現は抑制されず, CRPC進展プロセスではAR axis以外のpathwayに変化が生じ, CDK4阻害剤への感受性が維持されている可能性を示した。 Although androgen/androgen receptor axis plays a key role in progression of castration-resistant prostate cancer (CRPC), mutation or alteration involving other signaling pathways are also enriched in CRPC. We focused on CDK4, cell cycle regulator, and investigated the therapeutic effect of CDK4 inhibitor, using the human prostate cancer cell line, the human CRPC cell line, and the docetaxel-resistant CRPC cell line. It was found that anti-cancer effect of CDK4 inhibitor was exhibited regardless of the sensitivity to hormone or docetaxel of the cell lines. We also showed that AR expression was not affected by CDK4 inhibitor. These results implied that alteration of cell cycle control plays some important role in CRPC progression and CDK4 inhibitor might be effective in the treatment of CRPC.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2016～2017 課題番号：16K20161 研究分野：前立腺癌
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K20161seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　６　月　２０　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2016～2017
課題番号：　１６Ｋ２０１６１

研究課題名（和文）細胞周期調節に着目した、去勢抵抗性前立腺癌の進展プロセス解明・新規治療戦略の試み

研究課題名（英文）New therapeutic strategy for treatment of CRPC targeting cell cycle regulation.

研究代表者

江崎　太佑（Ezaki, Taisuke）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・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）：近年、去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)ではアンドロゲン・アンドロゲンレセプター軸（AR axis）以外の遺伝子にも変異が認められることが報告され、CRPC治療の新たなtargetとして期待されている。本研究では細胞周期調節因子であるCDK4に着目し、CDK4阻害剤による抗腫瘍効果がホルモン感受性やドセタキセル抵抗性に関係なく発揮されることを明らかにした。CDK4阻害剤投与下でもAR発現は抑制されず、CRPC進展プロセスではAR axis以外のpathwayに変化が生じ、CDK4阻害剤への感受性が維持されている可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Although androgen / androgen receptor axis plays a key role in progression of castration-resistant prostate cancer (CRPC), mutation or alteration involving other signaling pathways are also enriched in CRPC. We focused on CDK4, cell cycle regulator, and investigated the therapeutic effect of CDK4 inhibitor, using the human prostate cancer cell line, the human CRPC cell line, and the docetaxel-resistant CRPC cell line. It was found that anti-cancer effect of CDK4 inhibitor was exhibited regardless of the sensitivity to hormone or docetaxel of the cell lines. We also showed that AR expression was not affected by CDK4 inhibitor. These results implied that alteration of cell cycle control plays some important role in CRPC progression and CDK4 inhibitor might be effective in the treatment of CRPC.

研究分野：　前立腺癌

キーワード：　前立腺癌　去勢抵抗性前立腺癌　CDK4

１．研究開始当初の背景

前立腺癌はアンドロゲン依存性癌であり、アンドロゲン除去療法(androgen deprivation therapy：ADT)を中心としたホルモン療法が広く施行されるが、進行症例を中心に、去勢抵抗性前立腺癌(castration resistant prostate cancer：CRPC)への進展が問題となる。近年では、CRPC への進展は、アンドロゲン・アンドロゲンレセプター軸(AR axis)に依存しており、去勢域の血清値においてもなお残存する微小な血中アンドロゲンや組織内におけるアンドロゲン産生に支持されているのではないかと考えられている。従来 CRPC 治療の第１選択薬であったドセタキセルはタキサン系抗癌剤であり、微小管安定化・脱重合阻害の作用機序は一見 AR axis とは無関係に思われるが、新規ホルモン療法薬との間の交叉耐性が指摘されており、これは、ドセタキセルでさえも AR axis を介することで抗腫瘍効果を発揮している可能性があることを示唆している。このように、AR axis は CRPC の進展における中心的な役割を担っており、現在 CRPC 治療薬のほとんどが AR axis を target としている。しかしながら近年、CRPC の遺伝子解析において、AR pathway だけでなく、WNT pathway・PI3K pathway・DNA 修復・細胞周期調節等の遺伝子にも変異が認められることが報告されてきており(Robinson et al, Cell, 2015)、AR pathway 以外にこれらの pathway も CRPC 治療の target となる潜在性を持つと考えられるようになってきた。

当教室ではこれらの pathway の中で、細胞周期調節にかかわる因子である Cyclin-dependent kinases 4(CDK4)に着目した。CDK4 は Cyclin D と複合体を形成し、Rb をリン酸化することで、細胞周期の G1 期から S 期への調節にかかわる因子であり、CDK4 阻害剤の作用は、細胞周期を G1 期で停止させる(G1 arrest)ことである(Dickson, Clin Cancer Res, 2014)。代表的な CDK4 阻害剤である palbociclib (Pfizer)では、2011 年以降 CD4-amplified lyposarcoma や mantle cell lymphoma (Cyclin D1 の過剰発現で知られている)、乳癌に対する有効性が phase Ⅰ・phase Ⅱで実証され(Finn et al, Lancet, 2015)、注目を集めている。前立腺癌においても、*in vitro, in vivo* で palbociclib が種々のホルモン感受性前立腺癌細胞株・CRPC 株の増殖を抑制することが示されている。さらに、CDK4 阻害剤使用下では、ホルモン感受性株・CRPC 株のいずれにおいても、AR target gene の発現(mRNA)が低下せず、その抗腫瘍効果は AR axis と無関係の機序で発揮される可能性が示唆されている(Comstock et al, Oncogene, 2013)。

当教室では前立腺癌細胞株 LNCaP をアンドロゲン除去下で培養継続し、独自に CRPC 株：LNK06 を樹立した。また、前立腺癌細胞株 C4-2 を同じくアンドロゲン除去下で培養継続し、別種の CRPC 株：C4-2AT6 を樹立した(Kosaka et al. Prostate, 2010)。このうち 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-1α・Ets-1 発現上昇に伴う血管新生亢進を有し、また、ドセタキセルをはじめとする各種化学療法に対する感受性低下を示し(Kosaka et al, J Urol, 2011) 、CYP17 阻害剤や第 2 世代抗アンドロゲン剤などの新規 CRPC 治療薬に対する耐性も有している。すなわち、LNCaP ならびに当教室で樹立したこれらの cell line(LNK06・C4-2AT6)は同様に ATEN 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・去勢抵抗性・去勢抵抗性ドセタキセル抵抗性と異なった特徴を有しており、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ている。当教室では、こうした独自に樹立した細胞株等を使用して、テストステロン・DHT は 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アンドロゲン生合成系の抑制部位(CYP17 or 5α-reductase)によって、得られる結果は必ずしも一致していないことを示す(Kosaka et al, Sci Rep, 2013)など、前立腺癌の進展プロセスに沿いながら、一貫して CRPC の新規治療戦略を模索してきた。

２．研究の目的

CDK4 阻害剤は AR axis とは独立した pathway に作用する抗腫瘍のメカニズムを有する可能性がある。たとえば膀胱癌においては、CDK4 阻害剤において、Rb のリン酸化が抑制されるのみでなく、Rb と pRb の総量自体も減少していることが分かっている(Sathe et al, J Urol, 2015)。上記の前立腺癌各細胞株における、CDK4 阻害剤投与前後での細胞周期調節因子の変化等を解析し、アンドロゲン除去環境で進展していった前立腺癌細胞に、AR axis と独立にどのような変化が生じたのかを明らかにし、アンドロゲン除去環境が前立腺癌に与えた影響・進展プロセスを明らかにすることを目的とした。さらに CRPC における CDK4 阻害剤の単剤あるいは他剤との併用における新規治療戦略の確立を目標とした。特に 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と考えた。

３．研究の方法

(1) *In vitro* での、前立腺癌細胞株 LNCaP・LNK06・C4-2AT6 に対する、CDK4 阻害剤・CYP17 阻害剤・第 2 世代抗アンドロゲン剤・アンドロゲンを使用した際の抗腫瘍効果の検討

予備的検討として、LNCaP・LNK06・C4-2AT6

に対する CYP17 阻害剤(アビラテロン)・第 2 世代抗アンドロゲン剤(ARN-509)を使用した際の殺細胞効果はすでに検討している。LNCaP・LNKO6 に対しては両剤ともに抗腫瘍効果を示すのに対して、C4-2AT6 では良剤とも効果は認めなかった。そこで、低濃度の LY2835219 (CDK4/6 阻害剤, Eli Lilly)を CYP17 阻害剤・第 2 世代抗アンドロゲン剤・アンドロゲンと併用し、単剤で使用した場合との抗腫瘍効果の相違を検討する。さらに、別種の CDK4 阻害剤である LEE011(Novartis)においても、各種細胞株に対する単剤・他剤との併用での抗腫瘍効果を検討する。また、アンドロゲンは進行 CRPC 細胞において抗腫瘍効果を発揮することが知られており、我々も予備的検討にて、前立腺癌の進展プロセスを模倣している LNCaP・LNKO6・C4-2AT6 の 3 種の細胞株が、DHT に対してそれぞれ異なった反応性を示すことを確認している。この、進行 CRPC 細胞に対するアンドロゲンの抗腫瘍効果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(Kokontis et al, PLoS One, 2014)、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考えられる。CDK4 阻害剤も、これらの因子同様に細胞周期調節にかかわる CDK4 という酵素を標的としている。CDK4 阻害剤とアンドロゲン(DHT)の併用効果も検討する。抗腫瘍効果の評価には WST assay を用いる。

(2)前立腺癌細胞株 LNCaP・LNKO6・C4-2AT6 における CDK4 阻害剤を使用した際の、AR axis 外の pathway におけるシグナル伝達の評価

CDK4 阻害剤を単剤・他剤と併用で用いた際、細胞周期調節の pathway に変化が生じると考えられる。CDK4 阻害剤(LY2835219・LEE011)単剤および他剤との併用下で細胞内タンパクを抽出し、Cyclin D1 や Rb・pRb の発現を western blot を用いて比較検討し、併用における細胞周期抑制作用の変化を検討する。また、CDK2・CyclineA・Skp2・p53・p21・p27 等の、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確認し、評価を行う。これらの評価を各種前立腺癌細胞株で行うことで、前立腺癌の進展プロセスに沿いながらこれらの因子の発現量の変遷を確認し、アンドロゲン除去環境が AR axis 以外の pathway に与える影響をあぶりだして、CRPC への進展プロセスの一端を解明する。

(3) 前立腺癌細胞株 LNCaP・LNKO6・C4-2AT6 に対して、CDK4 阻害剤使用下、および CDK4 阻害剤と CYP17 阻害剤・第 2 世代抗アンドロゲン剤・アンドロゲン併用下での AR axis の検討

LNCaP・LNKO6・C4-2AT6 に対して LY2835219・LEE011 を使用した際の AR axis の変容も、同様に検討する。治療戦略の観点からは、CDK4 阻害剤が AR axis に与える影響の有無とその実態を明らかにすることも重要である。各種薬剤を単剤・併用で使用した場合の AR 発現状況を、FACS で定量的に評価する。CYP17 阻害剤・第 2 世代抗アンドロゲン剤の単剤使用下と CDK4 阻害剤との併用下での AR axis におけるステロイド生成系の変化を検出するため、それぞれの条件下で、安定同位体 13C で修飾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て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)で測定する。17βHSD 活性の指標として 13C-Adion/13C-T 比を算出し、さらに 13C-[2,3,4]-dihydrotestosterone:13C-DTH も測定して、13C-Adion・ 13C-T・ 13C-DHT の変化率を比較する。

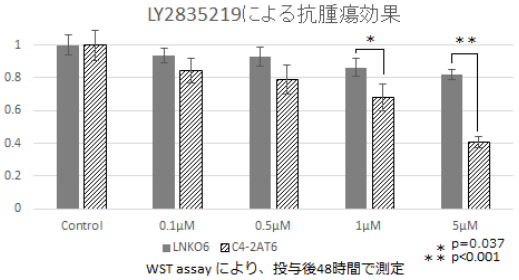
(4)*In vivo*(皮下腫瘍マウスモデル)での、CDK4 阻害剤の抗腫瘍効果の検討

castration を施行した 6〜8 週齢の雄の nude BALB/C mice に 1×10^6 個の細胞を背部に皮下注射し、難治性去勢抵抗性前立腺癌細胞株 C4-2AT6 を用いた xenograft model を作成する。なおこの方法で、約 90%以上の腫瘍形成をすでに確認している。それまでの検討から、LY2835219・LEE011 のうちでより前立腺癌治療に適した CDK4 阻害剤を選択し、下記の通り 5 群に分ける。①コントロール、②CDK4 阻害剤投与群、③CDK4 阻害剤＋アビラテロン投与群、④CDK4 阻害剤＋ARN-509 投与群、⑤CDK4 阻害剤＋DHT 投与群。

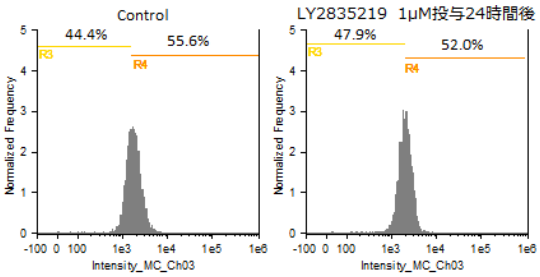
体重および腫瘍体積についてプロットし、5 群間での腫瘍増大速度を比較する。皮下腫瘍の採取を行い、タンパクを抽出する。western blot・免疫染色を行い、それぞれの腫瘍における Cyclin D1 や Rb・pRb の発現等を検討し、相乗効果の分子メカニズムを解析する。また、濃度や投与タイミングについて検討を追加し、相乗効果の分子基盤を追及する。

４．研究成果

各種細胞株に対して LY2835219 を投与した結果、ドセタキセル抵抗性株 C4-2AT6 は CDK4/6 阻害剤である LY2835219 に対して強い感受性を有し、ホルモン感受性株の LNCaP やホルモン非感受性ドセタキセル感受性株 LNKO6 等の、より primary な前立腺癌細胞株に比して、むしろ反応性が良好であることが明らかになった(下図)。CRPC では、一つの治



療薬に耐性ができると、他の薬剤にも交叉耐性が生じるが、C4-2AT6 がドセタキセルやアビラテロンなどの他の CRPC 治療薬には抵抗性を持っているにも関わらず、CDK4 阻害剤に最も高い感受性を示すという点は、注目に値すると考えた。この現象の理論的解明の試みとして、C4-2AT6 が他の cell line に比べて AR が増幅していることに着目し、LY2835219 は C4-2AT6 で AR の発現を抑制しているのではないかと考え、FACS や western blotting による解析を行ったところ、LY2835219 投与下でも AR 発現は抑制されていないことが明らかとなった(下図)。結果として、CDK4 阻害剤の感受性が高まるような変化が、CRPC 進展プロセスの過程で AR axis とは別の pathway に生じている可能性が示唆された。



C4-2AT6にLY2835219を投与したときのARの発現を、FACSで解析した。
ARの発現は、LY2835219の投与により抑制されなかった。

つづいて mRNA のマイクロアレイ解析を行い、LY2835219 投与下では、LNCaP・LNKO6・C4-2AT6 のいずれの細胞株でも E2F・CyclinA・CyclinE・CDK2 などの G1→S へ駆動する因子の発現の低下、CDK1・CyclinB・FOXM1・PLK1 などの G2・M 期に関わる因子の発現低下がみられ、一方で AR や NKX3.1・TMPRSS2・KLK3 などの AR の下流の因子の発現にほとんど変化がないことを確認した。

今後の研究において、LY2835219 投与前後での細胞周期調節因子の変化をさらに解析し、なぜ最も進行した CRPC 株で CDK4 阻害剤が有効だったのかを解明していきたい。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

(1) Hongo H, Kosaka T, Mizuno R, Ezaki T, Matsumoto K, Morita S, Shinoda K, Shinojima T, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M.; Should We Try Antiandrogen Withdrawal in Castration-Resistant Prostate Cancer Patients? Insights From a Retrospective Study. Clinical Genitourinary Cancer. 査読あり. 14(6):e569-e573; 2016
DOI:

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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（EZAKI, Taisuke）
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