

ワークショップ2: 治療抵抗性泌尿器癌における遺伝子解析と治療

Patient-derived xenograft モデルを用いた
泌尿器癌治療抵抗性獲得機序の解明と克服

宮崎大学医学部発達泌尿生殖医学講座泌尿器科学分野

寺田直樹*

(受付日: 2022 年 3 月 7 日)

抄録:

泌尿器癌に対する各治療の効果は一時的であることが多く、いずれは治療抵抗性を獲得する。その機序を解明することにより、治療抵抗性獲得を抑制する新規治療薬の開発にも結び付く可能性がある。しかし、臨床において治療抵抗性となった腫瘍組織を採取することは稀であり、その機序の解明は困難である。我々は以前より、患者組織を直接免疫不全マウスに移植する patient-derived xenograft (PDX) モデルを用いた研究を行ってきた。PDX モデルは、各治療による腫瘍縮小効果を評価すると共に、それらの組織における遺伝子解析が可能である。我々が今まで行ってきた PDX モデルを用いた泌尿器癌治療抵抗性獲得機序に関する研究成果を紹介し、今後のプレジジョン医療へ応用できる可能性について述べる。

(西日泌尿, 84: 602-607, 2022)

キーワード: 泌尿器癌, 治療抵抗性, 実験モデル

緒言

近年、各領域の癌に対して、遺伝子プロファイリングによるプレジジョン医療の時代が到来しつつある。例えば非小細胞肺癌においては、手術や生検で採取した組織の遺伝子解析を行い、*EGFR* や *ALK* の遺伝子変異があれば、各分子に対する標的治療薬を使用するコンパニオン診断が一般的となっている。泌尿器癌においても、2020 年に *BRCA* 遺伝子変異陽性の遠隔転移を有する去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) に対して、PARP 阻害剤であるオラパリブの使用が可能となったのを契機に、コンパニオン診断やパネル検査を用いた遺伝子解析を行う機会が増加した。しかし、治療薬選択に繋がる様な遺伝子変異を認めない場合や、認めたとしても保険上の制約などで治療薬が投与できない場合も多く、実際の治療薬投与に至る割合は約 10% 程度と言われている。そのような状況の中、今後は様々な遺伝子プロファイルを持つ各

泌尿器癌に対して、どの治療薬が有効であるのかを評価するためのモデルが必要になってくると思われる。我々が以前より研究に用いてきた PDX モデルは、その評価に適していると考えている。

Patient-derived xenograft (PDX) モデルとは

泌尿器癌に対する治療として、前立腺癌に対するアンドロゲン除去療法、腎癌に対する抗 VEGF 治療、尿路上皮癌に対する白金製剤を含む化学療法など、各癌種に対して比較的効果の高い治療法が存在する。しかし、それらの効果は一時的であることが多く、いずれは治療抵抗性を獲得する。その機序を解明することにより、治療抵抗性獲得を抑制出来るような新規治療薬の開発にも結び付く可能性がある。しかし、臨床において、治療抵抗性となった患者の腫瘍組織を採取することは稀であるため、その機序の解明は困難である。そこで、培養細胞を用いた研究として、培養液中に治療薬を添加し、生き残った細胞を治療前の細胞と比較するという実験が広く行われてきた。ところが、立体構造を持たない点や、血管や間質が存在しない点など、培養細胞は生体内の腫瘍組織とはその環境がかけ離れている。そこで、我々は以前より

* 現 福井大学医学部器官制御医学泌尿器科学講座
〒 910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合目 23-3
TEL 0776-61-8396, FAX 0776-61-8126
E-mail: nterada@u-fukui.ac.jp

り、患者組織を直接免疫不全マウスに移植する PDX モデルを用いた研究を行ってきた。

PDX モデルは、臨床における各泌尿器癌の性質を再現することが可能である。また、各治療による腫瘍縮小効果を評価し、同時に、それらの組織における遺伝子解析が可能である。

前立腺癌 PDX モデルについて

AR は、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞の増殖に欠かせない分子であり、アンドロゲンにより活性化となった AR が、PSA の産生に寄与し、細胞増殖をもたらす。CRPC では、精巣性アンドロゲンが低値となった状態で、様々な機序により AR が活性化しており¹⁾²⁾、それら様々なアンドロゲン依存性を持つ細胞が混在している³⁾。多様な細胞の集団である CRPC の増殖機序を解明するためには、多くの実験モデルが必要である。

一般的に使用可能な前立腺癌 cell line には、LNCaP, PC3, DU145 等があるが、そのうち、in vitro でのアンドロゲン除去により PSA 産生や細胞増殖が抑制される、いわゆるアンドロゲン依存性細胞株は LNCaP だけである (図 1A)。このため、多くの前立腺癌における AR の機序に関する研究は LNCaP 細胞を用いて行われている。一方で、前立腺癌患者の組織を免疫不全マウスの皮下に移植して作成された PDX モデルは数多く報告されている⁴⁾⁵⁾。これらの多くは、in vivo でマウスの去勢術を行うことにより、PSA 産生や腫瘍の増殖が抑制される。我々が樹立した PDX モデルも、去勢術により腫瘍が縮小して再増殖しない完全なアンドロゲン依存性 PDX (KUCaP1) や、去勢術により一旦腫瘍が縮小するが、再増殖する去勢反応性 PDX (KUCaP2) など、そ

の去勢反応性は様々である (図 1B)。これらの PDX モデルを用いて、多様な CRPC 機序の中でも、特に AR の機能に着目した前立腺癌研究を行ってきた。

AR 変異と抗アンドロゲン薬抵抗性機序の解明

我々が初めて樹立した PDX である KUCaP1 は、抗アンドロゲン薬であるビカルタミド (BCL) を長期間投与し、CRPC となった後に死亡した前立腺癌患者の肝転移組織を、免疫不全マウスである SCID マウスに移植することによって作成した (図 2A)⁶⁾。KUCaP1 の特徴は、その AR の 742 番目のコドンに点変異を持ち、トリプトファン (W) がシステイン (C) になっている (W742C) ことである。同変異は、本患者の肝転移組織に hetero で存在したが、KUCaP1 の組織では homo の変異となり、以後の継代の中でもその変異が維持された (図 2B)。細胞株を用いた in vitro のリポーターアッセイにより、AR W742C 変異は、BCL が AR 拮抗薬ではなく、AR 作動薬として作用することが示され、また、KUCaP1 を持つマウスの去勢下に BCL を投与すると、腫瘍の増大を認めた (図 2C)。LNCaP 細胞に長期間 BCL を投与することで、同変異が誘導されたという報告⁷⁾と合わせ、BCL 投与中に AR W742C 変異が起ることが、BCL に対する抵抗性をもたらし、抗アンドロゲン薬中止により PSA が低下する現象 (antiandrogen withdrawal syndrome : AWS) の原因であることが示された。また、KUCaP1 に別の抗アンドロゲン薬であるフルタミド (FLT) を投与することで、腫瘍の増大が抑制されることから、同変異を持つ CRPC に対して BCL から FLT への抗アンドロゲン薬交替療法が有効であることが示された (図 2D)⁸⁾。近年、KUCaP1 を用いた他施設におけ

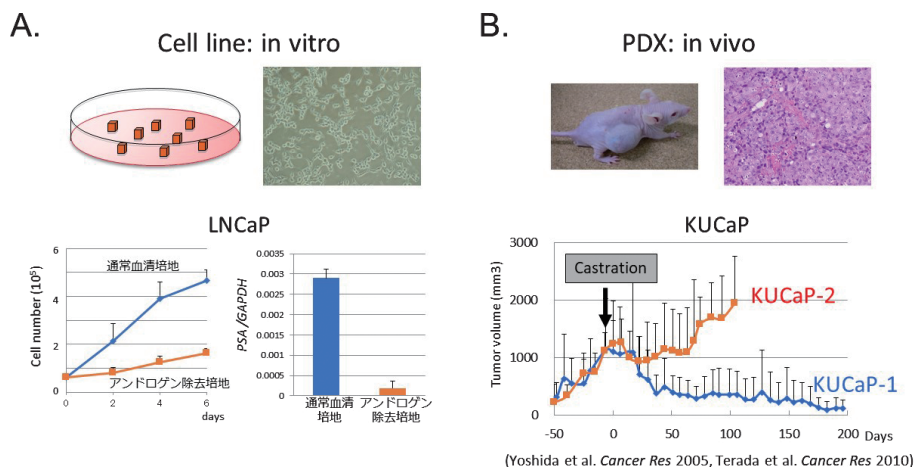


図 1 前立腺癌の cell line と PDX における去勢反応性の評価

る研究により、新規抗アンドロゲン薬である enzalutamide, apalutamide と同様に、darolutamide によっても、同変異 AR に対する拮抗作用と共に、in vivo での腫瘍増殖抑制効果を認めたと報告されている⁹⁾。

AR 活性化を抑制する新規分子標的薬の開発を目指した研究

続いて樹立に成功した PDX である KUCaP2 は、前立腺全摘術を行った後に CRPC となり、局所再発に対する経尿道的切除術の際に採取した組織を、免疫不全マウスである nude マウスに移植することによって樹立した(図 3A)。KUCaP2 の AR は野生型であり、マウスの去勢後に腫瘍は縮小するが、1 - 2 カ月後に再増殖する(図

1B)。これは、臨床における進行性前立腺癌に対するホルモン療法の経過を良く再現している。去勢抵抗性獲得後も AR は野生型のままであり、この組織を去勢前、去勢後縮小中、再増殖後に採取し、それらの遺伝子発現を DNA microarray 法により網羅的に比較したところ、プロスタグランジン受容体の 1 つである EP4 の発現が、去勢抵抗性獲得に際して有意に亢進していることが示された(図 3B)。臨床検体における EP4 の免疫染色により、ホルモン療法未治療前立腺癌と比較し、CRPC においてその発現が有意に亢進している傾向を認めた(図 3C)。さらに、EP4 拮抗剤である ONO-AE3-208 をマウスに投与することにより、KUCaP2 の去勢抵抗性増殖が抑制された(図 3D)。LNCaP 細胞に EP4 を強制発現させ

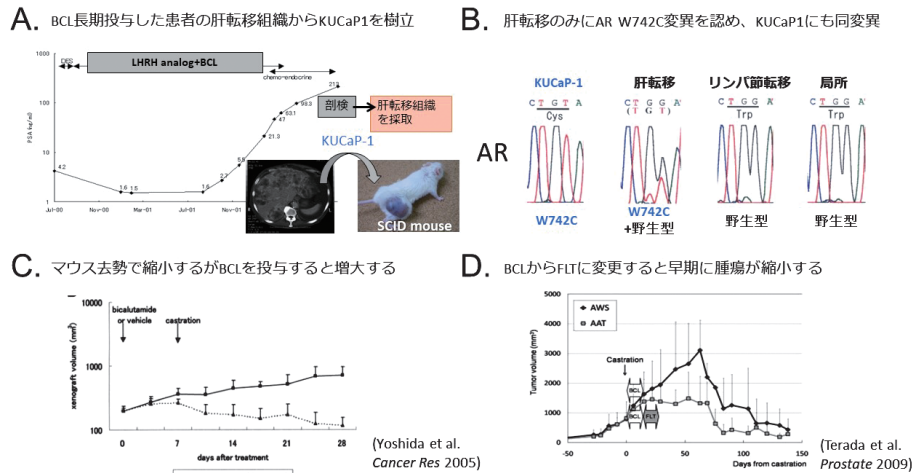


図2 KUCaP1を用いたAR変異に関する研究

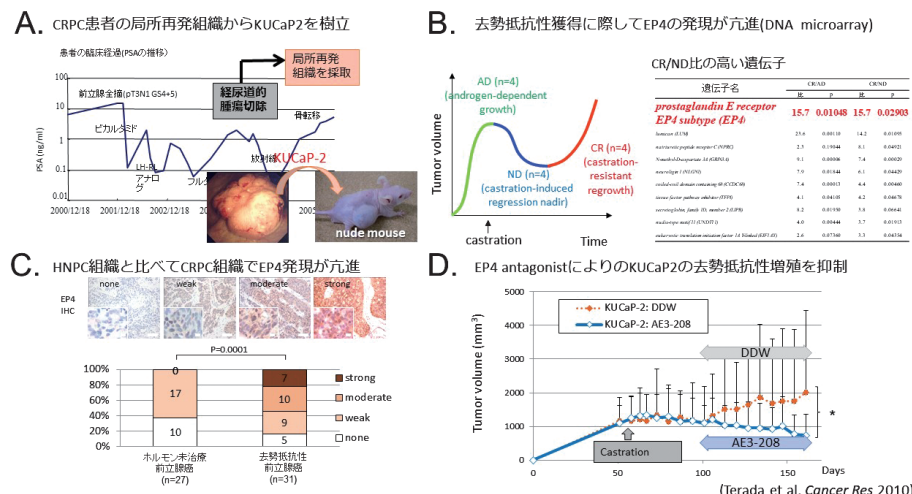


図3 KUCaP2を用いた新規治療標的の研究

ると、アンドロゲン除去下の AR 活性化が亢進され、同細胞への ONO-AE3-208 の投与で AR の活性化が抑制されることから、EP4 拮抗剤は、AR 活性化の抑制を介した新規 CRPC 治療薬としての可能性が示された¹⁰⁾。また、本モデルと LNCaP を用いた micro RNA の網羅的解析により、miR-582-5p が去勢下の細胞増殖に関わり、同じく治療標的となる可能性を示した¹¹⁾。

新たな PDX モデルの作成とそれらを用いた研究

また、KUCaP2 と同様に局所再発組織を用いて樹立したモデルである KUCaP3 は、腫瘍内に嚢胞を形成することが特徴である。その内容液とマウス血液を採取し、プロテオミクスによる網羅的タンパク質解析を行い、PSA と同様に分泌されるタンパク質群を同定した¹²⁾。また、前立腺癌の陰茎転移組織を用いて、神経内分泌癌の PDX および cell line の樹立にも至っている¹³⁾。現在、それぞれ去勢反応性の違う、数種類の KUCaP モデルの樹立に成功している。これらを用いて、去勢療法の反応性予測マーカーだけではなく、各治療薬剤の効果予測マーカーの同定を目指した研究を行っている。また、前立腺癌と同様に、腎癌の腫瘍組織を用いた PDX の樹立も行った。淡明型腎細胞癌の PDX モデルである KURC1 に対して、sunitinib により腫瘍増殖が抑制される。Sunitinib に対する抵抗性を獲得した腫瘍組織において、IL13Ra2 の発現が亢進しているのを確認し、その発現の調整により、sunitinib 治療反応性が変化することを示した¹⁴⁾。今後、尿路上皮癌や精巣癌など、各泌尿器癌の PDX モデルを樹立すれば、それぞれの特徴に合わせた新規治療やバイオマーカー研究に使用できる可能性があると考えている。

新規 PDX モデルの作成とプレジジョン医療

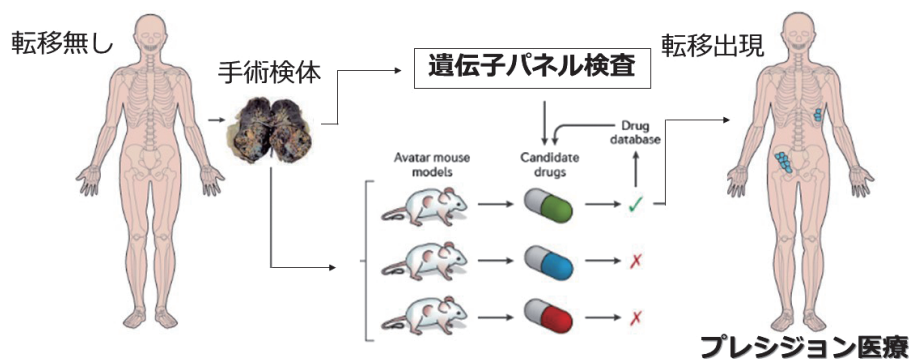
前述のとおり、パネル検査による遺伝子プロファイリングに基づくプレジジョン医療には、その治療薬の選択において大きな障壁がある。特に、各遺伝子プロファイルを持つ腫瘍に対して、各薬剤が本当に効果を示すかどうかは、実際に患者に投与を行わないと確認できないのが現状である。PDX モデルは、各患者の癌に対する治療に反応性を再現していると同時に、その遺伝子プロファイルも保持している¹⁵⁾。そこで、各患者に対する手術や生検などで採取した腫瘍組織を用いた PDX モデルを作成し、遺伝子パネル検査により同定した各治療薬を PDX モデルに投与することで、その治療反応性を確認することが可能である（図 4）。本邦において、PDX モデルを用いた薬剤スクリーニングを行う取り組みが始まりつつある¹⁶⁾。近年、血中循環腫瘍細胞（CTC）や血中 cell-free DNA（cfDNA）を用いた新規マーカーにも注目が集まっており、PDX の腫瘍組織とその宿主マウスの血液は、それらの validation にも有用であると考えている¹⁷⁾。多様な泌尿器癌に対する実験モデルとして PDX を用いた研究が進展し、今後の新規治療の開発やプレジジョン医療の発展に繋がることを期待している。

結 語

PDX モデルを用いた泌尿器癌の治療抵抗性獲得機序の解明を目指した研究を紹介した。今後、本モデルを用いて、その克服に向けた研究を進展させることにより、プレジジョン医療への応用も期待できると考えている。

文 献

- 1) Feldman, B. J. and Feldman, D.: The develop-



(Inoue, Terada et al. *Nat Rev Urol* 2017 改変)

図 4 PDX モデルを用いたプレジジョン医療

- ment of androgen-independent prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **1**: 34-45, 2001.
- 2) Kobayashi, T. et al.: Experimental evidence of persistent androgen-receptor-dependency in castration-resistant prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 15615-15635, 2013.
 - 3) Terada, N. et al.: Correlation of Sproutyl and Jagged1 with aggressive prostate cancer cells with different sensitivities to androgen deprivation. *J. Cell. Biochem.* **115**: 1505-1515, 2014.
 - 4) Chen, C. D. et al.: Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat. Med.* **10**: 33-39, 2004.
 - 5) Marques, R. B. et al.: The human PC346 xenograft and cell line panel: a model system for prostate cancer progression. *Eur. Urol.* **49**: 245-257, 2006.
 - 6) Yoshida, T. et al.: Antiandrogen bicalutamide promotes tumor growth in a novel androgen-dependent prostate cancer xenograft model derived from a bicalutamide-treated patient. *Cancer Res.* **65**: 9611-9616, 2005.
 - 7) Hara, T. et al.: Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. *Cancer Res.* **63**: 149-153, 2003.
 - 8) Terada, N. et al.: Antiandrogen withdrawal syndrome and alternative antiandrogen therapy associated with the W741C mutant androgen receptor in a novel prostate cancer xenograft. *Prostate.* **70**: 252-261, 2010.
 - 9) Sugawara, T. et al.: Darolutamide is a potent androgen receptor antagonist with strong efficacy in prostate cancer models. *Int. J. Cancer.* (Epub) 2019.
 - 10) Terada, N. et al.: Identification of EP4 as a potential target for the treatment of castration-resistant prostate cancer using a novel xenograft model. *Cancer Res.* **70**: 1606-1615, 2010.
 - 11) Maeno, A. et al.: Up-regulation of miR-582-5p regulates cellular proliferation of prostate cancer cells under androgen-deprived conditions. *Prostate.* **74**: 1604-1612, 2014.
 - 12) Yoshikawa, T. et al.: An original patient-derived xenograft of prostate cancer with cyst formation. *Prostate.* **76**: 994-1003, 2016.
 - 13) Okasho, K. et al.: Establishment and characterization of a novel treatment-related neuroendocrine prostate cancer cell line KUCaP13. *Cancer Sci.* **112**: 2781-2791, 2021.
 - 14) Shibasaki, N. et al.: Role of IL13RA2 in sunitinib resistance in clear cell renal cell carcinoma. *PLoS One.* **10**, 2015.
 - 15) Inoue, T. et al.: Patient-derived xenografts as in vivo models for research in urological malignancies. *Nat. Rev. Urol.* **14**: 267-283, 2017.
 - 16) Tsumura, R. et al.: Report of the use of patient-derived xenograft models in the development of anticancer drugs in Japan. *Cancer Sci.* **111**: 3386-3394, 2020.
 - 17) Terada, N. et al.: Prognostic and predictive biomarkers in prostate cancer: latest evidence and clinical implications. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **9**: 565-573, 2017.

EVALUATION OF THE MECHANISMS BEHIND TREATMENT RESISTANCE OF UROLOGICAL CANCER USING PATIENT-DERIVED XENOGRAFT MODELS

NAOKI TERADA

Department of Urology, Miyazaki University, Miyazaki, Japan

Abstract :

Most urological cancers treated by chemo or hormonal therapies acquire treatment resistance. Elucidation of the mechanisms behind treatment resistance could potentially lead to the development of novel therapies. However, it is difficult to obtain clinical samples after treatment resistance has developed. We used patient-derived xenograft (PDX) models to examine the mechanisms behind treatment resis-

tance for each urological cancer. PDX models are useful for not only evaluating treatment efficacy but also for examining molecular profiling. The results of basic research for urological cancer using PDX models are reviewed and the possibility of future application for precision medicine is described.

(Nishinoh J. Urol. **84**: 602-607, 2022)

key words: Urological cancer, Treatment resistance, Experimental model
