

## Patient-derived xenograft モデルを用いた前立腺癌研究について

寺田直樹 1)、賀本敏行 1)、永井崇敬 1)、向井尚一郎 1)、赤松秀輔 2)、小林恭 2)、井上貴博 2)、小川修 2)

1)宮崎大学医学部泌尿器科

2)京都大学医学部泌尿器科

### はじめに

食生活の変化、高齢化、前立腺特異抗原(PSA)検査の普及に伴い、前立腺癌は近年急速に増加している疾患である。早期前立腺癌の予後は良好であるが、全体の10~20%は進行性前立腺癌であり、その予後は不良である。進行性前立腺癌の標準治療は去勢療法であるが、多くはやがて去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)へと進展する。CRPCにおいても前立腺癌細胞内におけるアンドロゲン受容体(AR)経路の再活性化が認められ、近年、AR経路をブロックする各種薬剤によるCRPC治療が一般的になってきた。多様化するCRPC治療の中で、様々な治療反応性の検証や、抵抗性獲得機序の解明には、適切な実験モデルを用いる必要がある。今回、我々が以前より行ってきたPatient-derived xenograft(PDX)モデルを用いた前立腺癌研究について紹介し、今後の展望について考察する。

**Key words** : 前立腺癌、去勢抵抗性、実験モデル

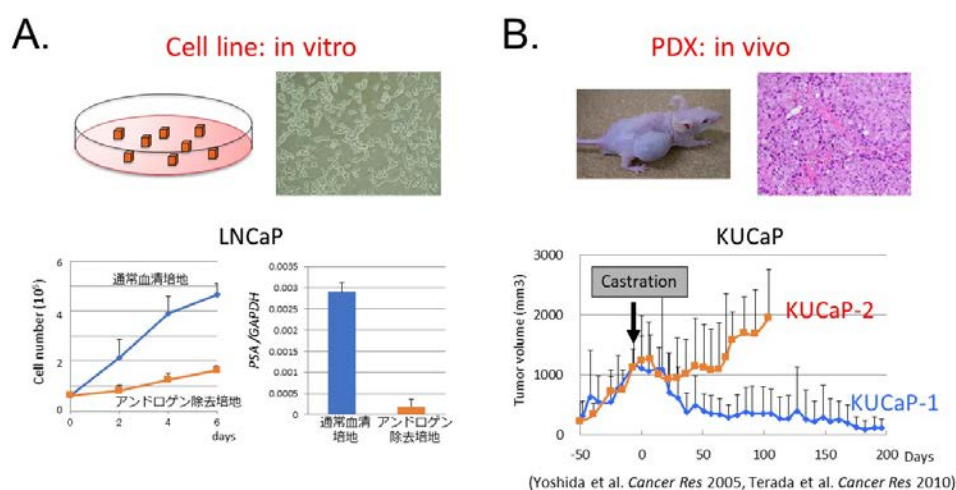
### 前立腺癌 PDX モデルについて

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、精巢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が活性化している1,2)。CRPCでは、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。

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

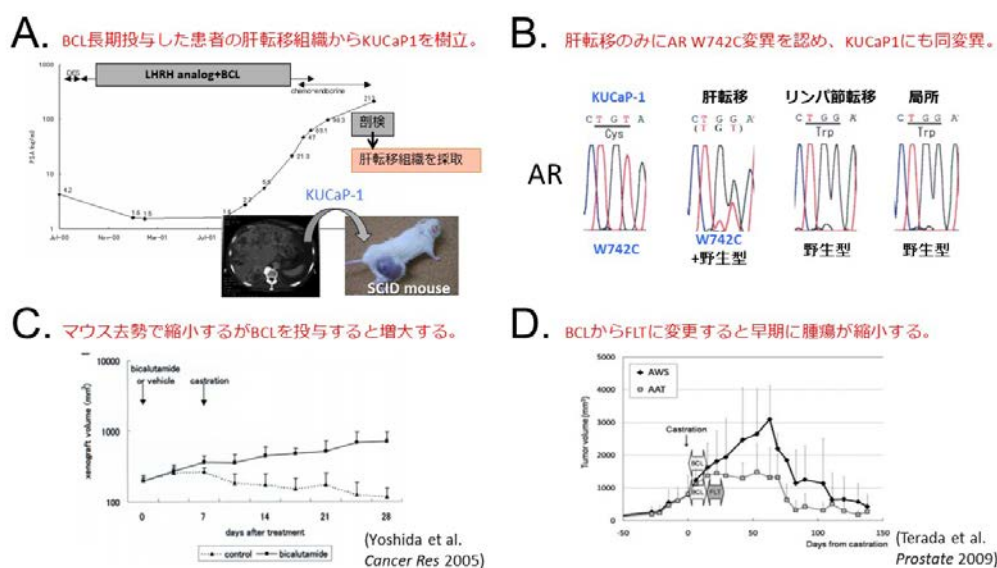


## AR 変異と抗アンドロゲン薬抵抗性機序の解明

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 変異が起こることが、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)。

図 2. KUCaP1 を用いた AR 変異に関する研究

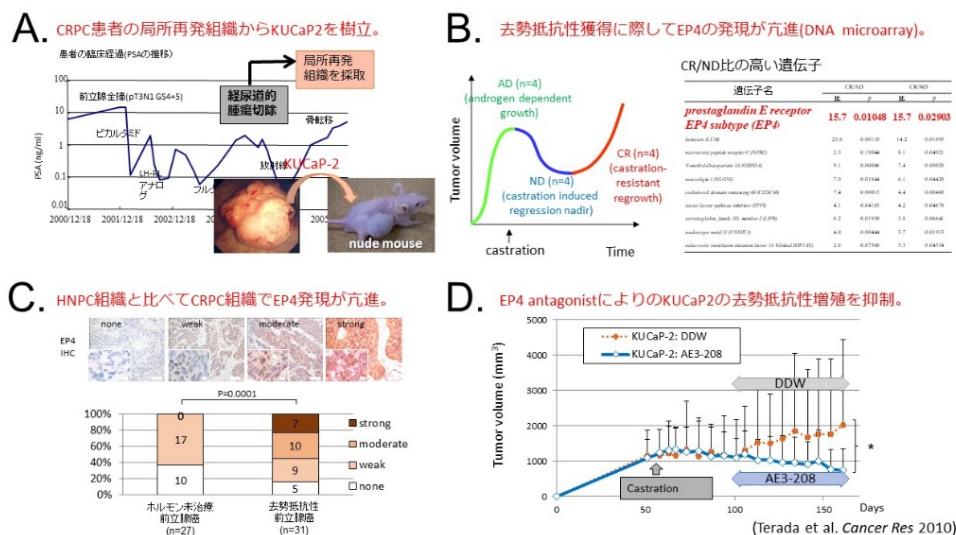


## AR 活性化を抑制する新規分子標的薬の開発を目指した研究

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 ヶ月後に再増殖する(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(HNPC)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)。現在、KUCaP2 を用いた enzalutamide 治療モデルを作成中であり、その抵抗性獲得機序の解明を目指した研究を行っている。

図 3. KUCaP2 を用いた新規治療標的の研究



## PSA を補完する新規バイオマーカーの探索

PSA は前立腺のみで発現する分子であり、前立腺癌細胞では、基底膜が破壊されることにより組織中から血中に分泌されるため、前立腺癌診断マーカーとして有用である。また、AR により転写が誘導されるため、治療中

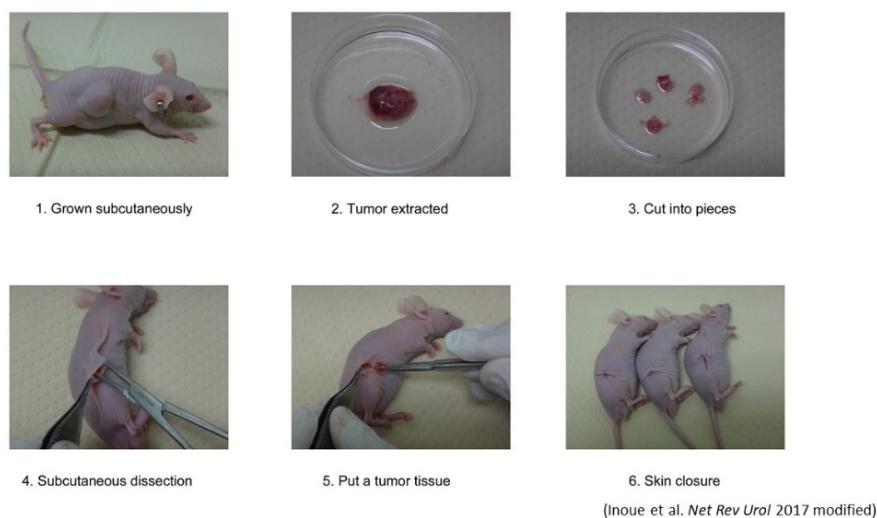
のAR活性化の状態を経時的に観察することができ、各種治療の効果判定にも有用である。一方で、PSA値だけでは本当に致死的な前立腺癌であるかどうかを診断することは難しく、多様な前立腺癌患者に対する個別化治療を行うためには、PSAを補完するバイオマーカーの開発が必要である。我々が次に樹立したKUCaP3は、KUCaP2と同様に局所再発組織を用いて樹立したモデルである。本モデルは、腫瘍内に嚢胞を形成することが特徴である。その内容液とマウス血液を採取し、プロテオミクスによる網羅的タンパク質解析を行い、PSAと同様に分泌されるタンパク質群を同定した(12)。現在、それらのタンパク質についての機能解析を行い、新規の前立腺癌診断マーカーの開発を目指している。また、高解像度質量顕微鏡を用いた前立腺癌組織特異的な脂質解析においては、KUCaPの腫瘍組織を用いた条件検討を行った後、前立腺全摘術標本を用いた癌部と非癌部の比較(13)、高悪性度癌と低悪性度癌との間の比較(14)を行い、その脂質発現パターンの違いが新規バイオマーカーになる可能性を見出した。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。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いる(15)。KUCaP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。

## 前立腺癌 PDX モデルの限界

前立腺癌のPDXは、cell line と比べ、アンドロゲンを含めたホルモン環境や、間質細胞が存在し立体的な細胞構築を有するという点で、より臨床に近い実験モデルである(16)。一方で、問題点として、その生着率の低さが挙げられる。我々は、過去10年に渡り、前立腺癌患者の局所あるいは転移巣の組織を採取した際に、免疫不全マウス皮下への移植を繰り返してきた。33種類の組織を用いて樹立を試みたが、3回以上の継代が可能であったモデルは12種類(36.3%)と低く、その後に継続して継代可能であるモデルはさらに少ない。宿主マウスとしては、胸腺が無くT細胞が産生されない nude マウスより、B細胞の産生も無い SCID マウスの方が、やや生着率が高い傾向がある。今後は、NK細胞の産生も低下させた NOD-SCID マウスやその亜型を用いることで、生着率が上がる可能性がある。また、腫瘍を腎被膜下に移植することで生着率が上昇するという報告もあるが、体表から腫瘍が確認できないという問題もある。次に、実験に時間を要するという点が挙げられる。PDX組織の継代は、採取した腫瘍を細切し別のマウスに移植する必要がある(図4)。そのため、同じ数の細

胞を移植することが難しく、薬剤投与時のマウス間での腫瘍サイズのばらつきが大きくなってしまいます。最後に、免疫不全マウスを使用しているため、免疫チェックポイント阻害剤を中心とした免疫治療モデルとしては使用できないという点が挙げられる。近年、ヒトの免疫細胞を移植した **humanized mice** を用いた PD1 標的治療の研究も始まっており、今後の研究に利用できる可能性がある 17)。

図 4. PDX モデルの組織採取と継代の方法



## PDX モデルを用いた前立腺癌研究の今後の展望

PDX モデルは、ヒト前立腺癌の性質を再現しており、その病態解明、薬物効果判定、バイオマーカー開発において有用なモデルである。一方で、その樹立や維持が困難であるという点に対しては、PDX モデルの研究者間での情報共有が進みつつある 18)。また、最近では組織保存液の改善により、モデルによっては、腫瘍組織の凍結保存も可能となりつつある。多様な前立腺癌に対する実験モデルとして、PDX を用いた研究が数多く行われるようになり、今後の新規治療の開発や個別化医療の発展につながることを期待している。

## 【参考文献】

- 1) Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):34-45.
- 2) Kobayashi T, Inoue T, Kamba T, Ogawa O. Experimental evidence of persistent androgen-receptor-dependency in castration-resistant prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2013;14(8):15615-35.
- 3) Terada N, Shiraishi T, Zeng Y, Aw-Yong KM, Mooney SM, Liu Z, Takahashi S, Luo J, Lupold SE, Kulkarni P, Getzenberg RH. Correlation of Sprouty1 and Jagged1 with aggressive prostate cancer cells with different sensitivities to androgen deprivation. *J Cell Biochem*. 2014;115(9):1505-15.
- 4) Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, Rosenfeld MG, Sawyers CL. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med*. 2004;10(1):33-9.
- 5) Marques RB, van Weerden WM, Erkens-Schulze S, de Ridder CM, Bangma CH, Trapman J, Jenster G. The human PC346 xenograft and cell line panel: a model system for prostate cancer progression. *Eur Urol*. 2006;49(2):245-57.
- 6) Yoshida T, Kinoshita H, Segawa T, Nakamura E, Inoue T, Shimizu Y, Kamoto T, Ogawa O. Antiandrogen bicalutamide promotes tumor growth in a novel androgen-dependent prostate cancer xenograft model derived from a bicalutamide-treated patient. *Cancer Res*. 2005;65(21):9611-6.
- 7) Hara T, Miyazaki J, Araki H, et al. Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. *Cancer Res*. 2003;63(1):149-53.
- 8) Terada N, Shimizu Y, Yoshida T, Maeno A, Kamba T, Inoue T, Nakamura E, Kamoto T, Ogawa O. Antiandrogen withdrawal syndrome and alternative antiandrogen therapy associated with the W741C mutant androgen receptor in a novel prostate cancer xenograft. *Prostate*. 2010;70(3):252-61.
- 9) Sugawara T, Baumgart SJ, Nevedomskaya E, Reichert K, Steuber H, Lejeune P, Mumberg D, Haendler B. Darolutamide is a potent androgen receptor antagonist with strong efficacy in prostate cancer models. *Int J Cancer*. 2019 (Epub).
- 10) Terada N, Shimizu Y, Kamba T, Inoue T, Maeno A, Kobayashi T, Nakamura E, Kamoto T, Kanaji T, Maruyama T, Mikami Y, Toda Y, Matsuoka T, Okuno Y, Tsujimoto G, Narumiya S, Ogawa O. Identification of EP4 as a potential target for the treatment of castration-resistant prostate cancer using a novel xenograft model. *Cancer Res*. 2010;70(4):1606-15.
- 11) Maeno A, Terada N, Uegaki M, Goto T, Okada Y, Kobayashi T, Kamba T, Ogawa O, Inoue T. Up-regulation of miR-582-5p regulates cellular proliferation of prostate cancer cells under androgen-deprived conditions. *Prostate*. 2014 Dec;74(16):1604-12.
- 12) Yoshikawa T, Kobori G, Goto T, Akamatsu S, Terada N, Kobayashi T, Tanaka Y, Jung G, Kamba T, Ogawa O, Inoue T. An original patient-derived xenograft of prostate cancer with cyst formation. *Prostate*. 2016;76(11):994-1003.

- 13) Goto T, Terada N, Inoue T, Nakayama K, Okada Y, Yoshikawa T, Miyazaki Y, Uegaki M, Sumiyoshi S, Kobayashi T, Kamba T, Yoshimura K, Ogawa O. The expression profile of phosphatidylinositol in high spatial resolution imaging mass spectrometry as a potential biomarker for prostate cancer. *PLoS One*. 2014;9(2): e90242.
- 14) Goto T, Terada N, Inoue T, Kobayashi T, Nakayama K, Okada Y, Yoshikawa T, Miyazaki Y, Uegaki M, Utsunomiya N, Makino Y, Sumiyoshi S, Yamasaki T, Kamba T, Ogawa O. Decreased expression of lysophosphatidylcholine (16:0/OH) in high resolution imaging mass spectrometry independently predicts biochemical recurrence after surgical treatment for prostate cancer. *Prostate*. 2015;75(16):1821-30.
- 15) Terada N, Akamatsu S, Kobayashi T, Inoue T, Ogawa O, Antonarakis ES. Prognostic and predictive biomarkers in prostate cancer: latest evidence and clinical implications. *Ther Adv Med Oncol*. 2017;9(8):565-573.
- 16) Inoue T, Terada N, Kobayashi T, Ogawa O. Patient-derived xenografts as in vivo models for research in urological malignancies. *Nat Rev Urol*. 2017;14(5):267-283.
- 17) Wang M, Yao LC, Cheng M, Cai D, Martinek J, Pan CX, Shi W, Ma AH, De Vere White RW, Airhart S, Liu ET, Banchereau J, Brehm MA, Greiner DL, Shultz LD, Palucka K, Keck JG. Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *FASEB J*. 2018;32(3):1537-1549.
- 18) Navone NM, van Weerden WM, Vessella RL, Williams ED, Wang Y, Isaacs JT, Nguyen HM, Culig Z, van der Pluijm G, Rentsch CA, Marques RB, de Ridder CMA, Bubendorf L, Thalmann GN, Brennen WN, Santer FR, Moser PL, Shepherd P, Efsthathiou E, Xue H, Lin D, Buijs J, Bosse T, Collins A, Maitland N, Buzza M, Kouspou M, Achtman A, Taylor RA, Risbridger G, Corey E. Movember GAP1 PDX project: an international collection of serially transplantable prostate cancer patient-derived xenograft (PDX) models. *Prostate*. 2018;78(16):1262-1282.