

学位論文要約

Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

氏 名 : 菱 田 勢 始
Full Name

学位論文題目 : Proteomic analysis of extracellular vesicles identified PI3K
Thesis Title pathway as a potential therapeutic target for cabazitaxel-resistant prostate cancer

学位論文要約 :
Summary of Thesis

【緒言と目的】

前立腺癌は男性では罹患率が高く、特に進行性前立腺癌では治癒が困難であることから、新しい治療法が模索されている。進行性前立腺癌では化学療法としてドセタキセル (DOC) に引き続きカバジタキセル (CBZ) が使われるが、早晚耐性化しその予後は極めて悪い。そのため CBZ 耐性前立腺癌に対する新しい治療法を模索することは前立腺癌治療において必須である。

細胞外小胞 (EV) は細胞から分泌される膜小胞であり、分泌元の細胞由来のタンパクや核酸を含むため癌研究において新しいバイオマーカーの探索に利用されている。本研究では CBZ 耐性前立腺癌患者と CBZ 耐性前立腺癌細胞株由来の EV を解析することにより、CBZ 耐性前立腺癌の治療ターゲットを探索することを目的とした。

【対象と方法】

最初にドセタキセル耐性前立腺癌 (22Rv1DR) に、段階的にカバジタキセル濃度 (0.1-20nM) を増加させて暴露することによりカバジタキセル耐性前立腺癌細胞株 (22Rv1CR) を樹立した。EV を採取するために、磁性ビーズに T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-containing protein 4 (Tim4) を結合させ、22Rv1DR および 22Rv1CR の細胞上清から EV を採取した。EV 採取の確認は抗 CD9、CD63 抗体を使用した western blot により行った。同様に 2 名の DOC 耐性前立腺癌患者 (CBZ 投与開始前) と CBZ 耐性獲得後の血清から EV を採取した。細胞株、患者血清それぞれの EV を Nano liquid chromatography tandem mass spectrometry を用いてプロテオーム解析を行った。得られたタンパク発現はネットワーク解析 (KeyMolnet) を行い CBZ 耐性に関連する因子 (phosphatidylinositol - 3 - kinase pathway) を同定した。PI3K inhibitor (ZSTK474) の 22Rv1CR に対する抗腫瘍効果は WST-1 アッセイを用いて行った。22Rv1DR と 22Rv1CR における PI3K pathway の解析は western blot によって行った。

【結果】

22Rv1 前立腺癌細胞株から樹立した DOC 耐性株 22Rv1DR と CBZ 耐性株 22Rv1CR の DOC、CBZ のそれぞれの IC50 は 129.1nM、8.24nM と 200nM 以上と 18.8nM であった。Tim4 結合磁性ビーズにより前立腺癌細胞上清、コントロール及び前立腺癌患者群の血清から採取したタンパクは CD9、63 を発現しており、EV 分画が含まれていることが確認できた。

細胞上清、患者血清から Tim4 結合磁性ビーズにより採取した EV のプロテオーム解析を行ったところ、22Rv1DR 及び 22Rv1CR からそれぞれ 917 と 871 のタンパクが同定できた。Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) の S plot により、信頼性が高くかつ 22Rv1CR で発現上昇を認めたタンパクは 77 個であった。2 名の患者における CBZ 耐性獲得前後のタンパク同定数はそれぞれ (耐性獲得前 289、耐性獲得後 313)、(耐性獲得前 326、耐性獲得後 327) であった。その両方で耐性獲得後に上昇しているタンパクは 61 個であった。細胞株と患者で共通しているタンパクは fructose - bisphosphate aldolase (ALDOA),

CD63 antigen (CD63), CD151 antigen (CD151), cytosolic nonspecific dipeptidase (CNDP2), myosin regulatory light polypeptide 9 (MYL9), and peroxiredoxin-6 (PRDX6)であった。

CBZ 耐性前立腺癌に対する治療ターゲットを同定するために 22Rv1CR と CBZ 耐性血清において、DOC 耐性より 1.5 倍以上上昇しているタンパク群 (細胞上清 281 個、血清 124 個) を抽出してネットワーク解析を行い、その結果と MEDLINE の検索から PI3K pathway が有望であると考えられた。そのため PI3K inhibitor (ZSTK474) を用いて、22Rv1CR への抗腫瘍効果を確認したところ、CBZ 併用の有無にかかわらず ZSTK474 の有意な抗腫瘍効果を認めた。さらに PI3K とそれを阻害する PTEN の活性を確認したところ 22Rv1CR では PI3K のリン酸化、PTEN の脱リン酸化をみとめたため、この結果からも CBZ 耐性前立腺癌における PI3K pathway の重要性が確認できた。

【結論】

CBZ 耐性前立腺癌細胞株上清及び患者血清から Tim4 磁気ビーズを用いて採取した EV のプロテオーム解析が可能であり、その結果 PI3K pathway が CBZ 耐性前立腺癌において有望な治療ターゲットになり得ることを見出した。