

氏名（本籍）	菱田 勢始	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1225号	
学位授与日付	令和5年3月25日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Proteomic analysis of extracellular vesicles identified PI3K pathway as a potential therapeutic target for cabazitaxel-resistant prostate cancer	
審査委員	（主査）教授	清水 雅仁
	（副査）教授	小川 武則                      教授 紙谷 義孝

## 論文内容の要旨

### 【緒言と目的】

前立腺癌は罹患率が高い悪性疾患である。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。進行性前立腺癌の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、早晚耐性化するため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開発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（extracellular vesicle：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として注目されている。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】

DOC耐性前立腺癌（22Rv1DR）に、段階的にCBZ（濃度：0.1-20nM）を増加させて暴露することによりCBZ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および抗CD63抗体を使用し、Western blot法により行った。同様に2名のDOC耐性前立腺癌患者のCBZ投与開始前とCBZ耐性獲得後の血清からEVを採取した。細胞株および患者血清のEVに関して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のデータに関してネットワーク解析（KeyMolnet）を行い、CBZ耐性に関連する分子・pathwayを抽出した。22Rv1CRに対するphosphatidylinositol-3-kinase（PI3K）inhibitor（ZSTK474）とCBZの抗腫瘍効果を、WST-1アッセイを用いて評価した。22Rv1DRと22Rv1CRにおけるPI3K pathway（リン酸化および非リン酸化PI3KおよびPTEN）の発現について、Western blot法にて検討した。

### 【結果】

DOC耐性株22Rv1DRとCBZ耐性株22Rv1CRのDOCおよびCBZに対する $IC_{50}$ は、129.1nMおよび8.24nMと、200nMおよび18.8nMであった。Tim4結合磁性ビーズを用いて、前立腺癌細胞培養上清とコントロールおよび前立腺癌患者群の血清から採取したタンパクはCD9とCD63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。

採取したEVのプロテオーム解析を行い、22Rv1DRおよび22Rv1CRからそれぞれ917個および871個のタンパクを同定した。続いてOrthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis（OPLS-

DA) の S plot 検定を行い、信頼性が高くかつ 22Rv1CR で特異的に発現上昇を認めたタンパクを 77 個抽出した。2 名の患者における CBZ 耐性獲得前後の同定タンパク数は、それぞれ耐性獲得前が 289 個および 326 個、耐性獲得後が 313 個および 327 個であり、両サンプルで耐性獲得後に上昇していた共通タンパクは 61 個であった。また 22Rv1CR 細胞株と CBZ 耐性前立腺癌患者の EV で共通して上昇していたタンパクは、fructose - bisphosphate aldolase (ALDOA), CD63 antigen (CD63), CD151 antigen (CD151), cytosolic nonspecific dipeptidase (CNDP2), myosin regulatory light polypeptide 9 (MYL9), 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 耐性患者血清において、DOC 耐性時より 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）を抽出しネットワーク解析と MEDLINE 検索を施行したところ、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すると、CBZ 併用の有無に関わらず有意な抗腫瘍効果を確認した。さらに PI3K とそれを阻害する PTEN の活性を確認すると、22Rv1CR では PI3K のリン酸化と PTEN の脱リン酸化を認めたため、CBZ 耐性化前立腺癌における PI3K pathway の重要性が確認できた。

#### 【考察】

進行前立腺癌診療の大きな課題である CBZ 耐性の分子機構を解明するために、CBZ 耐性の前立腺癌細胞株と患者由来の EV を解析したところ、ALDOA, CD63, CD151, CNDP2, MYL9, PRDX6 の 6 分子が同定された。ALDOA と PRDX6 は、幾つかの癌腫の進行や化学療法抵抗性に関与することが報告されているが、いずれの分子についても前立腺癌の CBZ 耐性化に果たす役割は明らかにされていない。

一方、これらの分子のうち、ALDOA は PI3K pathway によって制御されていること、また CD151, CNDP2, PRDX6 の発現は PI3K pathway の活性化と相関し、癌の進行や上皮間葉転換を促進することが報告されている。また本研究にて、PI3K inhibitor が 22Rv1CR に対して抗腫瘍効果を発揮することも確認されたが、これらの研究結果は、PI3K pathway の活性化が前立腺癌の CBZ 耐性獲得の過程において重要な役割を果たしている可能性、さらには PI3K 阻害剤が CBZ 耐性前立腺癌に対する新しい治療オプションになる可能性を示唆するものである。

#### 【結論】

CBZ 耐性前立腺癌細胞株上清および患者血清から採取した EV のプロテオーム解析より、PI3K pathway が CBZ 耐性前立腺癌の有望な治療ターゲットになり得ることを見出した。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 菱田 勢始は、カバジタキセル耐性前立腺癌細胞株の上清と患者血清から細胞外小胞を採取してプロテオーム解析とネットワーク解析を行い、同耐性獲得機序に PI3K pathway が関与していることを明らかにした。本研究成果は、治療抵抗性前立腺癌に対する新規治療戦略の開発につながるものであり、泌尿器科学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

Seiji Hishida, Kyojiro Kawakami, Yasunori Fujita, Taku Kato, Manabu Takai, Koji Iinuma, Keita Nakane, Tomohiro Tsuchiya, Takuya Koie, Yuri Miura, Masafumi Ito, Kosuke Mizutani : Proteomic analysis of extracellular vesicles identified PI3K pathway as a potential therapeutic target for cabazitaxel-resistant prostate cancer  
The Prostate. 81: 592-602 (2021) . doi : 10.1002/pros.24138