

原 著

ドラッグ・リポジショニングを目的とする
トランスクリプトミクスを利用した
去勢抵抗性前立腺がん治療薬探索の試み

鈴木 康裕^{1,2}
太田 昌一郎¹

要 旨

ドラッグ・リポジショニングはすでに前臨床試験から早期臨床試験が済み安全性評価が終了している薬剤が対象のため、開発費用および時間が大幅に削減される。我々は、高尿酸血症の治療薬であるフェブキソスタットの他疾患への効果を検討してきたが、去勢抵抗性前立腺がん治療薬としての可能性を検討するため、去勢抵抗性前立腺がん細胞株PC-3を生理的濃度のフェブキソスタットで刺激してマイクロアレイによる網羅的な分子レベルの解析を行った。具体的には、PC-3をヒト去勢抵抗性前立腺がんの*in vitro*モデルに見立ててフェブキソスタットのPC-3における応答遺伝子群をマイクロアレイによって検索し、発現レベルの変化の大きい遺伝子の抽出を行った。その結果、JAK2遺伝子の発現が著明に抑制された。同遺伝子阻害薬の去勢抵抗性を含む進行性前立腺がんへの効果がすでに示されており、フェブキソスタットのJAK2遺伝子を介した系での去勢前立腺がんへの治療効果については今後検討する価値があると考えられる。また、先行実験では、転写因子NF- κ Bの転写能を調節することが確認されており、フェブキソスタットのがん進展抑制効果に関しては検討の余地が十分にあると考えられた。

1：福島県立医科大学 看護学部 生命科学部門

2：奥羽大学 薬学部

責任著者連絡先：福島県立医科大学 看護学部 生命科学部門 太田昌一郎

〒960-1295 福島市光が丘1

キーワード：ドラッグ・リポジショニング, 去勢抵抗性前立腺がん, フェブキソスタット

Our Attempt to Search for Therapeutic Agents for Castration-resistant Prostate Cancer Using Transcriptomics for Drug Repositioning

Yasuhiro Suzuki^{1,2} and Shoichiro Ohta¹

1 : Division of Human Life Science, School of Nursing, Fukushima Medical University

2 : School of Pharmaceutical Science, Ohu University

Corresponding author : Shoichiro Ohta

Division of Human Life Science, School of Nursing, Fukushima Medical University

1 Hikariga-oka, Fukushima City 960-1295, Japan

はじめに

ドラッグ・リポジショニング (drug repositioning または repurposing) とは、ヒトでの安全性・体内動態がわかっている既存薬、または開発中止品を別の疾患の治療薬として開発することであるため、すでに前臨床試験から早期臨床試験が済み安全性評価が終了しており開発費用および時間が大幅に削減される。薬理学的な効果や安全性のプロファイルが既知であるという点で、上市されている薬剤のドラッグ・リポジショニングであれば、開発期間の短縮、臨床開発費の削減により、医薬品の薬価の抑制に大きく貢献できる。このことは昨今社会的問題となっている国民医療費の抑制にも大きく寄与する。一方で物質特許の点から開発企業が敬遠することも事実で、これまでは疾患モデルが作成しにくい難治性疾患を対象に承認されてきた。直近では、新型コロナウイルスの流行に対して喫緊の治療開発が社会的に求められ多くの既存薬を利用したドラッグ・リポジショニングが規制緩和により試みられている。エボラ出血熱の治療薬として開発されたレムデシビルや抗リウマチ薬であるバリシチニブが新型コロナウイルス治療薬として本邦でも承認されたことは記憶に新しい。

いままで我々¹⁾は脂質異常症に適応のない薬剤の炎症性因子をターゲットとした新しい脂

質異常症治療薬としての可能性を探索してきた。従来から本来の適応以外の疾患に作用を発揮する薬剤は散見されている。例えば最近、高尿酸血症患者における高尿酸血症治療薬による脳心腎血管関連イベント発現抑制効果について (FREED 試験²⁾) のデータが明らかとなった。これは日本国内で行われた臨床試験で、これまで尿酸値を低下させることで予後を検討した前向き試験は世界的にもほとんどなく、フェブキソスタットを投与することで、脳心腎血管関連イベント発現の抑制効果を検討するために行われた臨床試験である。結論として、フェブキソスタットによる尿酸値の低下は、高尿酸血症を有する高齢患者において、動脈硬化が原因となる脳心腎血管関連イベントを減少させることが明らかとなった。フェブキソスタットがどのような機序で動脈硬化が原因となる脳心腎血管関連イベントを減少させるのかは、ほとんど明らかとなっていない。

我々は高尿酸血症患者に対する高尿酸血症治療薬による脳心腎血管関連イベント発現抑制効果に関する結果 (FREED 試験²⁾) をヒントに従来から高尿酸血症治療薬の動脈硬化予防効果について、*in vitro* で検討してきており、ドラッグ・リポジショニングによる高尿酸血症治療薬が動脈硬化発症に関連深い TNF- α で誘導された VCAM-1 を抑制し、脂質異常症

が原因の1つと考えられる動脈硬化を抑制する可能性に関してデータを得た¹⁾。

まず同研究において、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells : HUVEC) を高尿酸血症治療薬の生理的濃度で刺激した培養上清中の臍動脈硬化性物質等の濃度を測定したところ、動脈硬化と関係の深いVCAM-1がいくつかの同効薬で抑制されることが判明した。また、HUVECを刺激して、細胞のVCAM-1の蛋白レベルの発現を検証したところ、フェブキソスタット1 μ M以上の濃度でVCAM-1の発現が抑制される傾向が確認された¹⁾。さらに、フェブキソスタットで前処理後、臍動脈硬化性アディポサイトカインの1つである生理的濃度のTNF- α で処理して24時間後、VCAM-1の蛋白レベルの発現を検証したところ、高尿酸血症治療薬の濃度依存的にVCAM-1の蛋白発現が抑制された¹⁾。

今回我々は、前述の方法に従って、フェブキソスタットのさらなる可能性を探求すべく、去勢抵抗性前立腺がん細胞株であるPC-3を生理的濃度のフェブキソスタットで刺激してマイクロアレイによる網羅的な分子レベルの解析を行い、去勢抵抗性前立腺がんの治療薬としての可能性を検討した。具体的には、PC-3をヒト去勢抵抗性前立腺がんの*in vitro*モデルに見立ててフェブキソスタットのPC-3における応答遺伝子群、up-regulateおよびdown-regulateを検索し、発現レベルの変化の大きい遺伝子の抽出を行った。さらに、抽出された遺伝子のがんと関連性を文献等で検索した。

I 方法

1. 培養

細胞は去勢抵抗性前立腺がん細胞株PC-3 (城西大学薬学部臨床病理学 渡辺知恵教授より供与を受けた) を用いた。培地は、5%ウシ胎児血清RPMI1640 (富士フィルム和光純

薬, 大阪) を使用し6wellプレートでサブコンフルエントになるまで培養した。

2. MTTアッセイ

前日に6wellプレートにおいてサブコンフルエントの状態まで培養したPC-3を、5%ウシ胎児血清RPMI1640を使用して、96wellプレートに100 μ Lずつ播種した (2500cells/cm²)。翌日、培地交換を行い、まずPC-3に対する増殖の影響を検討するため、フェブキソスタット最終濃度を0 μ M, 10 μ M, 100 μ Mの3点に設定した。なお、ここでは血清の増殖に与える影響を確認するため、5%血清を加える系 (血清ありの系) と加えない系 (血清なしの系) を設定した。フェブキソスタット0 μ Mの群はvehicleとして、血清ありの系、血清なしの系いずれもフェブキソスタットの代わりに1%ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide : DMSO, 富士フィルム和光純薬, 大阪) を加えたvehicle (DMSO) 群とDMSOを加えないvehicle (water) 群を設定した。フェブキソスタット10 μ M, 100 μ Mの群はフェブキソスタット刺激群とした。

なお、フェブキソスタットは帝人ファーマより提供を受けた。さらに、37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂条件下にて24時間培養し、培養終了後、顕微鏡下で細胞の増殖を確認し、MTT (3-[4,5-Dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-Diphenyltetrazarum Bromide) 25mgに滅菌したリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline : PBS, ナカライテスク, 京都) 5mLを加えた試液 (12.01 μ M) を、各ウェルに20 μ Lずつ加えた。37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂条件下にて、3時間培養した。培養終了後、培養液を除去し、滅菌PBS 200 μ Lで1回洗浄した。マイクロプレートリーダーで570nmの吸光度を測定した。

3. 発現遺伝子の網羅解析

本実験では、遺伝子網羅解析に十分な遺伝子を収集するために、PC-3は薬物投与前日までに35mm細胞培養ディッシュで5%ウシ胎児血清RPMI1640を用いてサブコンフルエン

トになるように培養した。薬物投与は、MTTアッセイでフェブキソスタットの細胞増殖に与える影響が少ないと判断された、血清なしの系のフェブキソスタット10 μ Mに調整した培地と交換し、交換後、薬剤投与15分後、TNF- α (Human TNF- α , Pepro Tech Inc., United States) の濃度が10ng/mLになるよう培地に加えた。本実験でのvehicle群は、フェブキソスタットおよびTNF- α を添加せず、培地に1%となるようにDMSOのみを添加した群とした。

24時間後、PBSで3回洗浄し、TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, CA, USA) を加えて細胞を溶解させ、スクレイパーでかき取った。クロロホルム (富士フィルム和光純薬, 大阪) 200 μ Lを加え、15秒間力強く振り、室温で3分間放置した。13000rpm, 15min, 4 $^{\circ}$ Cで遠心分離後、上層にある水層を新しくチューブに移した。氷冷したイソプロパノール (ナカライテスク, 京都) 500 μ Lを加え、軽くボルテックス後、室温で10分間放置した。13000rpm, 15min, 4 $^{\circ}$ Cで遠心分離後、上清を捨て、氷冷した75%エタノール (ナカライテスク, 京都) 1mLを加え、軽くボルテックスした。7500g, 5min, 4 $^{\circ}$ Cで遠心分離後、上清を捨て、30~60秒乾燥させた。最後に、total-RNA濃度測定のための吸光度測定がしやすいように1 \times TE Buffer [10 \times TBS (20mM Tris, 0.5M NaCl), 2NA (EDTA \cdot 2Na), pH:7.5] 20~30 μ Lを加えた。Nano Drop (NanoDrop Lite Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, 東京) にてtotal-RNAの濃度測定をした。そのRNAを用いてマクロジェン・ジャパン社でBio-chio[®]法を用いてvehicle群とTNF- α 下でのフェブキソスタット刺激群で遺伝子の発現レベルの検討を行った。

4. 統計

MTTアッセイのデータに関しては、血清ありの系、血清なしの系のvehicle (water) 群、vehicle (DMSO) 群、フェブキソスタット

刺激群の10 μ M、フェブキソスタット刺激群の100 μ Mの各群の平均 \pm 標準偏差を算出し、vehicle (water) 群、および各群間との比較を行った。

2群比較にはF検定を行い、両群が等分散であった場合、t検定を行った。3群以上の場合、ANOVAにて分散分析を行い、post hocテストとしてDunnnett法で検定を行った。

II 結果

1. MTTアッセイ

血清なしの系の結果は、vehicle群とフェブキソスタット刺激群との間で細胞の増殖に有意差は認めなかった (図1)。各群間でも同様であった。血清ありの系ではフェブキソスタット刺激群の10 μ Mで同群の100 μ Mに比較して有意な増殖活性を認めた (図1)。血清ありの系のPC-3増殖に関連する遺伝子を抽出する目的で、フェブキソスタット刺激群の10 μ Mでの遺伝子発現を網羅的に検討した。

2. 遺伝子解析結果

フェブキソスタット刺激群の10 μ Mとvehicle群での遺伝子発現量の比 (刺激群/vehicle群) が低下あるいは増加したそれぞれ上位10遺伝子を表1に示した。

III 考察

PubMedで、表1に示した遺伝子名とprostate cancerをキーワードにして、検索を行った。上位10遺伝子の中で、前立腺がんの進展に関連が文献的に示唆される遺伝子について抽出し検討を行った。

刺激群/vehicle群が低下した遺伝子ではアポトーシスの経路では重要な役割を持つJAK2の阻害薬の去勢抵抗性を含む進行性前立腺がんへの効果が示唆されている³⁾⁴⁾。国内でも去勢抵抗性前立腺がんに適応のあるエンザルタミドの治療抵抗性にJAK2/STAT1経路が関

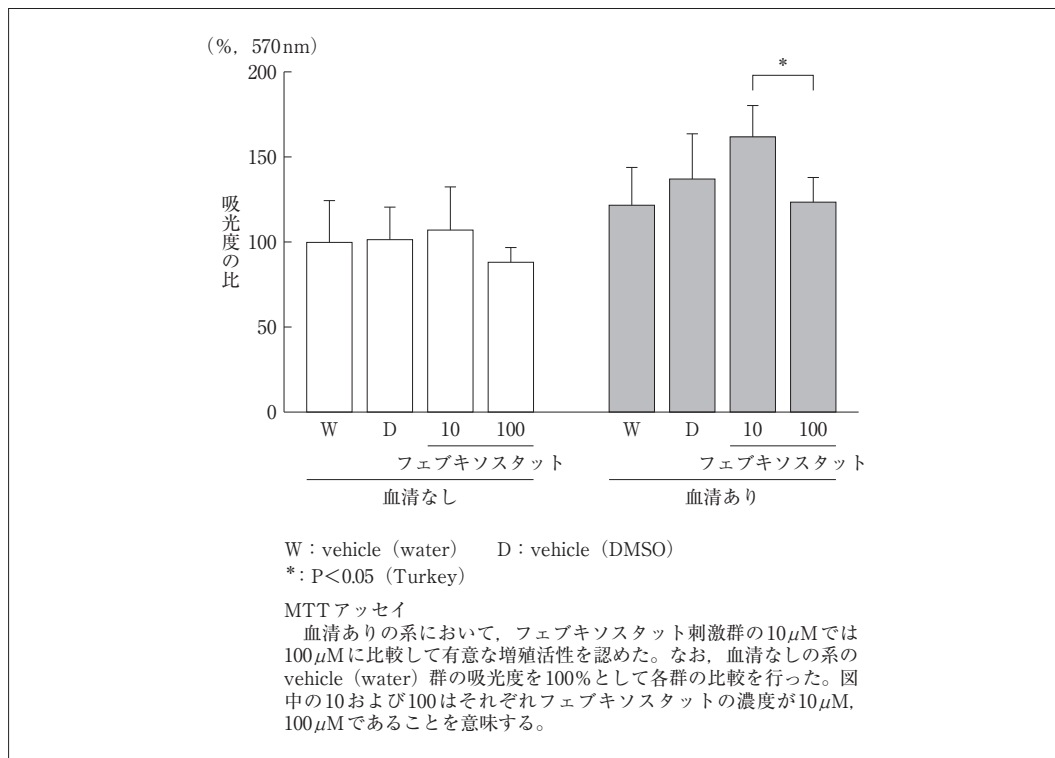


図1 MTTアッセイ (PC-3細胞)

表1 発現遺伝子の網羅解析において遺伝子発現量の変化が大きい遺伝子群 (刺激群/vehicleの比で表示)

遺伝子名	遺伝子発現低下群	遺伝子名	遺伝子発現増加群
HBA2	0.2345699	USP9X	4.087985276
HBA1	0.2345699	ANKRD30A	2.675298739
RBM26	0.2540809	CFHR2	2.674853726
JAK2	0.3059102	KIAA1456	2.672889136
BCHE	0.3197286	PPFIA4	2.671166675
PCDH19	0.3271988	COL6A6	2.599474495
ATP13A3	0.3372709	MYH9	2.592960088
RNF180	0.3423727	FARP1	2.575602580
PICK1	0.3464549	RDH10-AS1	2.574781486
ZNF689	0.3613152	C9orf135	2.562176746

太字は文献検索上前立腺がんの進展に関連が示唆された遺伝子 数字は発現比
 フェブキシスタット刺激群の10 μ Mとvehicle群での遺伝子発現の比(刺激群/vehicle群)として、この条件で発現が低下あるいは増加したそれぞれ上位10遺伝子を表に示した。去勢抵抗性を含む進行性前立腺がんへの効果が示唆されているJAK2遺伝子などのフェブキシスタットでの抑制が確認された。

与しているとする報告⁵⁾もある。ブチリコリンエステラーゼ (butyrylcholinesterase : BCHE) は肝臓での、蛋白質の合成能をみる肝機能検査に用いられるが、前立腺がん患者の血清中BCHE濃度が高いほど手術後の腫瘍マーカー上昇を基準とした再発が少ないとする報告⁶⁾もある。一方でBCHEの子宮体がんの組織中での発現が多いほど予後が悪いとされる報告⁷⁾もある。PICK1はトランスフォーミング増殖因子 β (transforming growth factor- β : TGF- β) シグナル伝達の抑制因子であるが、前立腺がんの骨への転移を抑制する効果が報告⁸⁾されている。

刺激群/vehicle群が増加した群については、USP9XはERK遺伝子の経路などを介して前立腺がんの浸潤能を調節するとする報告⁹⁾、そして前立腺がん患者の血清中のUSP9XはMcl-1遺伝子と協働して前立腺がんの進展や放射線治療の抵抗性と関連するとする報告¹⁰⁾、さらには、USP9Xの抑制が前立腺がん細胞のアポトーシスを誘導するとする報告¹¹⁾がある。PPFIA4は去勢抵抗性前立腺がんを進展させるとの報告¹²⁾がある。MYH9はTUBB4Aのシグナル伝達に関連して前立腺がんの増殖に関与するとの報告¹³⁾があるが、一方でMYH9はアンドロゲンレセプターを抑制するとの報告¹⁴⁾もある。MTTアッセイでは、血清ありの系のフェブキソスタット刺激群の10 μ Mで増殖能の有意な上昇が認められた。しかしながら、血清なしの系のフェブキソスタット刺激群の10 μ Mでは、増殖能の上昇は認められなかった。フェブキソスタット刺激群の10 μ Mのほうが100 μ Mよりも生理的であるため¹⁾、あえて細胞増殖に関連する以外でがんの抑制に関与する遺伝子群を検索するために、血清なしの系のフェブキソスタット刺激群10 μ Mで網羅的遺伝子解析を施行した。

一方で、この濃度で変化した遺伝子群の中では、JAK2の発現が著明に低下した。同遺伝子の阻害薬の去勢抵抗性を含む進行性前立腺

がんへの効果が報告されており、フェブキソスタットのこの系の抑止への関与については今後検討する価値があると考えられる。具体的にはPC-3でJAK2遺伝子のノックアウト細胞を作成して分子生物学的手法を駆使して、JAK2ノックアウトPC-3細胞がどのように変化したのか、例えば、がん細胞の浸潤能や運動能を検討する、そして、その細胞を用いた動物への移植実験などが必要であろう。JAK2は血液細胞の分化、増殖の調整の役割を担う遺伝子であり、JAK2阻害薬がリウマチの治療薬として使用されている。JAK2阻害薬の前立腺がんへの効果についても今後検討の余地が大いにありそうである。

JAK2ばかりではなく、この遺伝子の網羅的解析の結果のみでの薬剤の各疾患に対する評価を行うには限界がある。まずは、リアルタイムPCR法などの他の遺伝子発現を検索する方法での結果のコンファーム、さらには前述のとおり、ノックアウト細胞の作製やその細胞を用いた動物実験が必要になるであろう。この解析結果はプレリミナリーではあるが、無数の遺伝子から、疾患に関連する遺伝子を抽出するにはよい方法であると考えられる。

我々¹⁾の先行実験では、フェブキソスタットはTNF- α 存在下で転写因子NF- κ B (nuclear factor-kappa B) の転写能を調節することが確認されている。NF- κ Bは各種がんの増殖、転移等進展に大きく関与しており、フェブキソスタットのがん進展抑制効果に関しては検討の余地が十分にあると考えられた。

今後は細胞増殖以外の、転移にかかわる現象などへの本剤の影響そして*in vivo*の実験へと移行して本剤の去勢抵抗性前立腺がん治療への可能性をさらに深めていきたい。

利益相反

本論文に関連した利益相反は太田、鈴木ともになし。

文 献

- 1) Suzuki Y, Deguchi M, Furuya A, et al. Febuxostat Attenuates the Induction of Vascular Cell Adhesion Protein 1 by TNF- α in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Pharmacology*. 2021 ; **106** : 218-24.
- 2) Kojima S, Matsui K, Hiramatsu S, et al. Febuxostat for Cerebral and CaRdiorenovascular Events PrEvEntion StuDY. *Eur Heart J*. 2019 ; **40** : 1778-86.
- 3) Beinhoff P, Sabharwal L, Udhane V, et al. Second-Generation Jak2 Inhibitors for Advanced Prostate Cancer : Are We Ready for Clinical Development?. *Cancers (Basel)*. 2021 ; **13** : 5204.
- 4) Zhang BY, Riska SM, Mahoney DW, et al. Germline genetic variation in JAK2 as a prognostic marker in castration-resistant prostate cancer. *BJU Int*. 2017 ; **119** : 489-95.
- 5) Luo Y, Yang X, Basourakos SP, et al. Enzalutamide-Resistant Progression of Castration-Resistant Prostate Cancer Is Driven via the JAK2/STAT1-Dependent Pathway. *Front Mol Biosci*. 2021 ; **8** : 652443. doi : 10.3389/fmolb.2021.652443. eCollection 2021.
- 6) Gu Y, Chow MJ, Kapoor A, et al. Biphasic Alteration of Butyrylcholinesterase (BChE) During Prostate Cancer Development. *Transl Oncol*. 2018 ; **11** : 1012-22.
- 7) Liu J, Tian T, Liu X, Cui Z. BCHE as a Prognostic Biomarker in Endometrial Cancer and Its Correlation with Immunity. *J Immunol Res*. 2022 ; **2022** : 6051092. doi : 10.1155/2022/6051092. eCollection 2022.
- 8) Dai Y, Ren D, Yang Q, et al. The TGF- β signalling negative regulator PICK1 represses prostate cancer metastasis to bone. *Br J Cancer*. 2017 ; **117** : 685-94.
- 9) Zhang J, Wang J, Luan T, et al. Deubiquitinase USP9X regulates the invasion of prostate cancer cells by regulating the ERK pathway and mitochondrial dynamics. *Oncol Rep*. 2019 ; **41** : 3292-304.
- 10) Hogg-Binder SA, Klein D, Wolfspenger F, et al. Protein Levels of Anti-Apoptotic Mcl-1 and the Deubiquitinase USP9x Are Cooperatively Upregulated during Prostate Cancer Progression and Limit Response of Prostate Cancer Cells to Radiotherapy. *Cancers (Basel)*. 2023 ; **15** : 2496.
- 11) Liu Y, Xu X, Lin P, et al. Inhibition of the deubiquitinase USP9x induces pre-B cell homeobox 1 (PBX1) degradation and thereby stimulates prostate cancer cell apoptosis. *J Biol Chem*. 2019 ; **294** : 4572-82.
- 12) Zhao R, Feng T, Gao L, et al. PPFIA4 promotes castration-resistant prostate cancer by enhancing mitochondrial metabolism through MTHFD2. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022 ; **41** : 125. doi : 10.1186/s13046-022-02331-3.
- 13) Gao S, Wang S, Zhao Z, et al. TUBB4A interacts with MYH9 to protect the nucleus during cell migration and promotes prostate cancer via GSK3 β / β -catenin signalling. *Nat Commun*. 2022 ; **13** : 2792. doi : 10.1038/s41467-022-30409-1.
- 14) Liu C, Liao Z, Duan X, et al. The MYH9 Cytoskeletal Protein Is a Novel Corepressor of Androgen Receptors. *Front Oncol*. 2021 ; **11** : 641496. doi : 10.3389/fonc.2021.641496. eCollection 2021.

(受理日 : 2024年3月14日)