

氏名（本籍）	高井学	（兵庫県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1231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	Kartogenin Inhibits Prostate Cancer Cell Growth Through Smad2 Activation and Decreases Androgen Receptor Nuclear Localization	
審査委員	（主査）教授	清水 雅仁
	（副査）教授	下畑 享良 教授 前川 洋一

論文内容の要旨

【目的、緒言】

前立腺癌はアンドロゲン依存性に増殖するため、進行性前立腺癌の治療においてアンドロゲンレセプター（AR）阻害剤を含めたアンドロゲン除去療法は重要である。しかしながら進行性前立腺癌の多くは、早晚アンドロゲン非依存性増殖をきたして去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）となり、患者の予後を低下させる。近年では第2世代AR阻害剤（SG-ARIs）が使用されるようになったが、CRPCは様々な機序でSG-ARIsにも抵抗性となるため、新しい治療ターゲットの模索が必要である。これらのターゲットの一つがTGF- β シグナル伝達経路であるが、TGF- β の作用は多岐にわたり細胞の癌化の段階によってその役割は異なることが知られている。そのため、アンドロゲン依存性から非依存性にダイナミックに変化する前立腺癌において、TGF- β シグナルの伝達経路は治療ターゲットとなり得ると考えた。

間葉系幹細胞を軟骨細胞へ分化誘導物質するカルトゲニンは、Smad family をリン酸化し、TGF- β /Smad 経路を調節する機能を有することが報告されている。本研究では、前立腺癌細胞に対するカルトゲニンの抗腫瘍効果とそのメカニズムについて検討した。

【対象と方法】

使用細胞：AR発現アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株（LNCaP）、AR発現アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株（22Rv1）、AR非発現アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株（PC-3）を使用した。

細胞生存アッセイ：細胞を96-wellプレートに播種し、薬剤処理後にWST-1 assayで評価した。

Western blotting：薬剤処理後の細胞をRIPA bufferで回収し、SDS-PAGEおよびPVDF membraneへの転写後に抗原抗体反応を行った。核と細胞質の分離はNE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagentsを用いた。

【結果】

- ① カルトゲニンはLNCaPと22Rv1の増殖を有意に阻害したが、PC-3の増殖は阻害しなかった。一方、カルトゲニンによる細胞増殖抑制効果は第一世代のAR阻害剤であるビカルタミドとの併用では認められなかった。
- ② カルトゲニンはserum-free培養条件下のLNCaP細胞において、ARの核内移行を阻害した。またアンドロゲン刺激で転写が開始されるProstate specific antigen（PSA）の発現も抑制した。
- ③ カルトゲニンは一時的にSmad2をリン酸化したが、Smad3やAktはリン酸化しなかった。
- ④ TGF- β とカルトゲニンの併用によって、Smad2のリン酸化が増加する傾向を認めた。増殖抑制効果についての併用効果は認めなかった。
- ⑤ カルトゲニンは、CRPCの治療に使われるドセタキセルに耐性の前立腺癌細胞株（22Rv1DR）に対

しても増殖抑制効果を認めた。

【考察】

前立腺癌を含めたすべての癌腫において、カルトゲニンの抗腫瘍効果に関する報告はなく、本研究が初めての報告となる。カルトゲニンは、アンドロゲン依存性の有無に関わらず AR を発現する前立腺癌細胞において抗腫瘍効果を認めたため、AR を軸としたシグナル経路に関連する新しい腫瘍細胞増殖抑制の作用機序を有する可能性が予測された。AR へのアンドロゲンの結合を競合的に阻害するピカルタミドとの併用効果を認めなかったことから、カルトゲニンの作用はアンドロゲンと AR の結合より下流であることが予測された。カルトゲニンは AR の核内移行を抑制し、アンドロゲン刺激で転写が開始される PSA の発現も低下させたことから、AR のシグナル経路を抑制している可能性が示唆された。

これまでの研究において、カルトゲニンは TGF- β /Smad 経路の調整に関与していることが報告されているが、本研究でもカルトゲニン投与により Smad2 のリン酸化が認められた。さらに TGF- β 1 の前処理によってカルトゲニンによる Smad2 リン酸化の増加傾向が示されたことは、カルトゲニンが Smad2 活性化に関与している可能性の傍証となる。以上から、カルトゲニンは Smad2 を介して AR シグナル経路を阻害し、アンドロゲン非依存性前立腺癌にも抗腫瘍効果を発揮すると考えられた。さらに臨床では、CRPC に対する治療法としてタキサン系抗癌剤（ドセタキセル及びカバジタキセル）が使用されているが、カルトゲニンは我々が作成したドセタキセル耐性前立腺癌細胞株（22Rv1DR）に対しても抗腫瘍効果を示したことから、CRPC を含む様々な前立腺癌に対して有望な治療薬候補であることが示された。

【結論】

カルトゲニンは、AR の核内移行の抑制や Smad2 のリン酸化を介して、アンドロゲンシグナル経路を抑制する可能性がある。同物質は、アンドロゲン依存性から去勢抵抗性および化学療法抵抗性も含めた、すべての治療ステージの前立腺癌に対する新規治療薬の候補となる。

論文審査の結果の要旨

申請者 高井 学は、間葉系幹細胞の分化誘導物質であるカルトゲニンの前立腺癌細胞に対する抗腫瘍効果について検討した。その結果、カルトゲニンはアンドロゲンレセプターの核内移行抑制と Smad2 のリン酸化を介してアンドロゲンシグナル経路を抑制し、化学療法抵抗性も含めた去勢抵抗性前立腺癌細胞の増殖を抑えることを明らかにした。本研究成果は、現在患者数が増加しており、また治療抵抗性をきたせば予後不良である前立腺癌に対する新規治療戦略の構築に資するものであり、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]

MANABU TAKAI, KYOJIRO KAWAKAMI, YASUNORI FUJITA, TAKU KATO, DAIKI KATO, KOJI IINUMA, TAKUYA KOIE, MASAFUMI ITO and KOSUKE MIZUTANI: Kartogenin Inhibits Prostate Cancer Cell Growth Through Smad2 Activation and Decreases Androgen Receptor Nuclear Localization.

ANTICANCER RESEARCH 41, 4753-4759 (2021), doi:10.21873/anticancer.15290