

学位論文審査結果の報告書

氏 名 Marco Antonio De Velasco

生 年 月 日 1968 年 6 月 3 日

本 籍 (国 籍) アメリカ合衆国

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 1235 号

学位授与の条件
(博士の学位) 学位規程第5条第2項該当

論 文 題 目

Efficacy of targeted AKT inhibition in genetically
engineered mouse models of PTEN-deficient prostate cancer

PTEN不活性化遺伝子改変マウス前立腺癌モデルにおけるAKT分子を
標的とした治療効果について

審 査 委 員

(主 査) 岡田 斉



(副主査) 光富 徹哉



(副主査) 中川 和彦



(副 査)



(副 査)



学位論文受理日 平成29年2月20日 学位論文審査終了日 平成29年4月20日

論文内容の要旨

【目的】

進行性前立腺癌において、PI3K-AKT シグナル経路の異常、特に PTEN 分子の機能異常が頻繁に認められることから、この経路の分子は個別化治療の標的として重要と考えられている。このような背景を鑑みて、我々は PI3K-AKT 経路で重要な役割を果たしている癌抑制遺伝子 *PTEN* に着目し、前立腺組織においてのみ PTEN 機能を欠失させたコンディショナル *PTEN* ノックアウトマウスモデルを確立した。この遺伝子改変動物モデルは、前立腺においてのみ前癌状態 (PIN) から癌へと進展し、12 週齢で除精することによりアンドロゲン非依存性癌である去勢抵抗性前立腺癌となるヒト前立腺癌の自然史に酷似した極めて有用なモデルである。また、本マウスモデルに p53 (Trp 53) 機能を欠失させた *PTEN/p53* ダブルノックアウトマウス (申請者が確立) は、早期より全身に転移し、生後 60 週までに癌死する転移モデルとして生存期間をエンドポイントとした研究が可能な実臨床に即したモデルである。今回我々は、これらの動物モデルを用いて汎 AKT 阻害薬である AZD5363 の有用性について検討した。

【方法】

Pharmacokinetic および pharmacodynamic study により本マウスモデルにおける AZD5363 の至適投与量を 100mg/kg (b.i.d)、5 日間投与 2 日休薬として、以下の治療実験を行った。

1. アンドロゲン感受性 (CNPC) および非感受性 (CRPC) *PTEN* ノックアウト前立腺癌 (24 週齢 $n=8$) に対する AZD5363 の 4 週投与による抗腫瘍効果について検討した。
2. *PTEN/p53* ダブルノックアウト転移性前立腺癌モデルを用いたランダム化前向き治療研究 (エンドポイント: 無増悪生存期間 PFS および全生存期間 OS) を行った。

【結果】

1. CNPC および CRPC において AZ5363 投与群はコントロール群に比較して、有意な腫瘍サイズの低下を認め、組織学的には有意な細胞増殖の抑制 (Ki67 発現抑制) とアポトーシスの誘導 (Caspase-3 発現細胞増加) を認めた。

2. 転移モデルのランダム化研究では、対照群に比較し、有意な腫瘍の増殖抑制を示し、無増悪生存期間 PFS および全生存期間 OS の有意な延長を認めた。

【考察】

これらの結果より、汎 AKT 阻害薬 AZD5363 は、アンドロゲン感受性前立腺癌 CNPC および去勢抵抗性前立腺癌 CRPC において抗腫瘍効果を示すことから、PI3K-AKT 経路をターゲットにした分子標的治療の有用性が示唆された。

【結論】

CNPC および CRPC に対する治療として、汎 AKT 阻害薬 AZD5363 は、PI3K-AKT シグナル伝達経路を阻害し、抗腫瘍効果を発揮することが証明された。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出 版 物 の 種 類 及 び 名 称
	2016 年 3 月 29 日 公 表	博士学位論文
	Efficacy of targeted AKT inhibition in genetically engineered mouse models of <i>PTEN</i> -deficient prostate cancer	Oncotarget. 7(13):15959-15976
	全 文	2016 年 月 発 行

論文審査結果の要旨

1) 論文内容の要旨

【目的】前立腺がん研究の大きな制約の一つは適切な前臨床モデルを欠いていることである。遺伝子改変マウスは前臨床モデルとして大きな可能性を秘めており、新規抗がん剤の治療効果を正確に評価し薬剤特性を明らかにする目的で非常に有用である。本研究では前立腺上皮特異的Pten欠損マウスおよびPten/p53複合欠損マウスを使用して新規AKT阻害薬の治療効果を、薬剤活性動態、抗腫瘍効果、長期生存の観点から評価した。

【対象および方法】PSAプロモーターにより誘導されるCre recombinaseトランスジェニックマウスとPten遺伝子のexon4-5を挟むように2つのloxP配列を有するコンディショナルPten変異マウスを交配して得られた前立腺特異的Pten欠損マウスを用いてAZD5363の抗腫瘍効果を生化学的、組織学的、個体レベルで解析した。また、去勢後に出現する去勢抵抗性前立腺がん

(CRPC) に対するAZD5363の抗腫瘍効果を同様に評価した。長期生存におよぼす効果はより進行の早い腫瘍を発症するPten/p53複合欠損マウスを用いて評価した。

【結果】個体レベルでの薬剤活性動態はAZD5363の投与量と投与後の時間経過を追って腫瘍組織を採取し、Aktのリン酸化とAktの基質であるFOXO1、GSK-3 β 、S6、4EBP1のリン酸化を指標として評価したところ基質のリン酸化レベルはAZD5363投与量依存的に減少した。投与後の時間経過を見ると投与後1-2時間後にと基質のリン酸化が強く抑制されたが、その後リン酸化レベルが回復する分子も認められ、回復の程度は分子により異なっていた。これはPI3K/Aktシグナルの抑制により代償性に他のシグナル経路が活性化されたためと考えられた。例えば、STAT3とERKのリン酸化がAZD5363により亢進することを確かめており、多剤併用療法を考慮する上で有用な情報であると考えられる。

抗腫瘍効果については去勢前のアンドロゲン依存性前立腺がん(CNPC)と去勢後出現する去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)に対する抗腫瘍効果を検討した。腫瘍面積を指標にすると、AZD5363はいずれの腫瘍に対しても有為な抗腫瘍効果を示した。細胞生物学的に調べるとCNPCでは細胞増殖は有意に抑制され、アポトーシスは亢進していた。CRPCではAZD5363投与により細胞増殖は減少傾向を示したが細胞死の亢進は認められなかった。AZD536投与後、免疫染色による組織学的検討を行ったところ、腫瘍内で一部ERK、STAT3のリン酸化が亢進している部位が存在し、増殖細胞マーカーであるKi67に強く染色される部位と一致していた。従って、ではPten欠損による誘導される前立腺がんはヘテロながん細胞の集団であり、AZD536に感受性を示す細胞集団と耐性を示す細胞集団が混在することを直接的に証明した。

長期生存率に関してはより悪性度の高い前立腺がんを発症するPten/p53複合欠損マウスを用いて検討した。Pten/p53複合欠損マウスでは8割以上のマウスで肺、肝臓等に転移を認めたが、AZD536投与により長期生存率は有意に改善した。CRPCにおいてもCNPCと同様にAZD536投与は腫瘍増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。以上の結果より、いずれの癌腫においてもAZD536投与はまた遠隔転移を抑制し、全身状態は改善することが示された。

【考察】上記実験結果は、Pten欠損前立腺がんにおいてPI3Kシグナルが治療標的となり得ること、さらに進行したヒト前立腺癌の治療に対してAZD5363が治療選択となり得ることを示唆している。

【結論】

(1) 本研究に用いた前臨床モデルは、Pten欠損前立腺がんにおいてAKT阻害によりこの腫瘍効果が得られる。

(2) 一連のマウスモデルで認められた抗腫瘍効果より、進行したヒト前立腺癌の治療に対してAZD5363が治療選択となり得ることが示唆された。

(3) AZD5363投与によりSTAT3のリン酸化が誘導されることからJAK/STAT3が多剤併用療法の標的となり得る可能性を見出した。

(4) 本研究は新規治療薬の有効性を評価するための適切な遺伝子改変疾患モデルマウスを使用した前臨床研究の使用法の概略を示している。

2) 審査結果の要旨

Marco Antonio De Velasco氏に対する最終試験は平成29年4月10日の午後5時から小講堂で実施された。

まずDe Velasco氏が本研究を行うに至った背景、対象と方法、結果と考察、今後の展望について口頭で発表し、それに対して副主査である中川、光富両教授、主査である岡田がいくつかの質疑あるいはコメントを行なった。中川教授からはヒトの前立腺がんではPI3K/AKTの活性化は何パーセントくらい起こっているのか。前立腺がんモデルマウスから得た細胞はヘテロな細胞集団なのか。AKTの阻害剤にはATP競合阻害によるキナーゼ活性抑制剤、PIP3に結合する阻害剤などが知られているが、AZD5363は新しいタイプのAKT阻害剤で、全てのAKT isoformに結合しAKTの標的分子のリン酸化を阻害する。本実験に使用するAKTの阻害剤としてAZD5363を選んだ理由は何か。薬剤の効果判定に腫瘍面積を使用しているが結果は満足のものではない。より良い評価法はないのか。光富教授からは、実験に使用したPten欠失により誘導される前立腺がんモデルマウスの系で実際に去勢術を施しても抗腫瘍効果、延命効果はあるのか。PTEN不活性化は前立腺がんの原因なのか結果なのか。AZD5363はCRPCには効果があるといえるのか。AZD5363投与群でPS (+) 群がPS (-) 群よりもsurvivalが長いのはどうしてか。岡田からはCRPCがARシグナル非依存性を獲得する機序にはいくつかあるが研究に使用したマウスに関してAR非依存的になる機序に関する解析を行っているかといった質問、コメントがなされた。

これらの質問に著者は臨床データ、他施設からの報告、論文発表していないデータを適宜引用し、的確に応答した。従って、本研究は著者が主導して行い、論文としてまとめたことが確認された。また、前立腺がん、遺伝子改変モデルマウス、シグナル伝達に関して卓越した知識を有することが確認された。

従って、主査・副主査は合議の上、提出された学位論文が確かにDe Velasco氏の研究成果であり、学位授与にふさわしい学識と研究能力を併せ持つものと判断し、最終試験を合格と判定した。

3) 最終試験の結果：

合格

4) 学位授与の可否：

可

博士學位論文最終試験結果の報告書

平成 29 年 4 月 12 日

審査委員

主 査 岡田 斉



副主査 光富 徹哉



副主査 中川 和彦



副 査



学位申請者氏名

Marco Antonio De Velasco

論文題目

Efficacy of targeted AKT inhibition in genetically engineered mouse models of PTEN-deficient prostate cancer
(PTEN不活性化遺伝子改変マウス前立腺癌モデルにおけるAKT分子を標的とした治療効果について)

要 旨

本研究では前立腺上皮特異的Pten欠損マウスおよびPten/p53複合欠損マウスを使用して新規AKT阻害薬の治療効果を、薬剤活性動態、抗腫瘍効果、長期生存の観点から評価した。

PSAプロモーターにより誘導されるCre recombinaseトランスジェニックマウスとコンディショナルPten欠損マウス交配により樹立した前立腺がんモデルを用いてAZD5363の抗腫瘍効果を生化学的、組織学的、個体レベルで解析した。また、去勢後に出現する去勢抵抗性前立腺がん（CRPC）に対するAZD5363の抗腫瘍効果を同様に評価した。長期生存に及ぼす影響はより進行の早い腫瘍を発症するPten/p53複合欠損マウスを用いて評価した。個体レベルでの薬力学的効果はAZD5363投与後、継続的に腫瘍組織を採取し、AKTのリン酸化とその下流シグナルのFOXO1、GSK3-β、S6、4EBP1のリン酸化について評価し、これらが用量依存的に減少すること等が示された。また、STAT3、ERKのリン酸化が亢進し、代償経路と考えられた。

AZD5363は去勢前のアンドロゲン依存性前立腺がん（CNPC）及び去勢抵抗性前立腺がん（CRPC）に対しての抗腫瘍効果を発揮した。組織学的染色にて増殖能の低下、アポトーシスの亢進、AKT経路のリン酸化阻害を認めた。一方、ERK、STAT3のリン酸化が亢進している部位が存在し、代償経路と腫瘍不均一性の存在を示した。遠隔転移を示すPten/p53複合欠損マウスではAZD5363投与により転移が抑制され、長期生存率は有意に改善した。

公聴会では、①PI3K/AKT活性化の程度、腫瘍の多様性、②AZD5363の薬理学的特徴、③腫瘍の評価方法の妥当性、④去勢術と腫瘍効果との関連性、⑤全身状態と生存率・治療効果の関連性、⑥アンドロゲンレセプター依存性・日依存性の機序などに関する質疑がなされ、申請者によりの確な回答をされた。以上により、本研究は申請者によるものと確認され、最終試験に合格、学位を授与するにふさわしいものであると判断された。