

氏名	小村 和正
(ふりがな)	(こむら かずまさ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 号
学位審査年月日	平成30年1月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Resistance to docetaxel in prostate cancer is associated with androgen receptor activation and loss of KDM5D expression (アンドロゲンレセプターシグナルと KDM5D 欠失による前立腺がんのドセタキセル耐性獲得機序への影響)
論文審査委員	(主) 教授 大 道 正 英 教授 高 井 真 司 教授 朝 日 通 雄

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目的》

前立腺がんは男性ホルモンであるアンドロゲンががん細胞内でアンドロゲンレセプター (Androgen Receptor: AR) と結合し、転写因子として機能することにより増殖する。過去約70年以上にわたり、この男性ホルモンを何らかの形でブロックする Androgen Deprivation Therapy (ADT) が進行性前立腺がんの標準治療であったが、2004年に ADT 耐性前立腺がん (Castration-Resistance Prostate Cancer: CRPC) に対してドセタキセルの使用が FDA により承認された。2014年、進行性前立腺がんに対して ADT とドセタキセル併用療法が全生存率を約13か月延長することが明らかになり、前立腺がんにおいて ADT 耐性獲得による AR シグナルの変化とドセタキセル感受性との関係が認識されるようになった。本研

究は前述の臨床試験結果を分子生物学的に解明することにより、新たな分子マーカーおよび治療ターゲットの発見を目指す目的で行った。

《方法》

AR 発現の見られる各種前立腺がん細胞株において、ドセタキセルの感受性がアンドロゲンの存在によって変化するかを検討した。さらに、それぞれの結果により各種分子生物学的な Validation をおこなえる実験系を用い、詳細なドセタキセル耐性と AR シグナルの関連性を詳細に解析した。

《結果と考察》

前立腺がん細胞株によるドセタキセル治療感受性スクリーニングの結果、アンドロゲン感受性の LNCaP 細胞はアンドロゲン存在に関わらずドセタキセル感受性が一定であるのに対し、アンドロゲン感受性の LAPC4 細胞はアンドロゲン存在下でドセタキセル耐性を示すことを明らかにした。さらに種々のアンドロゲン拮抗薬により LAPC4 細胞のドセタキセル耐性が解除されることも確認した。次に、細胞株によるアンドロゲン添加下でのドセタキセルの感受性の違いは、エピジェネティックな調節因子が AR シグナルに影響することにより生じているのかを検討した。Gene oncology (GO) term 解析にて、Histone Modification に属する遺伝子群 236 遺伝子が LNCaP 細胞と LAPC4 細胞の間で如何に発現が異なるかを検証した。これにより 7つのエピジェネティック候補因子がリストアップされ、これら全ての遺伝子の siRNA によりアンドロゲン存在下でのドセタキセル感受性変化を、LNCaP、LAPC4 それぞれの細胞で検討したところ、Y 染色体上に coding されているヒストン脱メチル化酵素である KDM5D のノックダウンにより、LNCaP 細胞のドセタキセル感受性低下がみられた。この Phenotype が AR によるものかを検証するために AR 発現のない前立腺がん細胞株である DU-145 細胞を使用した。この細胞株は KDM5D を発現していたが、KDM5D のノックダウンによってもアンドロゲンの添加に関わらずドセタキセル感受性は変化しなかった。さらに PC3 前立腺がん細胞は AR、KDM5D 共に存在し

ない Double Negative な細胞であることを明らかにし、この細胞に AR、その splicing variant でありアンドロゲンのリガンド結合部位を欠いた constitutive active form の AR-V7、KDM5D を発現させることによりドセタキセル感受性の変化を検討した。AR 発現ではアンドロゲン存在下でドセタキセル耐性となること、AR-V7 発現により PC3 細胞がアンドロゲン存在に関わらずドセタキセル耐性となること、KDM5D 共発現により AR および AR-V7 発現による耐性が消失することを明らかにした。これらにより、AR シグナルと KDM5D の低発現がドセタキセルの感受性に関与し、KDM5D がエピジェネティックな AR シグナル調整因子であることが示唆された。次に、この KDM5D と AR が核内で直接的に結合しているか否かを検討した。先ほどの LAPC4 細胞に KDM5D を外因性に発現させ、核内蛋白のフラクショネーションを採取し、免疫共沈降で検討したところ、核内での KDM5D と AR の結合が示された。さらに sh-Tetron system によって LNCaP-shKDM5D 細胞を作製し、ドキシサイクリン存在下で免疫共沈降を施行すると、KDM5D ノックダウン下での KDM5D と AR の結合の低下を確認することができた。これらにより KDM5D と AR が核内にて生理的に結合していることが示唆された。前述の LNCaP sh-KDM5D 細胞を用いて RNA シークエンス解析を施行したところ、KDM5D のノックダウンにより細胞周期関連因子、細胞分裂関連因子の upregulation がみられることが判明した。さらに Data Set 解析により Y 染色体上に coding されており、CRPC においては有意に KDM5D の発現が低下しており、KDM5D 発現低下が有意に全生存期間を短縮させていることが明らかとなった。以上のことより、KDM5D がドセタキセル感受性を調節している可能性が示唆された。この遺伝子の欠失が分子マーカーとして臨床的に応用できる可能性があり、今後の更なる研究が必要である。

《結論》

エピジェネティックなヒストン脱メチル化酵素である KDM5D の前立腺がん細胞での欠失により AR シグナルが変化し、ドセタキセル感受性に影響していることを明らかにした。

(様式 乙9)

論文審査結果の要旨

近年の進行性前立腺がんの治療戦略の変化は目覚ましく、その臨床試験結果の分子生物学的な証明は、更なる治療技術の進歩のために必須である。微小管脱重合阻害薬であるドセタキセルは現在、カバジタキセルと共に進行性前立腺がんを用いられる化学療法薬として中心的な役割を担っているが、前立腺がんにおいて最も重要な働きをもつ AR シグナルとの関連性については未知の部分が多かった。本研究の目的は、2014年に発表された2つの大規模無作為比較臨床試験で証明された、AR シグナル阻害とドセタキセルの早期使用による更なる全生存率改善効果を分子生物学的に解き明かすことである。前立腺がんにおいてエピジェネティック調節因子による AR シグナルの変化とドセタキセル感受性の相関を明らかにしている。さらに病状の進行によって、ヒストン脱メチル化酵素である KDM5D 遺伝子の欠失がみられることが示唆されており、この欠失を臨床的に検出することにより、治療前にドセタキセル耐性を持つかを予測できる可能性についても示唆していることから、将来の臨床現場への応用を目指すトランスレーショナルな一面も持ち合わせている興味深い研究であるといえる。

以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 113(22): 6259-6264, 2016