

# 前立腺に起因した難治性疾患に対する新規治療薬創製を指向した各種病態モデルの有用性検討

吉田, 昇平

<https://hdl.handle.net/2324/7329556>

---

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士（創薬科学）, 論文博士  
バージョン :  
権利関係 :



# 博士論文

前立腺に起因した難治性疾患に対する新規治療薬創製  
を指向した各種病態モデルの有用性検討

2024 年 07 月 05 日

大鵬薬品工業株式会社

吉田 昇平

## 目次

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 序論 .....                                                              | 5  |
| 第一章 新規排尿障害治療薬の創製を目的とした下部尿路閉塞ラットの収縮不全型<br>排尿筋過活動モデルとしての有用性検討 .....     | 12 |
| 1. 背景及び目的 .....                                                       | 12 |
| 2. 方法 .....                                                           | 14 |
| 2.1 実験動物 .....                                                        | 14 |
| 2.2 化合物 .....                                                         | 14 |
| 2.3 病態モデルの作製 .....                                                    | 14 |
| 2.4 排尿機能評価方法（シストメトリー法） .....                                          | 16 |
| 2.5 排尿機能筋収縮力の <i>in vivo</i> 評価方法 .....                               | 18 |
| 2.6 組織学的解析 .....                                                      | 19 |
| 2.7 統計解析 .....                                                        | 20 |
| 3. 結果 .....                                                           | 22 |
| 3.1 下部尿度閉塞モデルによる神経脱落の確認と TAC-302 の蛋白遺伝子産物 9.5<br>陽性領域への影響（試験 1） ..... | 22 |
| 3.2 下部尿度閉塞モデルによる神経脱落と排尿機能障害の関連性の確認（試験 1）<br>.....                     | 24 |
| 3.3 下部尿度閉塞ラット排尿障害モデルにおける排尿筋収縮力の評価（試験 2）                               | 29 |
| 4. 考察 .....                                                           | 33 |
| 5. 小括 .....                                                           | 40 |
| 第二章 新規去勢抵抗性前立腺癌治療薬の創製を目的とした各種アンドロゲン受容<br>体活性化モデルの有用性検討 .....          | 41 |
| 1. 背景及び目的 .....                                                       | 41 |
| 2. 方法 .....                                                           | 43 |

|     |                                                                                        |    |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 | 細胞.....                                                                                | 43 |
| 2.2 | 使用薬剤.....                                                                              | 44 |
| 2.3 | 実験動物.....                                                                              | 45 |
| 2.4 | アンドロゲン受容体過剰発現モデルの先行抗アンドロゲン剤耐性モデルとしての有用性の検討 .....                                       | 45 |
| 2.5 | 変異型アンドロゲン受容体発現モデルの先行抗アンドロゲン剤耐性モデルとしての有用性.....                                          | 47 |
| 2.6 | アンドロゲン受容体バリエント 7 発現モデルの先行抗アンドロゲン剤耐性評価系としての有用性.....                                     | 48 |
| 3.  | 結果.....                                                                                | 51 |
| 3.1 | アンドロゲン受容体過剰発現による先行抗アンドロゲン剤耐性モデルの構築.....                                                | 51 |
| 3.2 | リガンド結合部位の変異型アンドロゲン受容体発現による先行抗アンドロゲン剤耐性モデルの構築 .....                                     | 54 |
| 3.3 | アンドロゲン受容体バリエント 7 発現エンザルタミド耐性モデル評価系の構築とアンドロゲン受容体バリエント 7 の機能評価 ( <i>in vitro</i> ) ..... | 62 |
| 3.4 | アンドロゲン受容体バリエント 7 発現エンザルタミド耐性モデル評価系の構築と TAS3681 の有効性の評価 ( <i>in vivo</i> ) .....        | 64 |
| 4.  | 考察.....                                                                                | 73 |
| 5.  | 小括.....                                                                                | 80 |
|     | 総括 .....                                                                               | 81 |
|     | 参考文献.....                                                                              | 83 |
|     | 本論文内容に関する発表論文 .....                                                                    | 88 |
|     | 謝辞 .....                                                                               | 89 |

略語一覧

| 略語                    | 定義                                                           |                          |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Ach                   | Acetylcholine                                                | アセチルコリン                  |
| $\alpha$ 1-AR blocker | Alpha 1 adrenaline receptor blocker                          | アドレナリン $\alpha$ 1 受容体遮断薬 |
| GAPDH                 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                     | グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ  |
| CCNA2                 | Cyclin A2                                                    | サイクリン A2                 |
| CDC2                  | Cell division cycle 20                                       | 細胞分裂周期 20                |
| CDK2                  | Cyclin-dependent kinase 1                                    | サイクリン依存性キナーゼ 1           |
| UBE2C                 | Ubiquitin conjugating enzyme E2 C                            | ユビキチン結合酵素 E2C            |
| RT-qPCR               | Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction | 定量的逆転写 PCR               |
| DHT                   | Dyhydrotestosterone                                          | ジヒドロテストステロン              |
| DMSO                  | Dimethyl Sulfoxide                                           | ジメチルスルホキシド               |
| siRNA                 | small interfering RNA                                        | 短鎖干渉 RNA                 |
| mRNA                  | messenger RNA                                                | メッセンジャーRNA               |

## 序論

現在我が国は、人口の 4 人に 1 人が 65 歳以上の高齢者に該当するという超高齢化社会を迎えている。高齢化に伴い、増加する男性固有の疾患として前立腺肥大症あるいは前立腺癌が挙げられる[1, 2]。これら疾患におけるアンメットメディカルニーズを探索し、治療オプションを提供することは、製薬企業の責務である。

高齢者における身体機能や認知機能の衰えから、排泄の問題が日常生活において大きな負担になる例は少なくない。前立腺肥大症は、高齢男性の下部尿路症状の原因として最も頻度が高い疾患である。前立腺肥大症の進行は、前立腺移行部（尿道周囲）における間質細胞および上皮細胞の増殖を特徴とし、これにより尿道が圧迫され、下部尿路閉塞が発症し、その結果、下部尿路症状、尿閉、不完全な膀胱排出による感染症などの臨床症状が現れる[3]。前立腺肥大症患者における下部尿路症状の治療は、行動療法や  $\alpha 1$  遮断薬やホスホジエステラーゼ 5 阻害剤などの薬物療法により行われるが、30mL 以上の前立腺腫大を伴う場合は、 $5\alpha$  還元酵素薬、過活動膀胱症状が認められる場合は、抗コリン薬やアドレナリン  $\beta 3$  受容体遮断薬といった治療オプションが選択可能である。一方、長期にわたる未治療の状態は、排尿筋の長期的な変化（排尿筋過活動と収縮力の低下の両方）につながる可能性がある。特に、収縮不全型排尿筋過活動という病態は、蓄尿時には排尿筋過活動、排尿時には低活動となる非常に複雑な病態であることから、しばしば既存の薬剤による治療が困難である（図 1）。すなわち、収縮不全型排尿筋過活動

を呈する患者の下部尿路症状における蓄尿障害（排尿筋過活動）に対して処方される抗コリン薬は、膀胱閉塞を悪化させることがあり、アドレナリン $\alpha 1$ 受容体遮断薬（ $\alpha 1$ -AR blocker）は、残尿量に対して効果が不十分である。また一方で、排尿障害（排尿筋低活動）に対して処方されるコリンエステラーゼ阻害薬は、十分に排尿を改善しないことが報告されている[4]。収縮不全型排尿筋過活動は、相反する2つの病態が同時に存在することから、それらを同時に改善しうる臨床上有効な治療薬が存在しない。

また、高齢化に伴うもう一つの男性固有の疾患として、前立腺癌が挙げられる。前立腺癌と診断された後の初期治療として、「手術（外科治療）」、「放射線療法」などの局所治療に加えて、前立腺癌が、男性ホルモン（アンドロゲン）依存的に増殖する癌であるという特徴を有することから、アンドロゲンの分泌や機能を抑える「内分泌療法（精巣摘出術を含む）」が選択される。しかし、内分泌療法による効果は永久に持続するものではなく、約3年で抵抗性を示すようになり、アンドロゲンレベルが低く抑えられているにも関わらず、再び癌が増殖（再燃）し始める。再燃した癌は、去勢抵抗性前立腺癌と診断され、やがて骨やリンパ節、肝臓、肺などへの転移を起こし、それぞれの臓器に特徴的な症状を引き起こす。転移性去勢抵抗性前立腺癌と診断された場合、5年生存率は、わずか30%となり、致命的である[5]。去勢抵抗性前立腺癌の治療には、エンザルタミドや酢酸アピラテロンなどのアンドロゲン受容体シグナル阻害剤（第二世代抗アンドロゲン剤）が用いられ、どちらも去勢抵抗性前立腺癌の治療に有効である。しかしなが

ら、これらの第二世代抗アンドロゲン剤による治療中に、ほとんどの患者は、これら阻害剤に対する耐性を獲得し、しばしば他の第二世代抗アンドロゲン剤に対する交差耐性を示す（図 2）。この難治性の病態への新たな治療オプションの提供やアンメットニーズの充足は急務であるが、いまだ有効な治療薬がない。

臨床試験における開発候補化合物の有効性を示す期待値の高い創薬を進める上で、病態の解明と、それに続く臨床への外挿性の高い病態モデル系（*in vitro, in vivo*）を作製および、それら開発候補化合物の評価は、極めて重要である。しかしながら、非臨床で使用可能な収縮不全型排尿筋過活動モデルあるいは、去勢抵抗性前立腺癌におけるアンドロゲン受容体シグナル阻害剤耐性モデルで、臨床外挿性の高いモデルはない。

上記の背景を踏まえ、本研究では、第一章では、収縮不全型排尿筋過活動の病態の発症機序、第二章では、去勢抵抗性前立腺癌における第二世代抗アンドロゲン剤耐性機序について既存情報を基に整理し、それを模した病態モデル及び評価系を構築することを目的とした。また、各疾患の難治性病態発生の機序に着眼した新薬候補化合物を用いて、構築した病態モデル系で評価することにより、各評価系の妥当性を確認した。

近年、臨床および非臨床の知見をもとに、膀胱壁における神経脱落と下部尿路症状との関連性が示唆されており、膀胱壁における神経障害が蓄尿症状あるいは排尿症状両方を引き起こしていると可能性が示唆されている[6](図 3)。非臨床研究においては、膀胱の神経脱落を示す下部尿路症状の実験モデルとして下部尿路閉塞ラット動物モデルがし

ばしば用いられている[7]。しかしながら、非臨床研究において、神経脱落と各排尿機能パラメータとの関連性を検討した報告はない。本研究では、下部尿路閉塞動物モデルで認められる膀胱壁の神経脱落と排尿機能障害の関連性に着目し、第一章前半では、神経脱落介在性排尿機能低下モデルとしての下部尿路閉塞モデルの有用性を評価した。次に、本研究では、非臨床研究における下部尿路閉塞モデルの収縮不全型排尿筋過活動モデルとしての有用性、すなわちその病態における排尿筋収縮力低下の有無を判断するために、下部尿路閉塞モデルの排尿筋収縮力の評価方法に着目した。臨床における収縮不全型排尿筋過活動の診断は、膀胱内圧・尿流同時測定にて、蓄尿時の排尿筋過活動と排尿時の排尿筋収縮不全（ノモグラム解析が有効）の確認により実施する。そこで、第一章後半では、臨床のノモグラム[8]解析を参考にして、下部尿路閉塞モデルを用いた新たな排尿筋収縮力の評価方法を検討することで、収縮不全型排尿筋過活動モデルとしての下部尿路閉塞ラットモデルの有用性を評価した。また、*in vitro/in vivo* にて神経突起伸長作用を有するシクロヘキセン脂肪アルコール誘導体として、TAC-302 が見出された[9-11]。第一章では、収縮不全型排尿筋過活動ラットモデルの新規構築に加え、同モデルを用いて TAC-302 の効力を評価し、同モデルの妥当性を確認した。

臨床における第二世代抗アンドロゲン剤耐性腫瘍は、異種細胞集団で形成され、その耐性機序は複雑である。近年、臨床研究では、特にアンドロゲン受容体過剰発現、変異アンドロゲン受容体や、リガンド結合部位を欠くアンドロゲン受容体スプライシングバ

リアントの出現、代替 AR 経路の活性化などが第二世代抗アンドロゲン剤の耐性に寄与することが報告されている（図 4）[12, 13]。非臨床研究においては、LNCaP-abl、C4-2b、22Rv1 など、アンドロゲン遮断やアンドロゲン受容体シグナル阻害剤に対する抵抗性メカニズムを反映するさまざまな細胞株が開発されているが、各耐性機序の研究に適した汎用性の高い細胞株や研究ツールはない[14-16]。第二章では、これまでに得られている臨床情報をもとに、これらの第二世代抗アンドロゲン剤耐性機序を模した非臨床モデルを構築し、第二世代抗アンドロゲン剤の感受性を評価することで、第二世代抗アンドロゲン剤耐性モデルとしての有用性を検討した。第二世代抗アンドロゲン剤耐性機序を克服するために、アンドロゲン受容体発現量を低下させる作用を併せ持つ新規抗アンドロゲン剤（TAS3681）を合成開発した。第二章では、去勢抵抗性前立腺癌耐性の病態を模した非臨床病態モデルを構築することに加え、同モデルにおける TAS3681 の効力を評価することで、去勢抵抗性前立腺癌の先行抗アンドロゲン剤耐性モデルの妥当性を確認した。

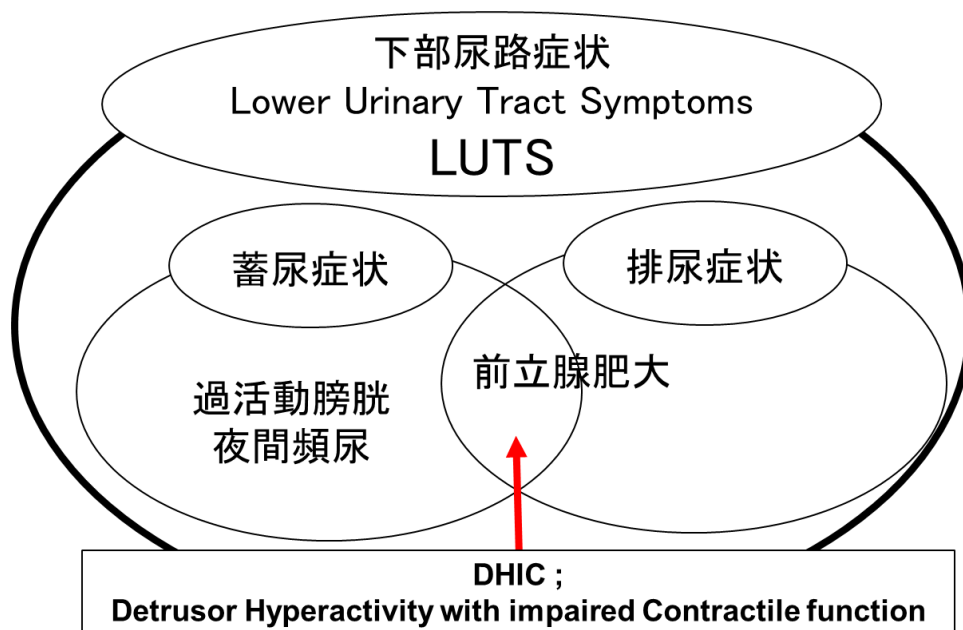


図1 下部尿路症状（LUTS）と収縮不全型排尿筋過活動（DHIC）

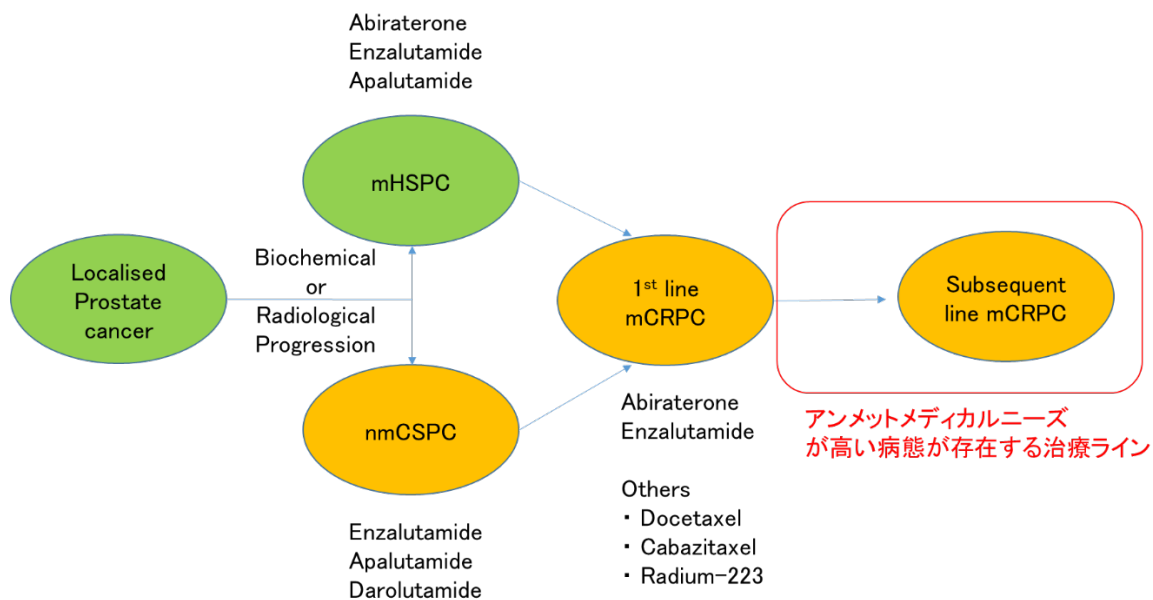


図2 前立腺癌の治療経路とアンメットメディカルニーズが残る治療ライン

[17]一部改変

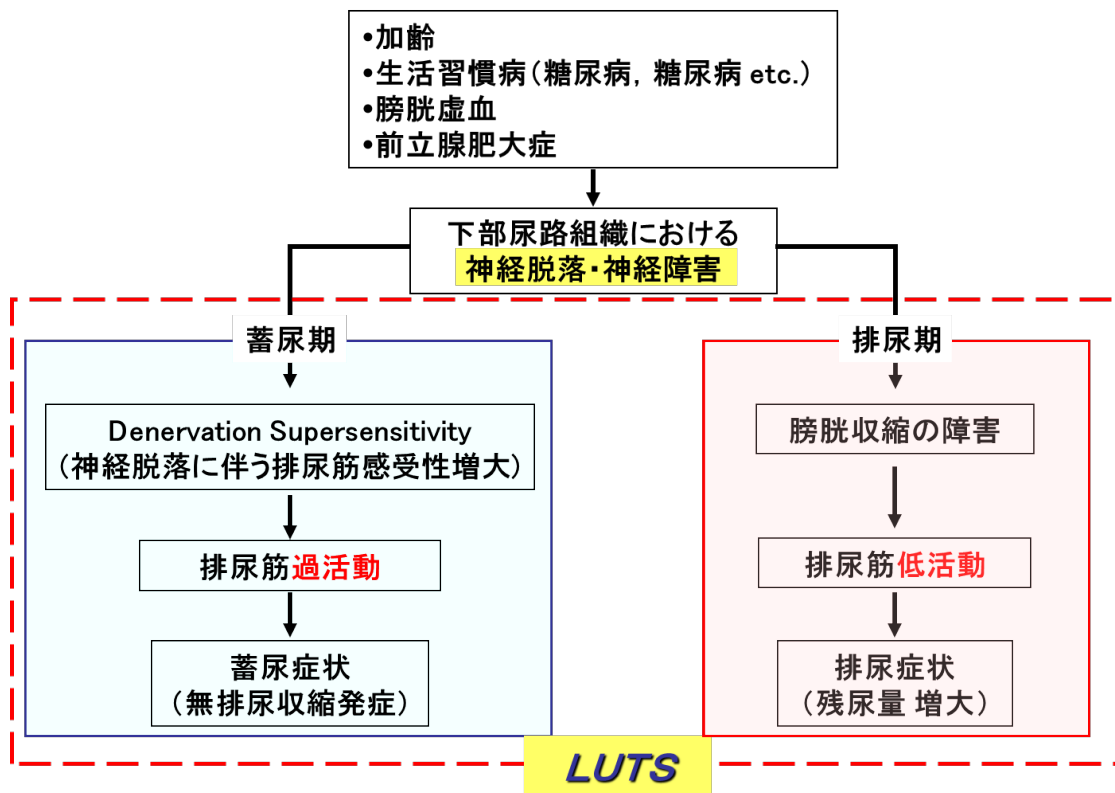


図 3 下部尿路症状（LUTS）の発症メカニズム仮説

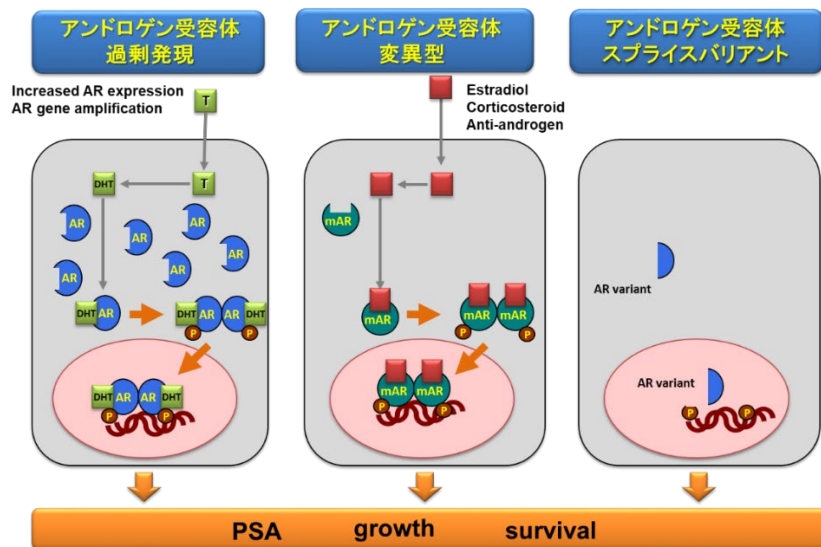


図 4 耐性前立腺癌の機序

アンドロゲン受容体, AR; 変異型アンドロゲン受容体, mAR

# 第一章 新規排尿障害治療薬の創製を目的とした下部尿路閉塞ラットの収縮不全型排尿筋過活動モデルとしての有用性検討

## 1. 背景及び目的

国際失禁学会の用語集における定義によると、下部尿路症状は蓄尿症状、排尿症状、排尿後症状の3つのカテゴリーに分類される[18]。平均寿命が延びるにつれて、下部尿路症状の病態生理を研究することは、高齢患者の生活の質を改善し、医療費を削減するために重要である。下部尿路症状は、特に加齢、メタボリックシンドローム（糖尿病など）、前立腺肥大症などによって引き起こされる。近年、慢性虚血や膀胱の酸化ストレスによって引き起こされる部分的な神経脱落が、下部尿路症状の原因として注目されている[6]。

実際、薬理学的研究により、膀胱出口閉塞を伴う排尿筋過活動患者の排尿筋切片は、アセチルコリン（ACh）に対して過敏であり、神経介在性収縮力が低下していることが明らかにされ、膀胱におけるACh作動性神経脱落の存在が示唆された[19]。また、組織学的研究でも、下部尿路閉塞患者の膀胱で神経脱落が認められた[20]。しかし、下部尿路症状と膀胱の神経脱落との関係については不明な点が多い。

下部尿路閉塞モデル動物では、膀胱の充満期に無排尿性収縮がみられ、臨床例の排尿筋過活動と類似している[7]。さらに、下部尿路閉塞は残尿量の増加を引き起こす[21]。また、下部尿路閉塞は、膀胱における神経密度を低下させる[7]。したがって、基礎研究において

は、膀胱の神経脱落を示す下部尿路症状の実験モデルとして下部尿路閉塞動物モデルがしばしば用いられている。

そこで、本章では、下部尿路閉塞ラットモデルを用い、膀胱機能を蓄尿症状のパラメータである無排尿収縮と、排尿症状のパラメータである残尿量に切り分け、それぞれのパラメータと膀胱の神経脱落との相関を評価した。さらに、下部尿路閉塞ラットモデルにおける排尿機能パラメータを基に算出した排尿筋収縮力を評価することで、本モデルの収縮不全型排尿筋過活動モデルとしての有用性を検討した。

トリメチルシクロヘキセン酸長鎖脂肪アルコールである TAC-302 は、培養中枢神経細胞において cell viability の改善作用（神経保護作用）および神経突起伸長作用を示し[9]、TAC-302 の腹腔内投与は、ラットの脳における神経細胞死を予防し、神経変性疾患の筋萎縮性側索硬化症トランスジェニックマウスモデルにおいて運動能力の保護効果を示す新規化合物である[10]。また、齋藤らは、TAC-302 を投与した下部尿路閉塞ラットの膀胱における神経線維束の密度が、非投与の下部尿路閉塞ラットに比べて多かったことを報告している[11]。本研究では、新薬候補化合物である TAC-302 をツール化合物として用い、本病態モデルで認められる神経脱落の改善と、排尿機能の各パラメータ値の改善との相関性、および排尿筋収縮力の改善について評価し、本モデルの収縮不全型排尿筋過活動モデルとしての妥当性について確認した。

## 2. 方法

### 2.1 実験動物

動物実験は、大鵬薬品工業株式会社の施設動物倫理委員会が定めたガイドラインに従って実施した。大鵬薬品工業株式会社 本試験では、Wistar または Sprague-Dawley の雌性ラット（日本チャールス・リバー、神奈川県）を使用し、餌と水を自由に摂取できるように制御された環境（ $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12 時間の明暗サイクル）で飼育した。

### 2.2 化合物

TAC-302 ((3-(15-hydroxypentadecyl)-2,4,4-trimethyl-2-cyclohexen-1-one)) は大鵬薬品工業株式会社（つくば市、日本）により合成された（Fig. 1-1）。 $\alpha$  1-AR blocker であるタムスロシン塩酸塩は、シグマアルドリッチ合同会社より購入した。

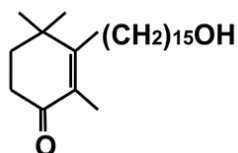


Fig. 1-1 TAC-302 の構造

### 2.3 病態モデルの作製

下部尿路閉塞は、以前に報告されたように、イソフルラン麻酔下で9週齢の雌性 Sprague-Dawley ラットの尿道近位部を結紮することにより作製した(4)。すなわち、イソフルラ

ン（2-3%吸入）麻酔下で、下腹部正中線切開により膀胱と尿道近位部を露出させた。試験 1（下部尿路閉塞モデルによる神経脱落と排尿機能障害の関連性の確認）においては、直径 1.20 mm、試験 2（下部尿路閉塞モデルによる神経脱落と排尿筋収縮力の関連性の確認）では、直径 1.57 mm のステンレス鋼の棒を尿道と平行に置き、3-0 絹の結紮具を尿道近位部と棒の周囲に結んだ。ロッドを抜去後、腹部切開を閉鎖し、術後感染を予防するためにセファゾリンナトリウム（7 mg/kg、皮下）を全ラットに投与した。偽手術ラットは、尿道の結紮以外は同様の処置を受けた。試験 1 においては、手術翌日、下部尿路閉塞ラットを 3 群に分け、2% Tween80<sup>®</sup>含有のヒドロキシメチルセルロース（溶媒）または TAC-302（3, 30 mg/kg）を 1 日 2 回経口投与し、膀胱測定を行うまで 4 週間続けた（Fig. 1-2A）。試験 2 においては、手術の 2 週間後、下部尿路閉塞ラットを 3 群に分け、6% Gelucire<sup>®</sup> 44/14（溶媒）（Gattefossé 社、Saint-Priest、フランス）または TAC-302（3, 10 mg/kg）を 1 日 2 回経口投与し、膀胱測定を行うまで 4 週間続けた（Fig. 1-2B）。偽手術ラットには溶媒を 1 日 2 回経口投与した。尿道結紮の解除は膀胱測定の前 1 日以前まで行わなかった。試験 2 においては、上記と同様の手順で作製した下部尿路閉塞ラットを用いて、膀胱測定時にタムスロシン（3.0  $\mu$ g/kg、生理食塩水にて溶解）を静脈内投与した。

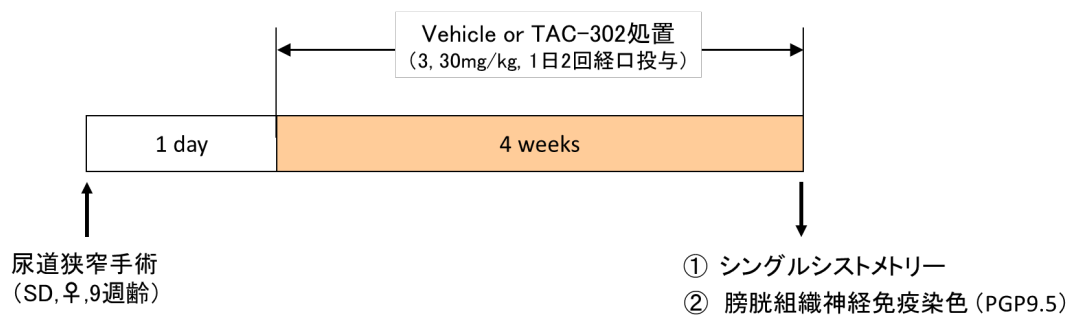


Fig. 1-2A 試験 1 の TAC-302 投与スケジュール

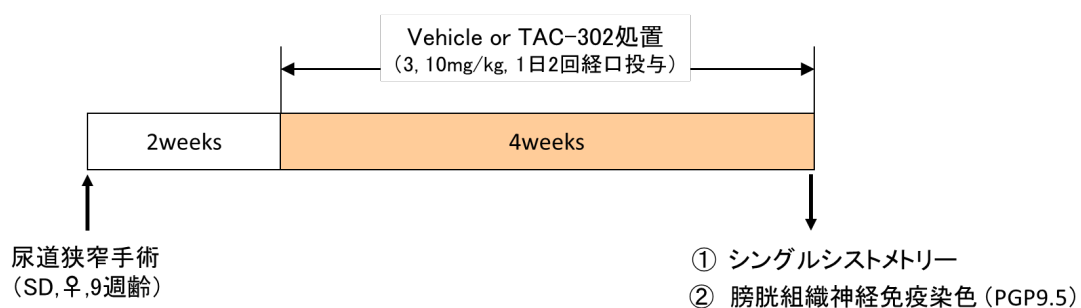


Fig. 1-2B 試験 2 の TAC-302 投与スケジュール

## 2.4 排尿機能評価方法（シストメトリー法）

試験 1 においては、閉塞の 4 週間後、試験 2 においては、閉塞の 2 週間後または 6 週間後に、イソフルラン麻酔下で PE-160 カテーテルを膀胱に留置した。手術後、麻酔の投与を中止し、ラットを拘束ケージ（山下技研、徳島、日本）に入れた。膀胱内カテーテルは、三方活栓を介して膀胱内圧を記録するための圧力変換器（DX-360；日本光電、東京、日本）と膀胱内に生理食塩水を注入するためのシングルシリンジポンプに接続した（Fig. 1-3A）。電子天秤（GX-200；A&D 社、東京、日本）を拘束ケージ

の下に設置し、排尿量を測定した。膀胱内圧および排尿量は PowerLab システム (ML870 ; AD Instruments 社、オーストラリア、キャッスルヒル) を用いて記録し、データは Chart 5 (ver. ver. 5.5.6; AD instruments) を用いて解析した。ラットの膀胱容量のばらつきはこのモデルの典型的な特徴であるため、生理的食塩水を 3 mL/hr で膀胱内に注入し、馴化した後に、生理的食塩水の注入速度を 1~24 mL/hr に調整し、ラットの膀胱収縮間隔を約 15 分とした。一定の膀胱収縮間隔が観察された後、生理食塩水の注入を停止し、カテーテルを通して膀胱内液を重力で引き抜いて残尿量として測定した。残尿を回収した後、生理的食塩水を再び膀胱内に連続注入した。膀胱容量は、排尿量と残尿量の合計として算出した。排尿効率は  $[(\text{排尿量}/\text{膀胱容量}) \times 100]$  として算出した。無排尿収縮は、蓄尿期のベースライン圧から 5 cmH<sub>2</sub>O 以上の膀胱収縮と定義した。膀胱内圧 (基礎値、閾値、最大値) はシストメトログラムから求めた (Fig. 1-3B)。最大尿流率 (Q<sub>max</sub>) は、排尿時の重量変化を微分し算出した。また、個々のラットから得られる排尿機能パラメータ値は、3~5 回の排尿サイクルの平均化により算出した。試験 2 においては、タムスロシン (3.0 µg/kg, i.v.) 投与群では、個々のラットから得られる投与前値は、2~3 回の排尿サイクルの平均化により算出した。タムスロシンを静脈内投与し、膀胱測定を繰り返し、投与後の排尿機能パラメータを測定し、投与前値と比較した。

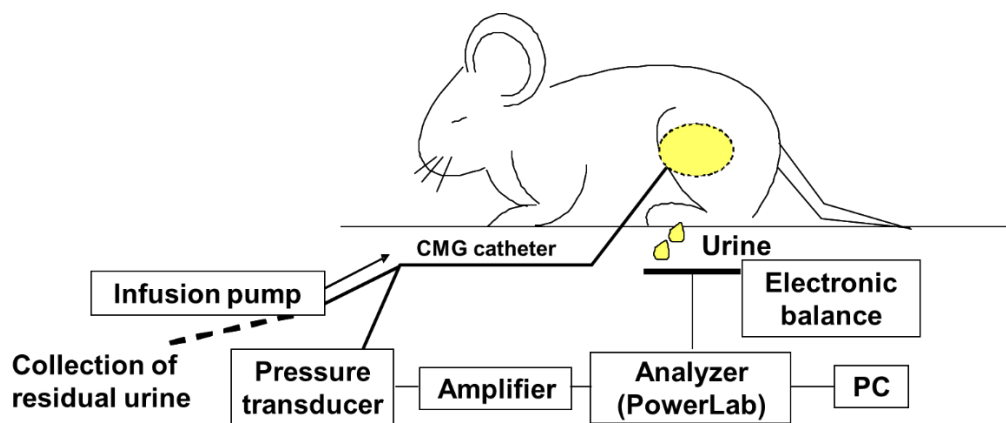


Fig. 1-3A 排尿機能評価方法（シストメトリー法）の模式図

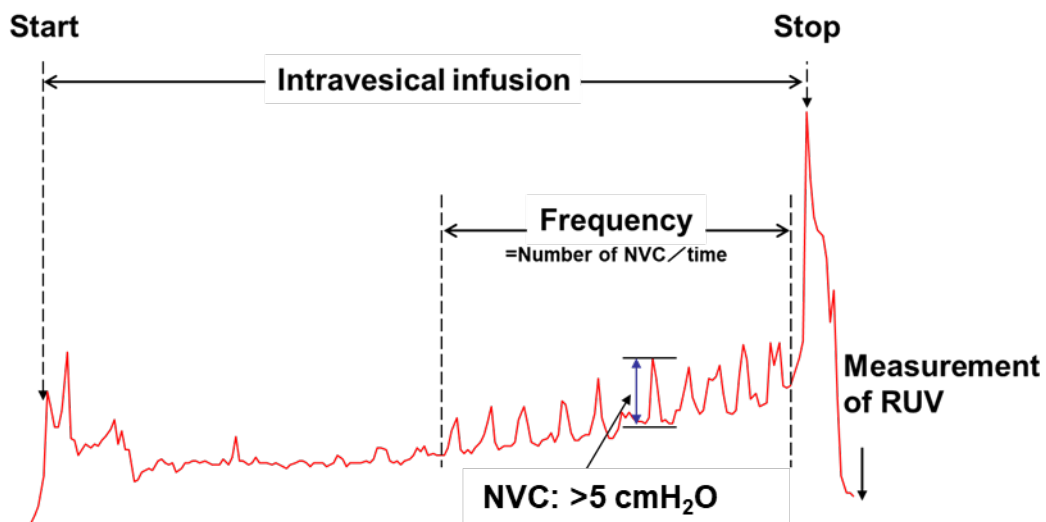


Fig. 1-3B シストメトリー評価における各種膀胱内圧パラメータ

## 2.5 排尿機能筋収縮力の *in vivo* 評価方法

2.4 項で得られたシストメトログラムをもとに、各群の最大尿流率を膀胱容量で除した値を Y 軸に、最大尿流率時の膀胱内圧を膀胱容量で除した値を X 軸にプロット

し、プロットの交点から原点までの距離を測定し、排尿筋収縮力の群間の比較を行った。

## 2.6 組織学的解析

排尿機能測定後、すべてのラットをペントバルビタール (50 mg/kg、i.p.) で深く麻酔し、冷 PBS で左心室から灌流後、膀胱を摘出した。膀胱を正中に沿って割断し、半分を 4%パラホルムアルデヒドを用いて、4℃にて終夜浸漬固定した後、膀胱体部の横断面が評価できるように 3 つに分割した。固定標本は段階的エタノールで脱水し、パラフィンワックスに包埋した。膀胱の中央部から横断切片 (厚さ 3  $\mu$ m) を作成した。神経細胞の細胞質に存在する主要タンパク質であるタンパク質遺伝子産物 9.5 (別名: ユビキチンカルボキシル末端加水分解酵素アイソザイム L1) を汎ニューロンマーカーとして用いた。すなわち、膀胱切片をタンパク質遺伝子産物 9.5 (1:10000、Ultraclone Ltd.、Isle of Wight、UK) に対する抗体と 4℃で一晩インキュベートし、続いて Alexa 488 を結合させた二次抗ウサギ IgG 抗体 (1:400、Invitrogen、Carlsbad、CA) を用いて室温で反応させ、可視化した。膀胱筋層における神経線維の総数または密度を定量的に解析するために、蛍光顕微鏡 (BX60、オリンパス、東京、日本) と Leica Application Suite Version 3.3.0 (オリンパス) を用いて、ラット 1 匹につき 7 カ所 (対物レンズ倍率 20 倍) を撮影した (Fig. 1-4)。撮影箇所は、膀胱体部の外輪筋側から両端を含む、およそ均等な間隔の 7 カ所としたが、それぞれの一が近傍と極端に異なる場合は、そ

の周囲の平均的な像とした。膀胱筋層の神経線維密度を半定量的に解析するために、膀胱平滑筋面積に対するタンパク質遺伝子産物 9.5 陽性の範囲の比率で定義される 3 つのスコアグレードを用いて神経分布範囲をスコア化した。スコアグレード 1~3 は、以下の通り、定義した。

(基準)

神経分布範囲スコア 1 : 広範囲に神経分布がない筋層の領域が全体の 50~100%

神経分布範囲スコア 2 : 広範囲に神経分布がない筋層の領域が全体の 20~50%、

神経分布範囲スコア 3 : 広範囲に神経分布がない筋層の領域が全体の 0~20%

各膀胱の神経分布範囲スコアは、7 フィールドのスコアグレードの合計から算出した。



Fig. 1-4 膀胱組織（体部）と撮影部位

膀胱の断面図（半分に切断したもの）と相対的な撮影位置（□）を示す。

## 2.7 統計解析

データは各群 3~20 匹の平均値±標準誤差で示した。排尿パラメータについては、偽手術群と下部尿路閉塞-溶媒群間および各下部尿路閉塞群間の比較は、対応のない Student の  $t$  検定または Wilcoxon 検定を用いて行った。免疫組織化学的研究では、以

下の比較を行った。偽手術群と下部尿路閉塞投与群間および各下部尿路閉塞投与群間の比較は、Wilcoxon 検定を用いて評価した。 $P$  値が、5%未満を有意とした。

### 3. 結果

#### 3.1 下部尿路閉塞モデルによる神経脱落の確認と TAC-302 の蛋白遺伝子産物

##### 9.5 陽性領域への影響（試験 1）

汎ニューロンマーカーである蛋白遺伝子産物 9.5 に対する抗体（抗蛋白遺伝子産物 9.5 抗体）を用いた免疫組織化学染色において、蛋白遺伝子産物 9.5 陽性領域は、下部尿路閉塞後 4 週間の偽手術ラットの膀胱平滑筋層に広く、高密度に分布していた。しかし、下部尿路閉塞溶媒投与ラットの膀胱平滑筋層では、蛋白遺伝子産物 9.5 陽性領域の密度は明らかに低かった。下部尿路閉塞溶媒投与の膀胱平滑筋層では、偽手術ラットと比較して蛋白遺伝子産物 9.5 陽性領域の密度が明らかに低かった (Fig.1-5A, B)。

下部尿路閉塞溶媒投与群の神経線維密度値は、偽手術ラット群で観察された値の 25% に有意に減少していた。蛋白遺伝子産物 9.5 陽性領域は、偽手術ラットの膀胱平滑筋層に広く高密度に分布していた (Fig. 1-5A)。しかしながら、下部尿路閉塞溶媒投与ラットの膀胱平滑筋層では、蛋白遺伝子産物 9.5 陽性領域の密度は、偽手術ラットに比べて明らかに低かった (Fig. 1-5B)。下部尿路閉塞溶媒投与群の神経分布範囲スコアは、偽手術群に対して約 60%であり、偽手術群と下部尿路閉塞溶媒投与群の間で有意差が認められた (Fig. 1-6)。TAC-302 が *in vivo* で末梢神経細胞に対して保護作用を有するかどうかを調べるため、TAC-302 を 4 週間投与したラットから摘出した膀胱を用いて、神経分布範囲スコアに対する TAC-302 の効果を評価した。膀胱における蛋白遺

伝子産物 9.5 の免疫組織化学的染色は、TAC-302 の経口投与が下部尿路閉塞誘発の膀胱における神経脱落を予防することを示した (Fig. 1-6 C, D)。特に、TAC-302 を投与した下部尿路閉塞群では、下部尿路閉塞溶媒投与群よりも神経分布範囲スコアが有意に高かった (Fig. 1-6)。

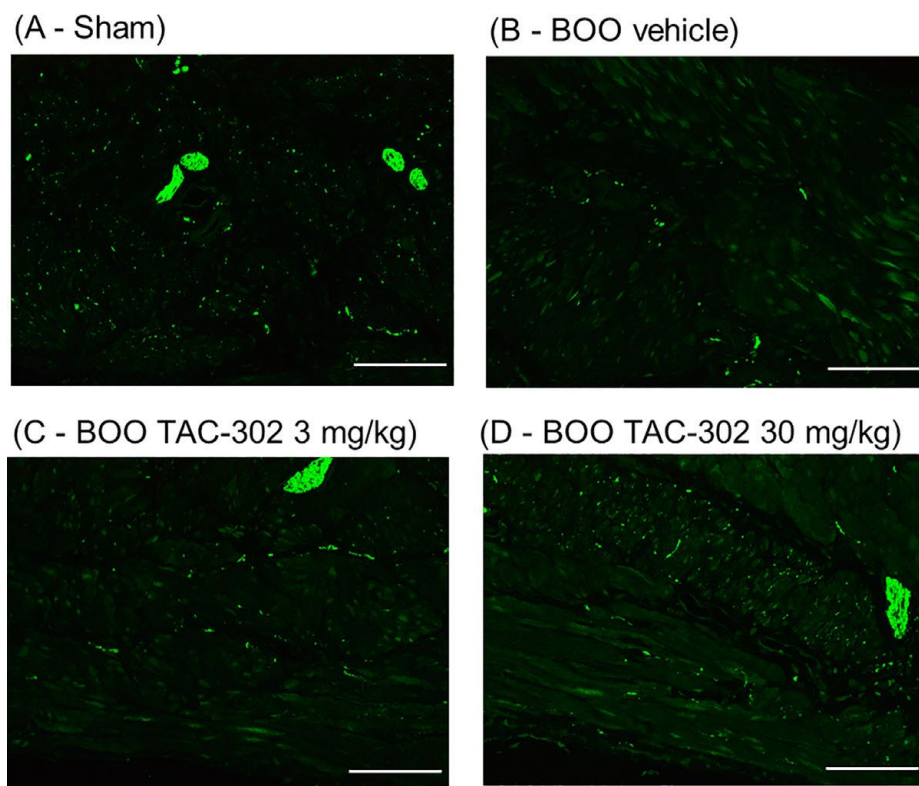


Fig. 1-5 Immunohistochemical staining for protein gene product 9.5 (PGP9.5) in bladders from A, sham, B, Bladder outlet obstruction (BOO) vehicle rats (BOO vehicle), C, 3 mg/kg TAC-302-treated BOO rats, and D, 30 mg/kg TAC-302-treated BOO rats. The criterion of innervation area in the bladder was defined as three grades (scores 1-3) according to the ratio of the PGP9.5-positive area to the detrusor smooth muscle area: A, score 3, 50-100%; B, score 1, 0-20%; C, and D, score 2, 20-50%. Scale bars represent 100 μm.

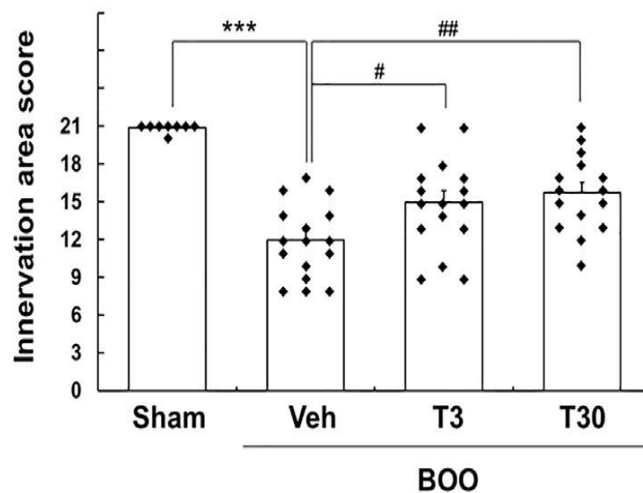


Fig. 1-6 Average innervation area score in the bladder of sham, BOO vehicle, BOO T3, and BOO T30 rats (score range: 0-21). Data are shown as mean  $\pm$  SE. \*\*\* $P$  < 0.001 versus sham group, # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01 versus BOO vehicle group. The number of rats in each group: 8 in sham, 16 each in BOO vehicle and BOO T3, and 15 in BOO T30. Each diamond represents the score of an individual rat.

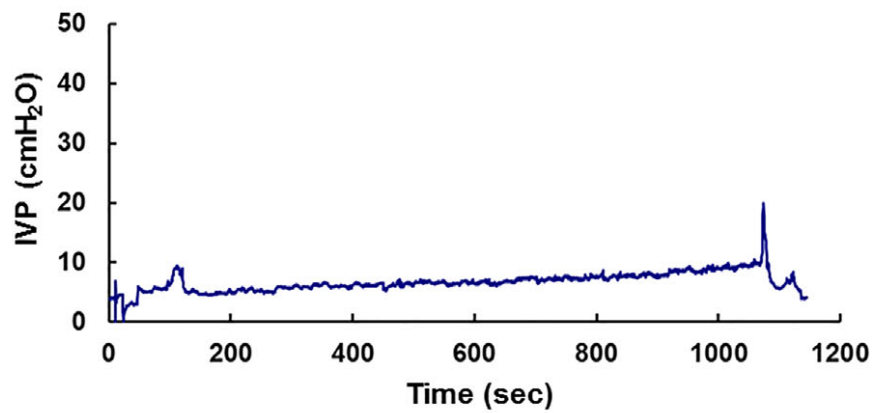
### 3.2 下部尿路閉塞モデルによる神経脱落と排尿機能障害の関連性の確認（試験 1）

Table 1-1 および Fig. 1-7 に、下部尿路閉塞後 4 週間の膀胱機能パラメータをまとめた。

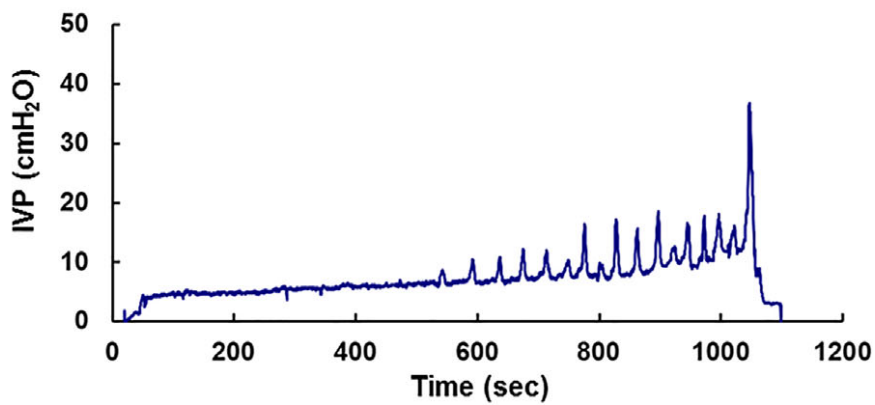
下部尿路閉塞 は、無排尿収縮（蓄尿期における排尿を伴わない排尿筋収縮）を有意に増加させたが、偽手術ラットではこの現象はみられなかった。無排尿収縮の振幅と頻度は、下部尿路閉塞溶媒投与ラットでは偽手術ラットに比べて有意に増加した（Fig. 1-7）。さらに、下部尿路閉塞ラットでは、偽手術ラットと比較して、排尿量、膀胱容量、残尿量が有意に増加し、排尿効率が低下した。TAC-302 は下部尿路閉塞溶媒投与群と比較して体重に影響を与えなかった（平均値 $\pm$ SD、下部尿路閉塞溶媒投与群  $255.5 \pm 5.9$ g、下部尿路閉塞 TAC-302

群  $255.6 \pm 4.5\text{g}$ )。下部尿路閉塞は、偽手術群と比較して膀胱重量の有意な増加を誘導し、下部尿路閉塞溶媒投与群と下部尿路閉塞 TAC-302 群との間で膀胱重量に有意差が認められた (Table 1-1)。TAC-302 を投与した下部尿路閉塞ラットでは、偽手術ラットと同様に無排尿収縮がわずかに観察されたのみであった (Fig. 1-7)。さらに、TAC-302 は下部尿路閉塞溶媒投与群と比較して有意に残尿量を減少させ、排尿効率を増加させた。無排尿収縮や残尿量は、神経分布範囲スコアと弱いながら相関を示し、有意かつ逆相関であった (例えば、無排尿収縮の頻度あるいは、残尿量の偽手術群と下部尿路閉塞溶媒投与群間の相関係数は、それぞれ-0.80 と-0.78 であった) (Fig. 1-8)。これらのことから、膀胱における神経脱落が排尿機能障害に関連していることが示唆された。

(A – Sham)



(B – BOO vehicle)



(C – BOO TAC-302 30 mg/kg)

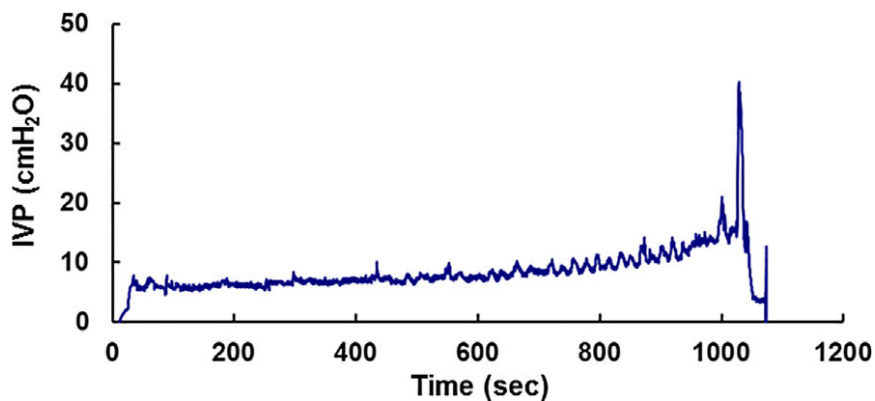


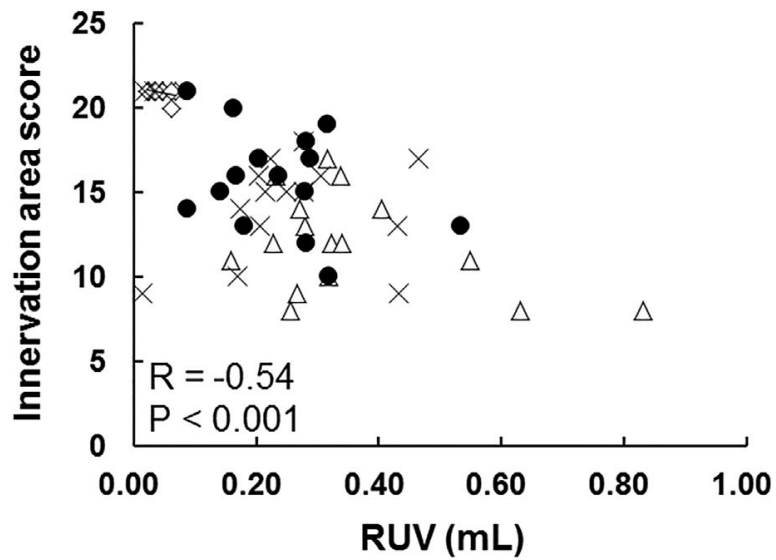
Fig. 1-7 Typical cystometrogram recording charts of A, sham, B, vehicle-treated BOO rat, and C, 30 mg/kg TAC-302-treated BOO rat. IVP, intravesical pressure

Table 1-1 Cystometric parameters in sham, bladder outlet obstruction (BOO vehicle), and TAC-302-treated BOO groups

| Parameters                                | Sham        | BOO<br>Vehicle | BOO TAC-302<br>3 mg/kg | BOO TAC-302<br>30 mg/kg |
|-------------------------------------------|-------------|----------------|------------------------|-------------------------|
| Bladder capacity, mL                      | 1.05 ± 0.11 | 4.57 ± 0.51*   | 3.72 ± 0.45            | 4.26 ± 0.37             |
| Voided volume, mL                         | 1.00 ± 0.11 | 4.21 ± 0.47*   | 3.49 ± 0.43            | 4.03 ± 0.35             |
| Residual urine volume,<br>mL              | 0.05 ± 0.01 | 0.36 ± 0.04*   | 0.23 ± 0.03**          | 0.23 ± 0.03**           |
| Voiding efficiency, %                     | 95.6 ± 0.4  | 91.9 ± 0.5*    | 93.8 ± 0.7**           | 94.6 ± 0.5**            |
| Baseline pressure,<br>cmH <sub>2</sub> O  | 4.9 ± 0.5   | 4.2 ± 0.3      | 4.5 ± 0.4              | 4.5 ± 0.3               |
| Threshold pressure,<br>cmH <sub>2</sub> O | 11.4 ± 0.7  | 13.9 ± 1.0     | 14.1 ± 1.3             | 16.3 ± 1.7              |
| Maximum pressure,<br>cmH <sub>2</sub> O   | 23.7 ± 1.1  | 34.4 ± 1.5*    | 33.2 ± 2.5             | 38.3 ± 1.8              |
| Amplitude of NVC,<br>cmH <sub>2</sub> O   | 1.85 ± 0.76 | 7.20 ± 0.64*   | 5.66 ± 0.60            | 6.37 ± 0.17             |
| Frequency of NVC,<br>times/min            | 0.12 ± 0.07 | 1.56 ± 0.14*   | 1.29 ± 0.19            | 1.06 ± 0.13**           |
| Bladder weight, mg                        | 142.9 ± 7.9 | 644.8 ± 30.2*  | 503.1 ± 40.4**         | 534.1 ± 21.8**          |
| Body weight, g                            | 255.5 ± 5.9 | 255.6 ± 4.5    | 256.1 ± 4.6            | 258.9 ± 6.1             |

Data are shown as the mean ± SE. \* $p < 0.05$  versus sham group. \*\*  $p < 0.05$  versus BOO vehicle group. NVC, non-voiding contraction; T3, 3 mg/kg TAC-302; T30, 30 mg/kg TAC-302.

(A)



(B)

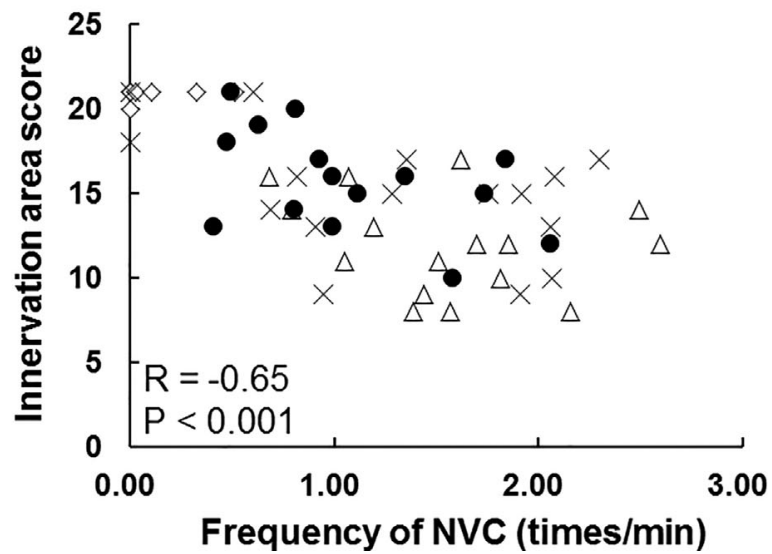


Fig. 1-8 Correlation plots between the innervation area score and cystometric parameters in sham, Bladder outlet obstruction (BOO) vehicle, BOO T3, and BOO T30 rats.

The symbols representing each group are as follows: open diamonds, sham group; open triangles, BOO vehicle group; x, BOO T3 group; closed circles, BOO T30 group. T3 = 3 mg/kg, TAC-302. T30 = 30 mg/kg TAC-302. The number of rats in each group: 8 in sham, 16 each in BOO vehicle and BOO T3, and 15 in BOO T30. The correlation coefficients of the frequency of NVC and RUV were evaluated among the sham, BOO vehicle, BOO T3, and BOO T30 groups. RUV: 残尿量、NVC: 無排尿収縮

### 3.3 下部尿路閉塞ラット排尿障害モデルにおける排尿筋収縮力の評価（試験 2）

次に、膀胱における神経脱落と排尿筋収縮力の関連性を *in vivo* で評価するため、下部尿路閉塞モデル作製から 6 週後（TAC-302 あるいは溶媒を、モデル作製後 2 週~6 週の間投与）においてシストメトリーを実施した。3.2 で得られた結果と同様に、TAC-302 を投与した下部尿路閉塞ラットでは、偽手術ラットと同様に無排尿収縮がわずかに観察されたのみであった。さらに、TAC-302 は下部尿路閉塞溶媒投与群と比較して有意に残尿量を減少させ、排尿効率を増加させた（Fig. 1-9, Table 1-2）。一方、 $\alpha$ 1-AR blocker であるタムスロシンは、投与前値に比べ、有意に無排尿収縮の頻度を低下させるものの、残尿量は改善しなかった（Table 1-3）。本研究では、排尿筋収縮力を評価するために、取得した膀胱機能パラメータをもとに、最大尿流率を膀胱容量で除した値あるいは、最大尿流率時における膀胱内圧を膀胱容量で除した値を抽出し、それぞれの値を Y 軸および X 軸にプロットしたところ、原点からの距離は下部尿路閉塞溶媒投与ラットで有意に減少した（Fig. 1-10A）。さらに、下部尿路閉塞 TAC-302 群における原点からの距離は、下部尿路閉塞溶媒投与群に比し有意に遠く、偽手術群に近かった。しかし、タムスロシン投与群では、原点からの距離は投与前と変わらなかった（Fig. 1-10B）。

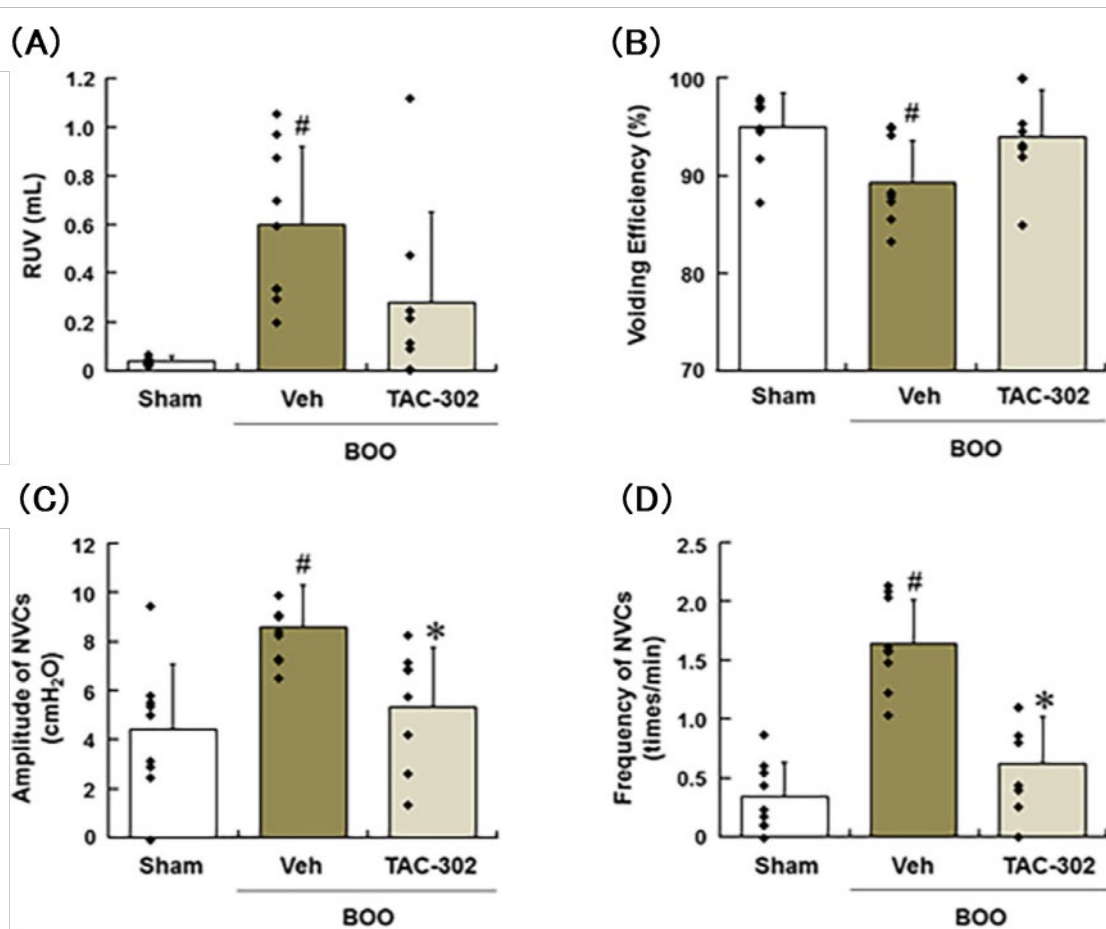


Fig. 1-9 The effects of TAC-302 on cystometric parameters in sham-operated rats compared to BOO vehicle rats and BOO TAC-302 rats. (A) residual urine volume, (B) voiding efficiency, (C) amplitude, and (D) frequency of NVCs. Data are shown as means + SEM. Number of rats in each group: 9 in sham and BOO vehicle groups, and 8 in the BOO TAC-302 group. #  $p < 0.05$  versus sham group, \*  $p < 0.05$  versus BOO vehicle group

Table 1-2 閉塞 6 週後の偽手術群、下部尿路閉塞（BOO）溶媒投与群および BOO TAC-302 群の膀胱機能パラメータ

| Parameters                             | Sham group  | BOO vehicle group | BOO TAC-302 group |
|----------------------------------------|-------------|-------------------|-------------------|
| Bladder capacity, mL                   | 0.92 ± 0.34 | 5.53 ± 1.83**     | 3.65 ± 2.24       |
| Voided volume, mL                      | 0.88 ± 0.34 | 4.94 ± 1.62**     | 3.37 ± 1.94       |
| Baseline pressure, cmH <sub>2</sub> O  | 4.4 ± 1.4   | 3.0 ± 1.5         | 6.1 ± 2.7*        |
| Threshold pressure, cmH <sub>2</sub> O | 11.3 ± 4.8  | 13.8 ± 3.8        | 12.9 ± 3.9        |
| Maximum pressure, cmH <sub>2</sub> O   | 29.0 ± 7.6  | 28.9 ± 5.7        | 36.2 ± 9.3        |
| Bladder weight, mg                     | 119 ± 17    | 956 ± 300**       | 645 ± 296*        |

Data are shown as means ± SD. Number of rats in each group: 9 in sham and BOO vehicle groups, 8 in the BOO TAC-302 group. \*  $p < 0.05$  versus BOO vehicle group.

\*\*  $p < 0.05$  versus sham group.

Table 1-3 BOO 誘発膀胱機能障害に対するタムロシン静注の効果

| Parameters                             | Pre         | Post         |
|----------------------------------------|-------------|--------------|
| Bladder capacity, mL                   | 7.90 ± 2.49 | 8.56 ± 2.62  |
| Voided volume, mL                      | 7.31 ± 2.40 | 7.92 ± 2.47* |
| Residual urine volume, mL              | 0.59 ± 0.16 | 0.64 ± 0.19  |
| Voiding efficiency, %                  | 92.2 ± 2.0  | 92.4 ± 1.6   |
| Baseline pressure, cmH <sub>2</sub> O  | 4.4 ± 1.2   | 4.2 ± 1.3    |
| Threshold pressure, cmH <sub>2</sub> O | 21.4 ± 6.7  | 17.7 ± 5.9*  |
| Maximum pressure, cmH <sub>2</sub> O   | 39.1 ± 14.3 | 30.0 ± 7.9*  |
| Amplitude of NVCs, cmH <sub>2</sub> O  | 8.4 ± 1.9   | 8.6 ± 2.3    |
| Frequency of NVCs, times/min           | 1.9 ± 0.6   | 0.7 ± 0.8*   |
| Bladder weight, mg                     | 753 ± 134   | -            |

NVCs, non-voiding contractions. Data are shown as means ± SD. The number of rats is 6.

\*  $p < 0.05$  versus pre value.

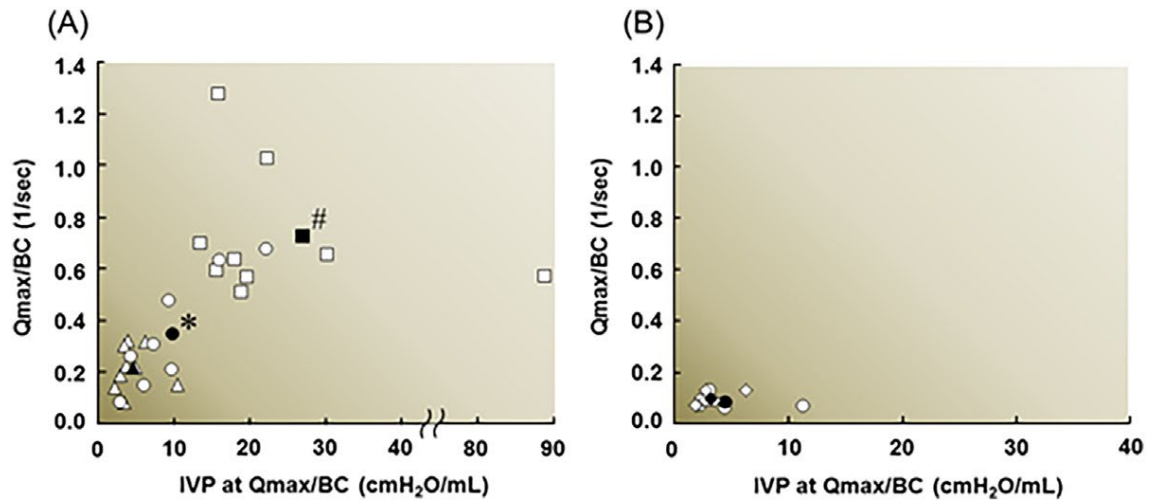


Fig. 1-10 Pressure/flow relationship (A) in sham-operated rats (□), BOO vehicle rats (△), and TAC-302-treated rats (○), (B) pre (○) and post (◇) values in tamsulosin-treated BOO rats. The each closed symbol represents the mean value of each group. Number of rats in each group: 9 in the sham and BOO vehicle groups, 8 in the BOO TAC-302 group, and 6 in the BOO Tamsulosin group. # $p < 0.05$  in the distance from the sham-operated rats, \*  $p < 0.05$  in the distance from the BOO vehicle. Qmax: 最大尿流率、BC:膀胱容量、IVP at Qmax: 最大尿流率時の膀胱内圧

#### 4. 考察

第一章の研究においては、臨床における収縮不全型排尿筋過活動の病態を模した非臨床動物モデルを作製するために、前立腺肥大症で認められる下部尿路症状（蓄尿症状、排尿症状）と神経傷害に着目した。下部尿路閉塞作製4週間後における下部尿路閉塞ラットの膀胱において、偽手術ラットの膀胱に比べて、神経分布範囲スコアが有意に減少することを示した。さらに、下部尿路閉塞モデルラットでは、偽手術ラットと比較して、無排尿収縮の振幅と頻度の増加（蓄尿症状）が認められた。同一個体

から得られた神経分布範囲スコアと蓄尿パラメータを用い、相関関係を評価することで、膀胱における神経脱落と蓄尿パラメータ間に関連があることを明らかにした。

まずは、膀胱における神経脱落と蓄尿パラメータの関連性について考察した。臨床では、下部尿路閉塞を伴う排尿筋過活動や特発性排尿筋過活動の患者の膀胱サンプルでは、神経脱落が起こっていることが報告されている[19, 20, 22]。排尿筋過活動を有する患者に認められるこの現象は、下部尿路閉塞を伴う膀胱平滑筋のアセチルコリンに対する感受性亢進が原因となっていると説明されている。すなわち、下部尿路閉塞排尿筋において、後シナプスにおける Ach の感受性の増加が観察されている[19]。一方、下部尿路閉塞動物モデルの排尿筋を用いた検討においても、同様に膀胱における神経脱落と排尿筋の Ach の感受性亢進が観察されている[23-25]。したがって、排尿筋過活動を有する下部尿路閉塞患者と下部尿路閉塞動物モデルの病態が類似していると考えられる。

次に、膀胱における神経脱落と排尿パラメータの関連性について考察した。今回、ラット下部尿路閉塞モデルでは、偽手術ラットと比較して残尿量の増加（排尿症状）が認められた。同一個体から得られた神経分布範囲スコアと排尿パラメータを用い、相関関係を評価することで、膀胱における神経脱落と排尿パラメータ間に関連があることを明らかにした。一般的に、前立腺肥大および下部尿路閉塞患者のほとんどにおいて、排尿機能障害は尿道抵抗の増大によって引き起こされる。しかし、患者の 3 分の

1 は閉塞部位の解除手術後も排尿症状が持続する[26]。したがって、尿道閉塞のみが、排尿症状の原因ではなく、膀胱の排尿能力の低下が関与していると考えられている[27]。他の調査では、前立腺肥大症による下部尿路閉塞患者では、排尿筋収縮力が低下すると残尿量が増加することが示されている[28]。したがって、排尿筋収縮力の低下は、前立腺肥大症患者における残尿量の増加を部分的に説明できる可能性がある。これまでの研究において、下部尿路閉塞後に起こる排尿筋収縮力低下機序を説明する報告として、下部尿路閉塞患者由来の排尿筋切片を用いた薬理学的な研究において、電気フィールド刺激後の収縮反応が低下する報告がある[19]。また、臨床においても排尿筋収縮力が低下した患者の膀胱標本は神経脱落を示している報告がある[29]。一方、下部尿路閉塞動物の排尿筋を用いた検討においても、排尿筋における神経数が減少し、神経介在性収縮が低下し、神経由来の Ach 遊離量が減少する報告がある[24, 25]。したがって、排尿筋収縮力が低下した下部尿路閉塞患者と下部尿路閉塞動物モデルの病態が類似していると考えられる。

臨床診断においては、排尿筋収縮力は、膀胱から尿を排出するのに必要な尿道内圧（最大膀胱内圧）や最大尿流率などの膀胱内圧パラメータ（Schafer のノモグラム）を用いて推定される。一方、従来の研究において、ラット下部尿路閉塞モデルのシストメトリー試験結果を元に、排尿筋収縮力を評価した報告はない。そこで、第一章後半では、下部尿路閉塞ラットにおける排尿障害を考察するために、新たな手法で排尿筋

収縮力を評価し、下部尿路閉塞モデルで収縮力低下（収縮不全）が認められるかを評価した。下部尿路閉塞モデルから単離した排尿筋を用いた電気フィールド刺激試験における知見から、下部尿路閉塞では電気フィールド刺激に対する排尿筋の収縮力が低下し、コリン作動性神経からの **Ach** の遊離量が減少することから、神経脱落を伴う排尿筋の収縮機能障害が起こっていることを報告したグループもある[24]。しかしながら、*in vivo* 研究では、下部尿路閉塞モデルにおいて排尿筋収縮力は障害されないことが報告されており、これは、単位排尿筋重量あたりの収縮力の低下を意味する[30]。さらに、正常ラットと下部尿路閉塞ラットでは膀胱容量が劇的に異なる。すなわち、下部尿路閉塞ラットの膀胱容量は偽手術ラットの 5-6 倍である。また、最大流量は膀胱容量と排尿量に依存することが知られている[31]。膀胱容量が膀胱内圧および最大尿流率に及ぼす影響を考慮すると、下部尿路閉塞ラットでは最大尿流率および最大尿流率時における膀胱内圧を膀胱容量で補正するのがよいであろうと考えた。この新たな方法による解析の結果、下部尿路閉塞ラットのプロットの原点からの距離は、偽手術ラットよりも下部尿路閉塞溶媒投与ラットでは、原点からのプロットの距離が偽手術ラットよりも短く、このことは下部尿路閉塞ラットでは偽手術ラットよりも有意に排尿筋収縮力が弱いことを示していると考察した。したがって、本モデルが、排尿筋収縮力が低下した排尿筋過活動の病態を模したモデルであると考えられた。

前立腺肥大症患者で認められる排尿障害の薬物治療の第一選択薬である  $\alpha 1$  遮断薬（タムスロシン）は、臨床において、前立腺あるいは尿道平滑筋への作用を介した排尿症状の改善を示すだけでなく、膀胱への作用による蓄尿症状の改善作用も示す[32]。一方、本研究において、下部尿路閉塞モデルでは蓄尿症状を改善したが、排尿症状を改善しなかった。一般的に、排尿筋収縮力が低下した患者における排尿症状にはタムスロシンの有効性は期待されない。このような臨床での知見は、本研究における解析の結果、タムスロシンが排尿筋収縮力を改善しなかった結果と矛盾しない。また、一般的に、排尿筋収縮力が低下した患者には、コリンエステラーゼ阻害薬（ジスチグミン）が使われる。ジスチグミンは、排尿時に排尿筋に投射する神経終末におけるアセチルコリン量を増加させることで排尿筋収縮力を高めることが知られている。しかしながら、ジスチグミンは、排尿時の尿道抵抗の上昇作用を有しており、排尿を十分に改善しない[4, 33]。

収縮不全型排尿筋過活動の治療を考える上で、下部尿路閉塞の過程で起こる神経傷害が、下部尿路機能障害を引き起こしている可能性があることを課題として捉え、*in vitro/in vivo* で神経突起伸長作用を示す TAC-302 の有効性を評価した。その結果、TAC-302 は、神経分布範囲スコアの低下を改善し、排尿筋過活動と排尿筋低活動が混在した複雑な病態に対しても有効性を示した。また、下部尿路閉塞モデルにおける TAC-

302 の投与は、原点からの距離を偽手術群に近づけたことから、神経脱落の改善が排尿筋収縮力の改善に繋がる可能性を示した。

前述の通り、TAC-302 は、培養神経細胞の cell viability の低下を改善する作用（神経保護作用）と、神経突起伸長作用を有する[9]。本研究において、TAC-302 はラット下部尿路閉塞モデルで認められる神経脱落の改善作用を示した。この作用は、TAC-302 による神経保護作用あるいは神経突起伸長作用が、下部尿路閉塞モデルで認められる神経傷害の改善に寄与し、結果的に下部尿路機能症状の改善に繋がったことを示していると考えられる。また、前述のように下部尿路閉塞を有する患者由来の排尿筋切片を用いた薬理学的実験において、電気フィールド刺激下における収縮力が低下していることから、膀胱を支配する節後副交感神経軸索からの Ach 遊離量が低下していることが推察されるが、TAC-302 の投与により、ラット下部尿路閉塞膀胱における神経由来の Ach 遊離量低下が抑制されるデータも得られている[24]。このような非臨床試験データを元に、排尿筋低活動および過活動膀胱有する患者を対象にした TAC-302 の有効性と安全性を評価する臨床試験が計画された。主要評価項目は、膀胱収縮力指数（Bladder Contractility Index ; BCI）であり、TAC-302 投与群とプラセボ投与群の各群においてベースライン（投与前）と投与後 12 週目の BCI 値を比較した。その結果、プラセボ投与群では、投与前後の BCI 値間で変化を認めなかったものの、TAC-302 投与群では、有意な改善を示した[34]。BCI は、ラット下部尿路閉塞モデルの排尿筋収

縮力の算出に用いたシストメトリーパラメータと同様に、最大尿流率と最大尿流率時の排尿筋圧から算出される。臨床において TAC-302 が BCI を改善したことは、今回 TAC-302 がラット下部尿路閉塞モデルで算出した排尿筋収縮力を改善した結果と一致する。また、副次評価項目として、ベースラインの排尿効率に対する投与後 12 週目の排尿効率を変化率で算出し、TAC-302 投与群とプラセボ投与群間で比較した。その結果、ベースラインに対する投与後 12 週目の排尿効率の変化率は、プラセボ投与群の変化率と比べ有意に高値を示した[34]。この知見は、今回 TAC-302 がラット下部尿路閉塞モデルにおいて残尿量の改善に伴い排尿効率も改善した結果と一致する。これらの TAC-302 の臨床および非臨床試験の結果から、本研究において構築したラット下部尿路閉塞モデルが、臨床外挿性が高いモデルである可能性があることを示している。

正常な排尿機能において、膀胱へ投射する副交感神経だけでなく、膀胱からの求心性神経の機能も重要である[35]。一部の研究者は、下部尿路閉塞が膀胱からの知覚神経の障害にもつながることを示している[36, 37]。すなわち、下部尿路閉塞ラットでは、膀胱機械受容器からの求心性駆動が低下するため、膀胱が空になる前に排尿反射が失敗に終わり、結果的に残尿量が増加することを示している。今後、臨床における収縮不全型排尿筋過活動の病態の更なる解明と、今回構築した下部尿路閉塞モデルにおける求心性神経（知覚神経）の変化、膀胱-尿道の協調性の解析により、新たな考察が可

能となり、収縮不全型排尿筋過活動モデルとしての臨床外挿性の観点で、本モデルについての新たな知見が得られるものと考えられる。

## 5. 小括

男性特有の組織である前立腺が肥大して起こる下部尿路閉塞が、既存の治療薬で対処困難とされている収縮不全型排尿筋過活動の原因になりうる。本研究では、収縮不全型排尿筋過活動の臨床病態に類似した症状を示すラット下部尿路閉塞モデルを用いた一連の研究により、排尿筋における神経脱落と下部尿路機能の関連性を明らかにした。さらに、同モデルにおける排尿機能パラメータから得られる新たな排尿筋収縮力評価方法の提案により、同モデルにて排尿筋収縮力の低下を捉えることで、ラット下部尿路閉塞モデルの収縮不全型排尿筋過活動モデルとしての新たな有用性を提示した。加えて、*in vitro* および *in vivo* にて神経突起伸長作用を有する TAC-302 をツール化合物として用いた結果、本病態モデルにおいて排尿筋収縮力の改善を確認できたことから、本病態モデルの収縮不全型排尿筋過活動モデルとしての妥当性が確認された。

## 第二章 新規去勢抵抗性前立腺癌治療薬の創製を目的とした各種アンドロゲン受容体活性化モデルの有用性検討

### 1. 背景及び目的

前立腺癌は、世界中で男性が罹患する 2 番目に多い悪性腫瘍であり、年間 141 万人が新たに罹患していると推定され、その頻度は、最も多い悪性腫瘍である肺癌に近づいている [1]。前立腺癌の発症と進行は、アンドロゲン受容体の活性に依存している。進行した前立腺癌に対する標準治療は、アンドロゲン除去療法であり、アンドロゲン受容体の転写活性を抑制する。アンドロゲン除去療法は、ほとんどの患者で 1-2 年の寛解をもたらすが、去勢抵抗性前立腺癌の出現により、癌細胞は抵抗性を示すようになる[38]。過去 10 年間で、第二世代の抗アンドロゲン剤であるエンザルタミドと CYP17A1 阻害薬であるアピラテロンが、去勢抵抗性前立腺癌患者の生存期間を延長させる効果が証明され、これらの薬剤は、去勢抵抗性前立腺癌の標準治療となった [39,40]。これらの成功にもかかわらず、去勢抵抗性前立腺癌ではアンドロゲン受容体を標的とした治療法に対する耐性が生じる [41,42]。アンドロゲン受容体を介したシグナル伝達は、抗アンドロゲン療法による治療が行われているにもかかわらず、いくつかのメカニズムを介して起こる可能性がある[43]。これらのメカニズムには、アンドロゲン受容体の増幅、アンドロゲン受容体のリガンド結合ドメインの変異、アンド

ロゲン受容体のスプライスバリエント7の発現、代替アンドロゲン受容体パスウェイの活性化などが含まれる。

近年、転移性去勢抵抗性前立腺癌患者から採取した *cell free DNA* の解析から、アンドロゲン受容体の増幅が第二世代アンドロゲン受容体シグナル阻害剤に対する抵抗性に関連することが示された[44-47]。これらの知見と一致して、アビラテロンやエンザルタミドを含むアンドロゲン受容体シグナル阻害剤による治療後の前立腺癌細胞におけるアンドロゲン受容体の発現増加が *in vitro* および *in vivo* モデルで報告されている[48,49]。例えば、エンザルタミドの長期暴露によって樹立された2つのエンザルタミド耐性亜株（LAPC4 細胞と DuCaP 細胞）では、アンドロゲン受容体が過剰発現し、エンザルタミドに対する感受性が低下していた[50]。

また、アンドロゲン受容体シグナル阻害剤に反応するリガンド結合部位におけるアンドロゲン受容体の変異は、治療抵抗性の基礎となるよく知られたメカニズムである。アンドロゲン受容体のリガンド結合部位の変異は、非転移性の去勢感受性患者ではほとんど観察されないが、前治療の多い転移性去勢抵抗性前立腺癌患者で頻繁に検出され、このことは、アンドロゲン受容体のリガンド結合部位の変異が、クローン増殖に有利であることを示唆している[51]。

アンドロゲン受容体バリエント7は、全長アンドロゲン受容体の構造の中でリガンド結合部位を欠き、アンドロゲン非依存的に恒常的に活性化され、予後不良と関連す

る。アンドロゲン受容体バリエーション7は、原発性前立腺癌ではほとんど発現しないが、アンドロゲン除去療法後に発現が認められることが多く、アンドロゲン受容体シグナル阻害剤による治療後にはさらに発現が増加する[52]。

第二章では、第二世代抗アンドロゲン剤（本研究では、エンザルタミド）に対する各種耐性モデルの有用性を検討するために、臨床にて問題となっているアンドロゲン受容体の増幅、アンドロゲン受容体リガンド結合ドメインの変異、アンドロゲン受容体のスプライスバリエーション7の発現モデルを構築し、先行抗アンドロゲン剤の耐性について確認することで、その有用性を検討した。

また、去勢抵抗性前立腺癌で、第二世代抗アンドロゲン剤耐性を克服するために、アンドロゲン受容体・アンドロゲン受容体バリエーションタンパク質の発現量を低下させる作用を有する新規抗アンドロゲン剤として、TAS3681 を合成開発した。本研究では、構築した去勢抵抗性前立腺癌モデルを用いて、新薬候補化合物である TAS3681 の効力を評価することで、本評価系の妥当性を確認した。

## 2. 方法

### 2.1 細胞

LNCaP 細胞（変異型アンドロゲン受容体（T878A）陽性ヒト前立腺癌細胞株）は、微生物化学研究所および微生物化学研究振興財団より入手した。HEK293 細胞（胎児

腎細胞由来、アデノウイルス 5 型による形質転換株) および VCaP 細胞 (野生型アンドロゲン受容体陽性ヒト前立腺癌細胞株) は、American Type Culture Collection から購入した。アンドロゲン受容体バリエント 7 陽性エンザルタミド耐性細胞 SAS MDV No. 3-14 細胞株は、以下の方法で樹立した[53]ものを用いた。具体的には、LNCaP 細胞を無傷のヌードマウスに皮下接種した後に、腫瘍が形成されたマウスをイソフルラン麻酔下で外科的に去勢し、25 mg/kg のエンザルタミドを 3 ヶ月以上投与した。腫瘍体積が約 2,000 mm<sup>3</sup> に達した時点で腫瘍を摘出し、生存組織を去勢前の雄ヌードマウスに移植した。第二世代の移植異種移植片は、後天性エンザルタミド抵抗性マウスの作製に用いられた。エンザルタミド持続投与下の再発腫瘍を針生検で採取し、10  $\mu$  M のエンザルタミド存在下で *in vitro* 培養した。その後 4 ヶ月間、10  $\mu$  M のエンザルタミド存在下で培養し、SAS MDV No.3-14 細胞を樹立した。

## 2.2 使用薬剤

ビカルタミドは、Fidia Farmaceutici S.p.A から入手した。エンザルタミド と TAS3681 (2-chloro-4-[4-[[5-[2-hydroxypropan-2-yl]pyridin-2-yl]amino]-5,8-dihydropyrido[3,4-d]pyrimidin-7(6H)-yl]benzonitrile) は、大鵬薬品工業株式会社にて合成したものを使用した (Fig.2-1)。アパルタミドは、Haoyuan Chemexpress Co. Ltd.から入手した。ダロル

タミドは、MedChemExpress Co, Ltd.から入手した。ジヒドロテストステロン（DHT）

は Sigma-Aldrich から入手した。

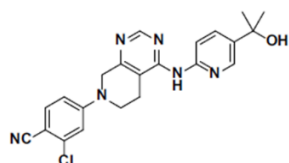


Fig. 2-1 TAS3681 の構造

## 2.3 実験動物

5 週齢の雄性 CB-17/Icr-scid/scidJcl マウス（SCID マウス）を CLEA Japan, Inc.から購入した。雄性 CB-17/Icr-scid/scidJcl マウス（SCID マウス、日本クレア株式会社, 6 週齢）を用いた。動物実験は、大鵬薬品工業株式会社の施設動物実験委員会の審査・承認を受け、同社の動物実験ガイドラインに従って実施した。

## 2.4 アンドロゲン受容体過剰発現モデルの先行抗アンドロゲン剤耐性モデルとしての有用性の検討

### 2.4.1 アンドロゲン受容体過剰発現モデル系におけるアンドロゲン受容体発現レベルの確

## 認とアンドロゲン受容体転写機能に対するエンザルタミドの効果確認

VCaP 細胞に、Mock ベクターまたはアンドロゲン受容体発現ベクターをトランスフェクトし、エンザルタミド ( $10\mu\text{M}$ ) で 1 日間処理した。細胞溶解物をアンドロゲン受容体と GAPDH のウェスタンブロッティングに供し、発現量を確認した。

野生型アンドロゲン受容体過剰発現 VCaP 細胞のルシフェラーゼレポーターアッセイのために、野生型アンドロゲン受容体発現プラスミドとアンドロゲン受容体応答性ホタルルシフェラーゼレポータープラスミドを Lipofectamine® 2000 (Life Technologies Corporation) を用いて遺伝子導入し、1 日間インキュベートした。ルシフェラーゼ活性測定の前に、ステロイド欠乏培地中で、TAS3681 またはエンザルタミドを 3 nM の DHT とともに指示濃度で 1 日間処理した。ルシフェラーゼ活性は、Bright-Glo® 試薬を用い、製造元の指示に従って測定した (Promega, Japan)。

### 2.4.2 アンドロゲン受容体過剰発現モデル系における細胞増殖 に対するエンザルタミドの効果確認

VCaP 細胞に、Mock ベクターまたはアンドロゲン受容体発現ベクターをトランスフェクトした。0.3 nM DHT の存在下、TAS3681 またはエンザルタミドを 3 日間インキュベートした。生存細胞数 (Cell viability) を CellTiter-Glo® 試薬を用い、製造元の指示に従って測定した (Promega, Japan)。

## 2.5 変異型アンドロゲン受容体発現モデルの先行抗アンドロゲン剤耐性モデルとしての有用性

### 2.5.1 変異型アンドロゲン受容体発現モデル系のアンドロゲン受容体転写機能に対する先行抗アンドロゲン剤の効果確認

アンドロゲン受容体（野生型、L702H、V716M、W742C、W742L、H875Q、H875Y、F877L、T878A、D891Y、Q903H、H875Y／T878A、F877L／T878A、T878A／S889G、および T878A／D891H）を発現するベクタープラスミドは、Genewiz 社から入手した。HEK293 細胞のルシフェラーゼレポーターアッセイのために、アンドロゲン受容体応答性ホタルルシフェラーゼレポータープラスミドと野生型アンドロゲン受容体または変異型アンドロゲン受容体発現プラスミドを FuGENE® HD Transfection Reagent を用いてトランスフェクトした。

各種変異型アンドロゲン受容体発現細胞を RPMI-1640（フェノールレッドフリー）にて懸濁後、 $3 \times 10^3$  cells/well で 96 well plate に播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータで終夜培養した。翌日、エンザルタミドを含む抗アンドロゲン剤および DHT を各 well に添加し、CO<sub>2</sub> インキュベータで培養した。翌日、ルシフェラーゼ活性を、Bright-Glo® 試薬を用い、製造元の指示（Promega、Japan）に従って測定した。

## 2.5.2 変異型アンドロゲン受容体（F877L）誘導性細胞増殖に対する先行抗アンドロゲン

### 剤の効果確認

LNCaP 細胞（アンドロゲン受容体陽性ヒト前立腺癌細胞）に、レンチウイルスベクターを用いて変異型アンドロゲン受容体（F877L）を発現する遺伝子を導入し、変異型アンドロゲン受容体（F877L）を安定発現する LNCaP 細胞（変異型アンドロゲン受容体発現細胞（F877L））株を作製した。LNCaP 細胞および、変異型アンドロゲン受容体発現細胞（F877L）を RPMI-1640 培地にて懸濁後、 $3 \times 10^3$  cells/well で 96 well plate に播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータで終夜培養した。翌日、エンザルタミドを含む抗アンドロゲン剤および DHT を各 well に添加し、CO<sub>2</sub> インキュベータで 6 日間培養した。ルシフェラーゼ活性を、CellTiter-Glo® 試薬を用い、製造元の指示（Promega, Japan）に従って測定した。

## 2.6 アンドロゲン受容体バリエント 7 発現モデルの先行抗アンドロゲン剤耐性評

### 価系としての有用性

### 2.6.1 アンドロゲン受容体バリエント 7 転写機能の評価（*in vitro*）

SAS MDV No.3-14 細胞をアンドロゲンフリー条件下で 1 日間培養した。化合物を処置後翌日に、細胞から全 RNA を抽出し、cDNA を合成した。SAS MDV No.3-14 細胞におけるアンドロゲン受容体バリエント 7 下流遺伝子 (*CDC20*, *CDK1*, *CCNA2*, and

*UBE2C*) の mRNA 発現を、RT-qPCR 分析により解析した。各標的遺伝子の発現量は、対応する *GAPDH* の発現量に対して正規化し、DMSO 処理細胞における相対 mRNA 発現量を 1 とし、相対値として示した。

## 2.6.2 全長アンドロゲン受容体およびアンドロゲン受容体バリエント 7 の発現量の評価 (ウェスタンブロッティング)

細胞中の蛋白を冷 M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて抽出した。核画分と細胞質画分を抽出キット (Promega) の手順書に従って、抽出した。腫瘍中の蛋白については、プロテアーゼ阻害剤 (Sigma-Aldrich) 入りの (T-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて抽出した。ウェスタンブロッティングは、タンパク質発現を分析するために以前報告された標準方法に従って実施した[53]。まず、等量のタンパク質をゲルにロードした。泳動後、タンパク質を膜 (Bio-Rad Laboratories, Inc. または Life Technologies Corporation, USA) に転写し、抗体とインキュベートした後、化学発光検出システム (ImageQuant LAS-3000 または ImageQuant LAS-4010, GE Healthcare, UK または AmershamTM Imager 600 QC, Cytiva, UK) を使用してタンパク質画像を取得した。一次抗体として、ヒト AR (clone D6F11, Cell Signaling Technology, USA または clone N-20, Santa Cruz Biotechnology, USA)、AR-V7 (clone RM7, RevMAb Biosciences および clone E3O8L Cell Signaling Technology, USA)、ヒトグリセルアル

デヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH; カタログ#2275-PC-100, Trevigen, USA)、  
HDAC1 (カタログ#2062) および  $\beta$ -チューブリン (カタログ#2126) を使用した。

#### 2.6.3 アンドロゲン受容体バリエント 7 driven 細胞増殖能の評価 (*in vitro*)

SAS MDV No.3-14 細胞を、アンドロゲンフリー培地中で、3、5、7、10  $\mu$  M の TAS3681  
とエンザルタミドとともに 3、6、9 日間インキュベートした。培養液は 3 日ごとに  
交換した。細胞増殖は、CellTiter-Glo<sup>®</sup> 試薬を用いて、処理後 3、6、9 日目に評価し  
た。発光は、Multilabel Counter (Wallac Arvo-HTS、Perkin-Elmer 社製) を用いて測定  
した。

#### 2.6.4 アンドロゲン受容体バリエント 7 driven 細胞増殖能の評価 (*in vivo*)

SCID マウスは 6 週齢で去勢し、SAS MDV No.3-14 細胞を皮下注射した[53]。抗  
腫瘍活性を評価するために、SAS MDV No.3-14 細胞異種移植片を有する動物を、  
平均腫瘍体積が  $\sim 130$ - $250$  mm<sup>3</sup> に達した時点で、腫瘍体積に応じて 1 日目に無作為  
に割り付け、TAS3681 または溶媒 (0.5% ヒドロキシプロピルメチルセルロース ;  
HPMC) を 1 日 2 回、14 日間経口投与した。腫瘍体積およびマウスの体重を週 2 回  
測定した。腫瘍体積 (mm<sup>3</sup>) は、 $(A \times B^2) / 2$  で算出し、定義した。ここで、A お  
よび B はそれぞれ腫瘍の最長径および最短径である。15 日目の相対腫瘍体積は、0  
日目の腫瘍体積 (TV) に対する 15 日目の腫瘍体積の比として算出した。1 日目と  
15 日目に顔面静脈から採血し、血清を分離した。血清中の前立腺特異抗原 (PSA)

濃度は、PSA ELISA キット（カタログ# DKK300、R&D systems、米国）を用いて製造業者の説明書に従って評価し、そのデータを用いて PSA 比を算出した。PSA 比は、15 日目の各サンプルの PSA 濃度を 1 日目の PSA 濃度で割って算出した。

### 3. 結果

#### 3.1 アンドロゲン受容体過剰発現による先行抗アンドロゲン剤耐性モデルの構築

アンドロゲン受容体の過剰発現と増幅は、エンザルタミド耐性のメカニズムとして報告されている[44,45]。そこで、エンザルタミドがアンドロゲン受容体阻害活性に与えるアンドロゲン受容体過剰発現の影響を調べた。VCaP 細胞（野生型アンドロゲン受容体陽性ヒト前立腺癌細胞株）に、アンドロゲン受容体タンパク質の発現ベクターを遺伝子導入した結果、アンドロゲン受容体タンパク質の細胞内発現量が高まることが示された（Fig. 2-2）。また、アンドロゲン受容体過剰発現 VCaP 細胞では、DHT によるアンドロゲン受容体の転写活性化と細胞増殖が親細胞よりも効率的に促進された（Fig. 2-2, Fig. 2-3）。エンザルタミドは、親細胞では、DHT によるアンドロゲン受容体の転写活性化を完全に阻害したが、アンドロゲン受容体過剰発現細胞では十分な阻害効果が見られなかった（Fig. 2-3）。また、エンザルタミドは、親細胞では、DHT により誘導されたアンドロゲン受容体細胞増殖を完全に阻害したが、アンドロゲン受容体過剰発現細胞では十分

な阻害効果が見られなかった (Fig. 2-4)。一方、TAS3681 は、親細胞とアンドロゲン受容体過剰発現細胞の両方において、DHT によるアンドロゲン受容体転写活性化と増殖を効果的に阻害した。これらの結果は、TAS3681 で処理したアンドロゲン受容体過剰発現細胞における AR 発現量の減少と一致していた (Fig. 2-2)。

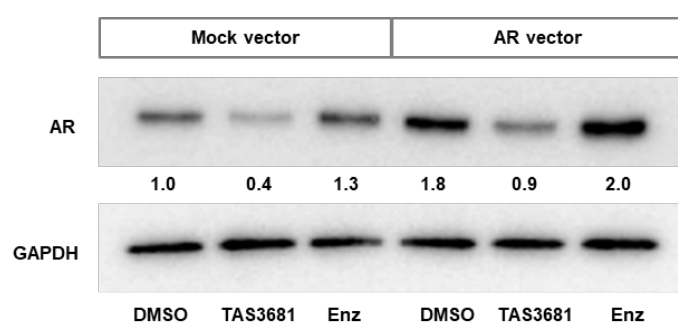


Fig. 2-2 Effect of TAS3681 on AR protein levels in AR-overexpressing VCaP cells. VCaP cells were transfected with a mock vector or an AR expression vector and treated with the indicated compounds (10  $\mu$ M) for one day. Cell lysates were subjected to immunoblotting for AR and GAPDH to confirm equal loading. Numbers below the AR band indicate AR protein expression relative to that in DMSO control cells transfected with a mock vector. A representative experiment (of 3) is shown. Enz: enzalutamide

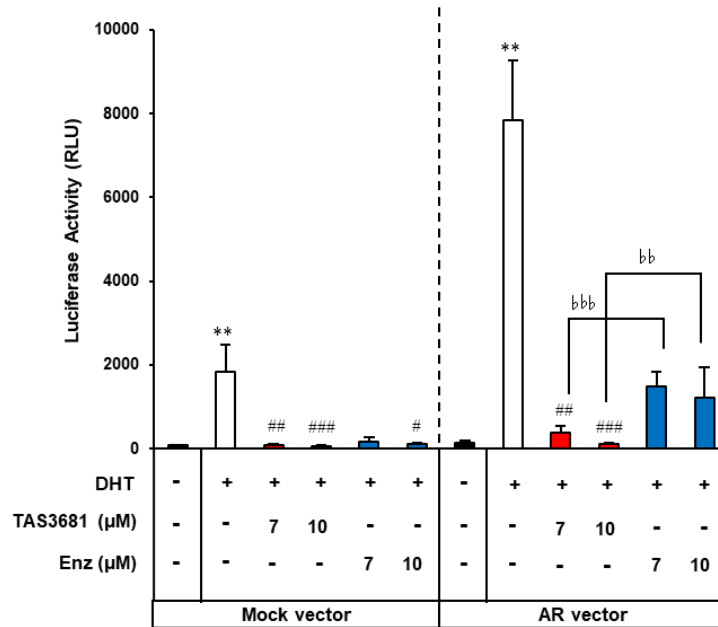


Fig. 2-3 Effects of TAS3681 and enzalutamide on AR transcriptional activity in AR-overexpressing VCaP cells. VCaP cells were transfected with a mock vector or an AR expression vector, and the pGL4.36 luciferase plasmid and incubated for one day. The cells were treated with TAS3681 or enzalutamide at the indicated concentrations with 3 nM DHT in steroid-depleted medium for one day before luciferase activity measurements. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. \*\*  $p < 0.001$  versus DMSO-treated cells using Wilcoxon test, # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ ; ### $p < 0.001$  versus DHT treated cells using Dunnett's test, bb  $p < 0.01$ ; bbb  $p < 0.001$  by Student's  $t$ -test.

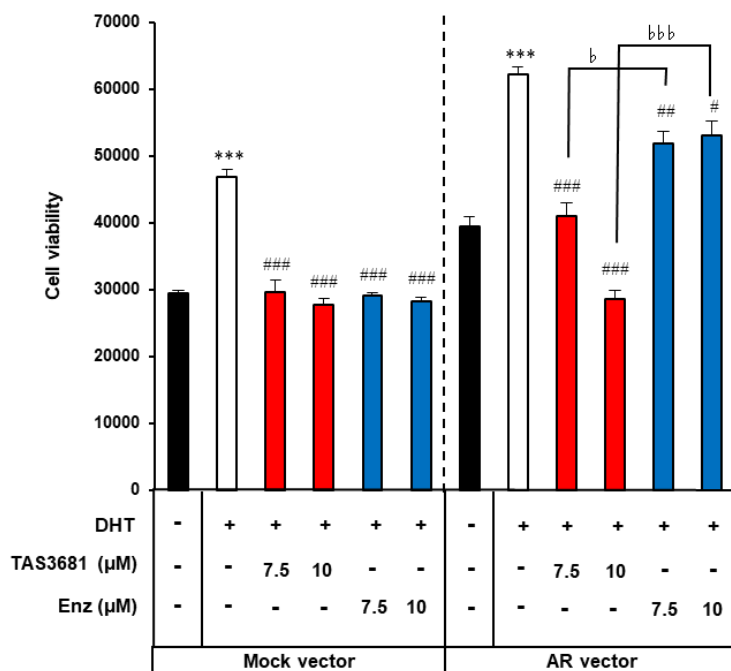


Fig. 2-4 Effects of TAS3681 and enzalutamide on the growth of AR-overexpressing VCaP cells. VCaP cells were transfected with a mock vector or AR expression vector, followed by incubation for three days with TAS3681 or enzalutamide at the indicated concentrations in the presence of 0.3 nM DHT. Results are expressed as mean of triplicate wells  $\pm$  SD. \*\*\*  $p < 0.001$  versus DMSO-treated cells using Student's t-test, #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$  versus DHT treated cells using Dunnett's test, b  $p < 0.05$ ; bbb  $p < 0.001$  by Student's t-test. Enz: enzalutamide.

### 3.2 リガンド結合部位の変異型アンドロゲン受容体発現による先行抗アンド

#### ロゲン剤耐性モデルの構築

アンドロゲン受容体の変異は、抗アンドロゲン剤による治療下で進行する患者では、抗アンドロゲン剤に反応する患者よりも、頻度高く認められる[44]。本研究では、T877A、W742C、F877Lなどのリガンド結合部位変異型アンドロゲン受容体に対する抗アンドロゲン剤の効果を、アンドロゲン応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を

用いた細胞ベースの一過性トランスアクチベーションアッセイを用いて研究した。

DHT 非存在下において、アゴニストモードのトランスアクチベーションアッセイでは、エンザルタミドが変異型アンドロゲン受容体（F877L）に対してアゴニストとして作用し、一方で、ビカルタミドとヒドロキシフルタミドは、それぞれ変異型アンドロゲン受容体（W742C）と変異型アンドロゲン受容体（T877A）に対してアゴニストとして作用した（Fig. 2-5）。しかしながら、TAS3681 は、DHT 非存在下において、試験したすべての変異型アンドロゲン受容体に対してアゴニストのプロファイルを示さなかった。また、DHT 存在下でのトランスアクチベーションアッセイでも同様の結果が得られ、TAS3681 のみが、試験したすべての変異型アンドロゲン受容体に対して pure antagonist として機能した（Fig. 2-6）。

さらに、機能的に特徴付けられたリガンド結合部位の変異型アンドロゲン受容体のリストを、さらに 10 種類（L702H、V716M、W742L、H875Q、H875Y、D891Y、Q903H、H875Y/T878A、T878A/S889G、T878A/D891H）まで拡張した[45, 54]。先に試験した 3 つの変異型アンドロゲン受容体に加えて、他の変異型アンドロゲン受容体も同様のプロセスで、各変異型アンドロゲン受容体に最適な濃度を決定するために、DHT の濃度を増加させたときのこれら 10 種の変異型アンドロゲン受容体の反応を評価した。13 種の変異型アンドロゲン受容体の転写活性化に対する抗アンドロゲン剤（TAS3681、エンザルタミド、アパルタミド、ダロルタミド）の効果を調べ、IC<sub>50</sub> 値を算出した（Fig. 2-

7, Table 2-1)。エンザルタミドとアパルタミドは、変異型アンドロゲン受容体 (F877L/T878A)、(H875Y/T878A) および (F877L) に対してアゴニスト作用を示した (Fig. 2-7)。ダロルタミドは変異型アンドロゲン受容体 (V716M) と変異型アンドロゲン受容体 (H875Y) に対してアゴニスト効果を示した (Fig. 2-8)。一方で、本研究において、TAS3681 は、追加の変異型アンドロゲン受容体に対してもアゴニスト作用を示さなかった。

次に、変異型アンドロゲン受容体 (F877L) を安定に発現する LNCaP 細胞 (変異型アンドロゲン受容体 (F877L) 発現細胞) の増殖に対するエンザルタミドの有効性を調べた。エンザルタミドとアパルタミドは、親細胞の増殖を抑制したが、以前に報告されたように、どの濃度でも変異型アンドロゲン受容体 (F877L) 発現細胞の増殖を抑制できなかった (Fig. 2-8) [42]。これらの所見を総合すると、エンザルタミドをはじめとする抗アンドロゲン剤は、臨床的に関連するリガンド結合部位変異型アンドロゲン受容体に対して一部アゴニストとして機能することが示唆される。次に、変異型アンドロゲン受容体 (F877L) 発現細胞の増殖抑制における TAS3681 の有効性を検討した。DHT 存在下での TAS3681 処理は、親細胞と変異型アンドロゲン受容体 (F877L) 発現細胞の両方の増殖を強力かつ用量依存的に抑制した (Fig. 2-8)。これらの知見を総合すると、TAS3681 は野生型および臨床的に関連するリガンド結合部位変異に対してアンドロゲン受容体の pure antagonist として機能することが示唆される。

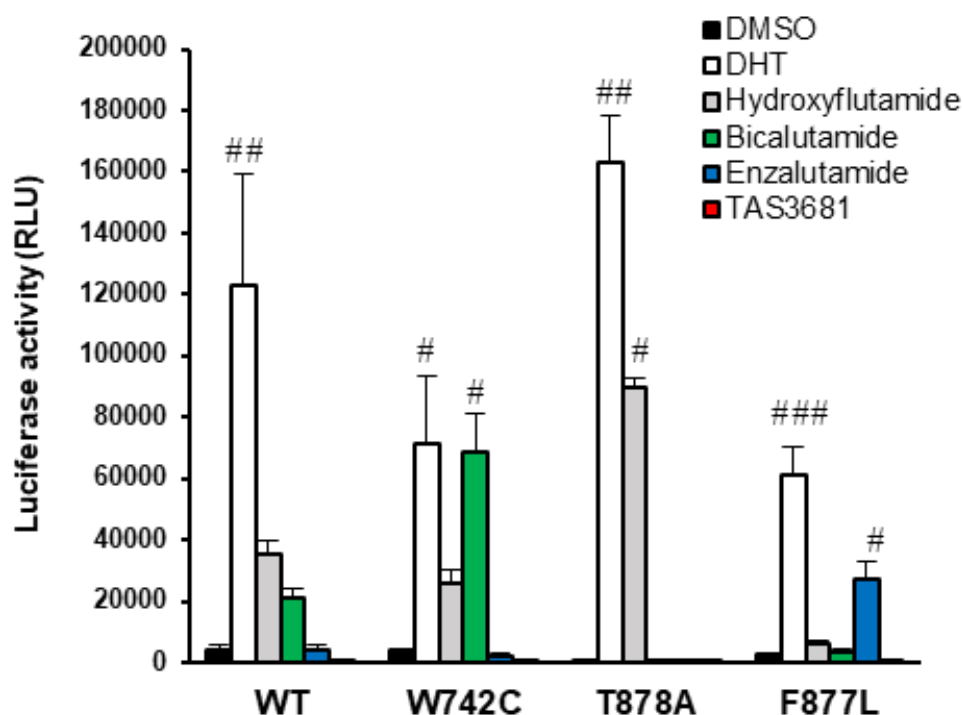


Fig. 2-5 Agonist activities of 10  $\mu$ M hydroxyflutamide, bicalutamide, enzalutamide, and 3  $\mu$ M TAS3681 against wild-type or mutant ARs; HEK293 cells were transfected with expression vector of wild-type or mutant AR and pGL4.36 luciferase plasmid and incubated for one day. To analyze the T878A mutant AR, LNCaP cells were transfected with pGLPE luciferase plasmid and incubated for one day. Each cell was treated with the indicated compounds in steroid-depleted medium for one day before luciferase activity measurements. Results are expressed as mean of sextuplicate wells  $\pm$  SD.  $\#p < 0.05$ ;  $\##p < 0.01$ ;  $\###p < 0.001$  versus DMSO-treated cells using Dunnett's test.

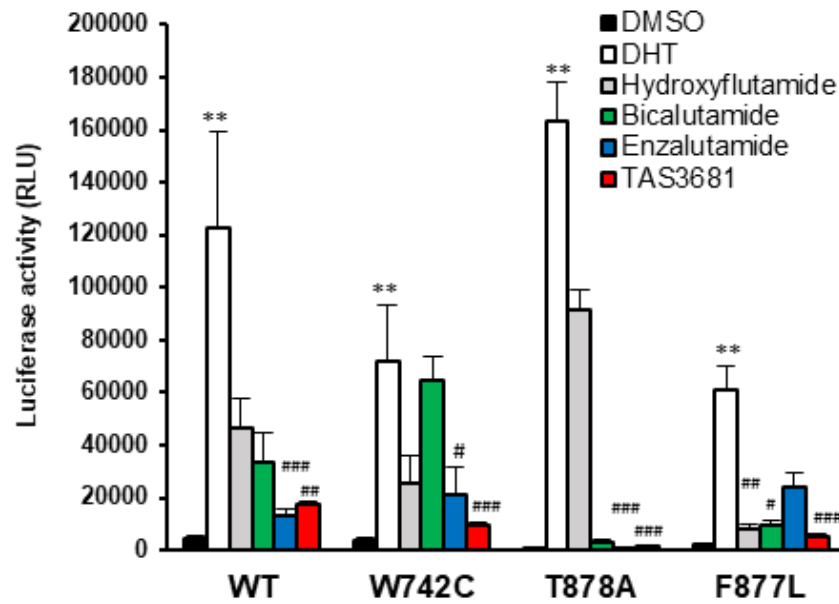


Fig. 2-6 Antagonist activities of hydroxyflutamide, bicalutamide, enzalutamide, and TAS3681 against wild-type or mutant ARs; HKE293 cells were transfected with expression vector of wild-type or mutant AR and pGL4.36 luciferase plasmid and incubated for one day. For analysis of the T878A mutant AR, LNCaP cells were transfected with pGLPE luciferase plasmid and incubated for one day. Each cell culture was treated with the indicated compounds with 1 nM DHT in steroid-depleted medium for one day before luciferase activity measurements. Results are expressed as the mean of sextuplicate wells  $\pm$  SD. \*\*  $p < 0.01$  versus DMSO-treated cells using Wilcoxon test, #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$  versus DHT-treated cells using Dunnett's test. AR, androgen receptor.

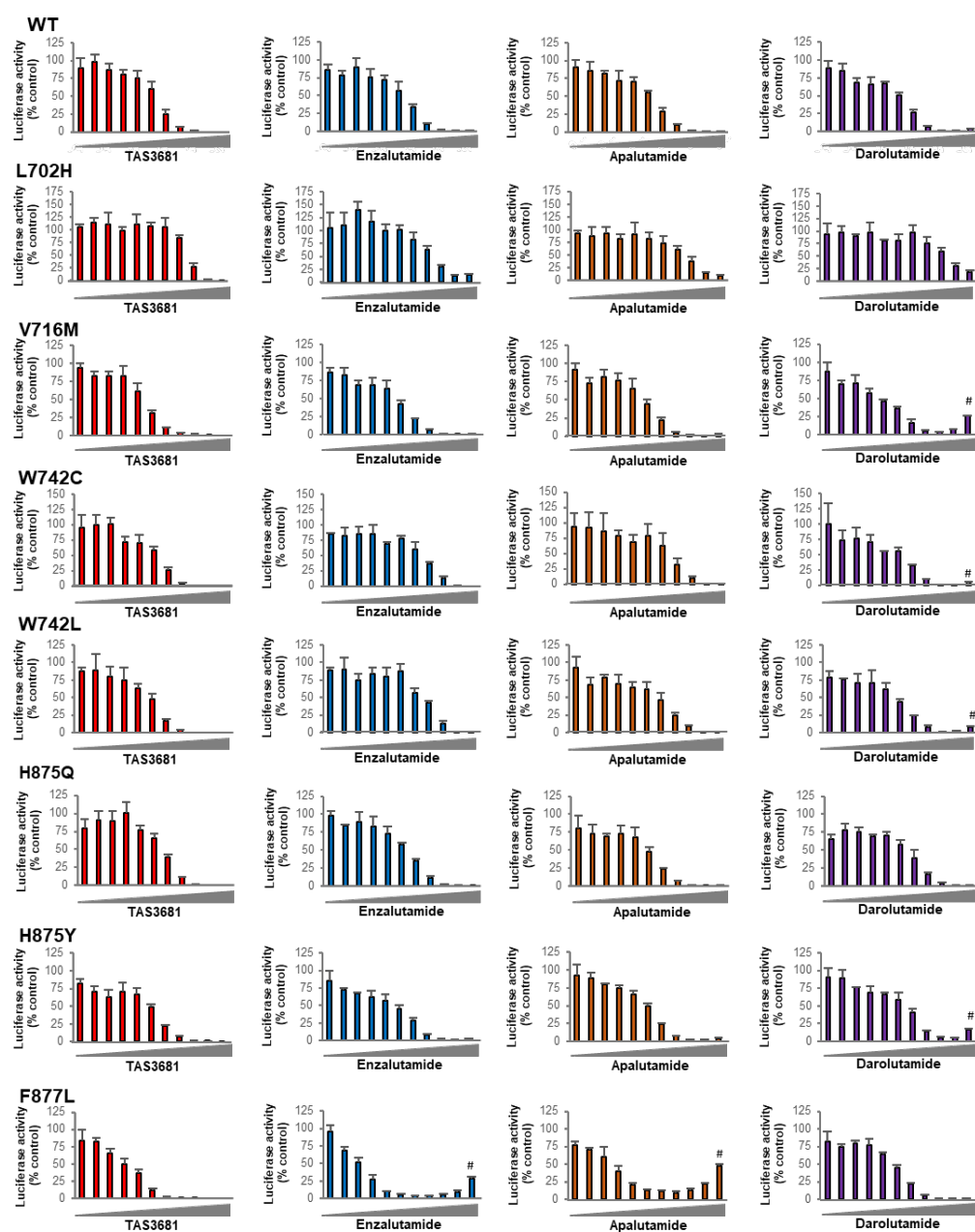


Fig. 2-7 Effect of TAS3681, enzalutamide, apalutamide and darolutamide on the transcriptional activity of mutated and wild type AR.

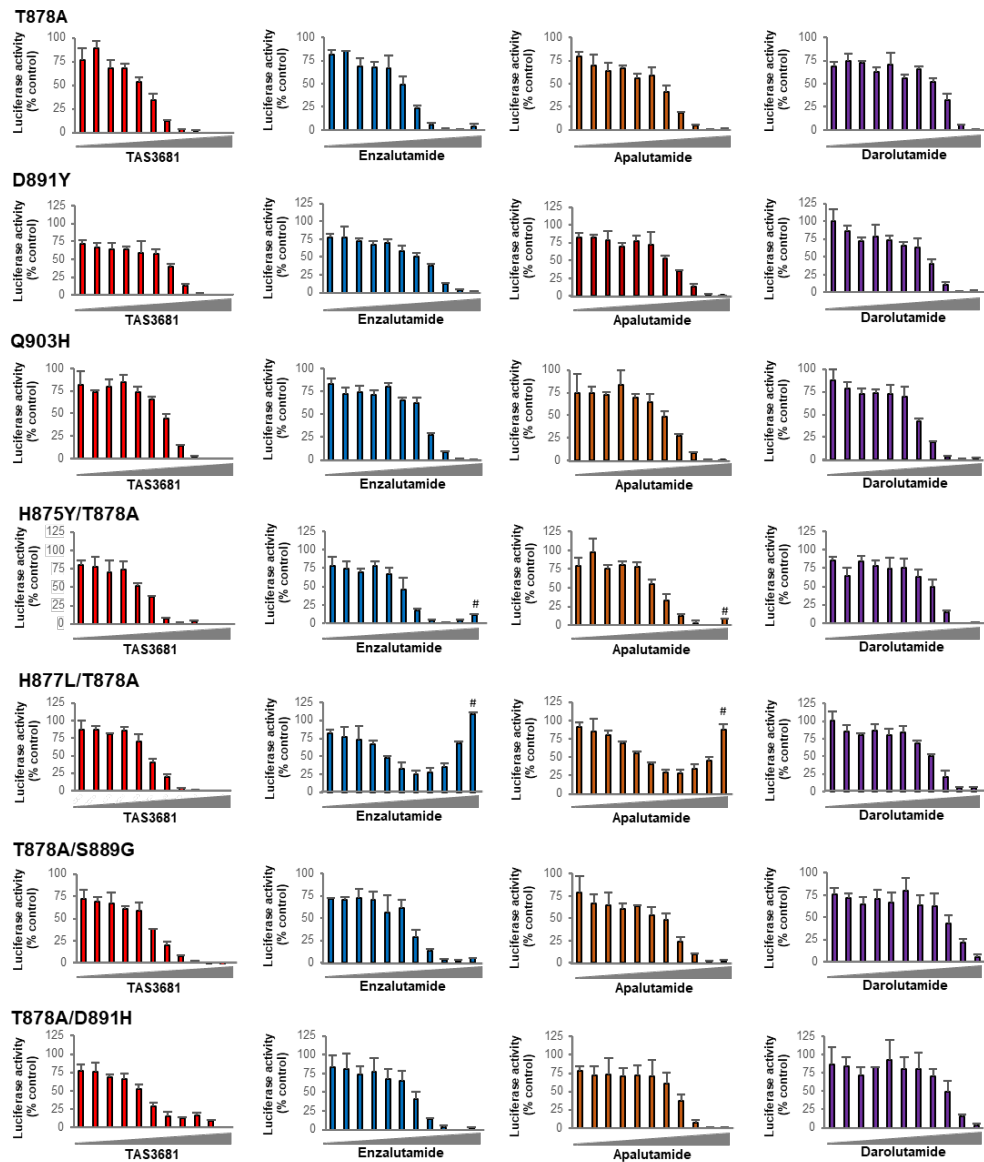


Fig. 2-7 (continued) Effect of TAS3681, enzalutamide, apalutamide and darolutamide on the transcriptional activity of mutated and wild type AR.

HEK293 cells were transfected with the pGL4.36 plasmids and mutant AR expression vectors and then incubated for one day with DMSO or 0.0003, 0.000949, 0.003, 0.00949, 0.03, 0.0949, 0.3, 0.949, 3, 9.49, 30  $\mu$ M of TAS3681, enzalutamide, apalutamide, or darolutamide in the presence of DHT.

Cells were subsequently harvested, and luciferase activity was determined. Results are expressed as the mean SD (n= 3). # More than 5% increase of relative luciferase activity (% control) was observed at 30  $\mu$ M compared with that at 10  $\mu$ M.

Table 2-1 IC<sub>50</sub> values of AR antagonist against mutant and wild-type AR activation by DHT

|             | DHT (nM) | IC <sub>50</sub> (μM) |                    |                    |                    |
|-------------|----------|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|             |          | TAS3681               | Enzalutamide       | Apalutamide        | Darolutamide       |
| WT          | 0.1      | 0.099                 | 0.088              | 0.071              | 0.044              |
| L702H       | 1        | 1.985                 | 1.522              | 1.232              | 4.126              |
| V716M       | 0.1      | 0.039                 | 0.035              | 0.048              | 0.017 <sup>a</sup> |
| W742C       | 0.1      | 0.084                 | 0.284              | 0.289              | 0.048 <sup>a</sup> |
| W742L       | 1        | 0.048                 | 0.431              | 0.087              | 0.033 <sup>a</sup> |
| H875Q       | 0.1      | 0.158                 | 0.104              | 0.037              | 0.058              |
| H875Y       | 0.1      | 0.030                 | 0.026              | 0.058              | 0.083 <sup>a</sup> |
| F877L       | 0.1      | 0.008                 | 0.003 <sup>a</sup> | 0.005 <sup>a</sup> | 0.045              |
| T878A       | 0.1      | 0.022                 | 0.041              | 0.037              | 0.172              |
| D891Y       | 0.1      | 0.027                 | 0.102              | 0.195              | 0.240              |
| Q903H       | 0.1      | 0.122                 | 0.158              | 0.118              | 0.109              |
| H875Y/T878A | 0.1      | 0.022                 | 0.037 <sup>a</sup> | 0.098 <sup>a</sup> | 0.303              |
| F877L/T878A | 0.1      | 0.058                 | N.D. <sup>a</sup>  | N.D. <sup>a</sup>  | 0.628              |
| T878A/S889G | 0.1      | 0.017                 | 0.038              | 0.042              | 0.516              |
| T878A/D891H | 0.1      | 0.019                 | 0.091              | 0.147              | 1.778              |

IC<sub>50</sub> values were estimated from luciferase activity (% control) using XLfit® version 5.5.0.5 (ID Business Solutions, Guildford, UK) . a More than 5% increase in relative luciferase activity (% control) was observed at 30 μM compared with that at 10 μM.

N.D.: not determined

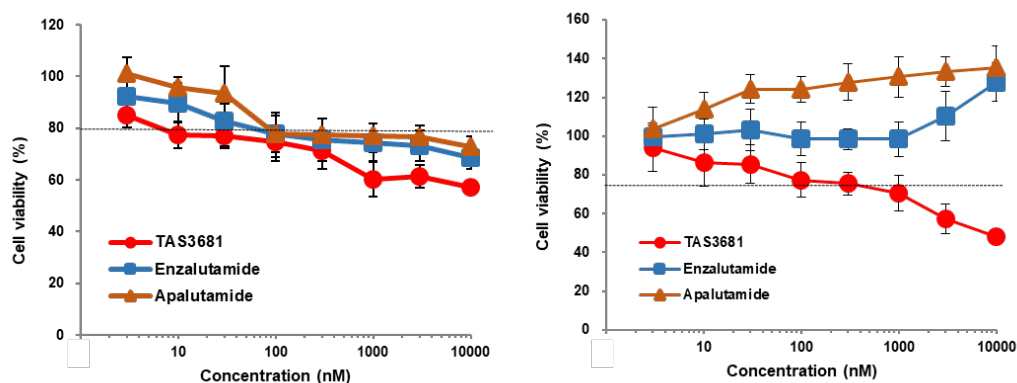


Fig. 2-8 Inhibitory effects of TAS3681, enzalutamide and apalutamide on DHT-induced proliferation of LNCaP (left panel) and F877L-expressing LNCaP cells (right panel). The cells were incubated for six days with various concentrations of TAS3681, enzalutamide, and apalutamide in the presence of 0.1 nM DHT. The dashed line indicates cell viability in the absence of DHT. Results are expressed as mean of sextuplicate wells  $\pm$  SD.

### 3.3 アンドロゲン受容体バリエント7 発現エンザルタミド耐性モデル評価系の構築

#### とアンドロゲン受容体バリエント7の機能評価 (*in vitro*)

本研究では、LNCaP 細胞を用いて、*in vivo* 皮下移植とエンザルタミド投与後およびその後の *in vivo* 継代により、SAS MDV No.3-14 細胞株を樹立した細胞株を用いた[53]。アンドロゲン受容体バリエント7は、*CDC20*, *CDK1*, *CCNA2* および *UBE2C* など、アンドロゲン受容体が調節する遺伝子とは異なる遺伝子発現を調節することが知られており[55]、SAS MDV No.3-14 でもそれらの遺伝子発現が、上昇していることが確認されている。これら遺伝子発現が、本細胞においてもアンドロゲン受容体による発現調節を受けないことを確認するために、アンドロゲン受容体のリガンドである DHT を添加した。

その結果、*CDC20*をはじめ検討した全ての mRNA 発現レベルに影響しなかったことから、アンドロゲン受容体とは異なる制御を受けていることが示された (Fig. 2-9)。

また、エンザルタミドが、SAS MDV No.3-14 細胞で発現するアンドロゲン受容体バリエント 7 の転写機能への影響を確認した結果、*CDC20*, *CDK1*, *CCNA2* および *UBE2C* の遺伝子発現に影響しないことが明らかとなった (Fig. 2-9)。このことから、エンザルタミドは、本細胞においてアンドロゲン受容体バリエント 7 の転写機能を阻害出来ないことが明らかとなった。一方、TAS3681 は、DHT 存在下あるいは非存在下において、アンドロゲン受容体バリエント 7 の標的遺伝子発現を顕著に低下させた (Fig. 2-9)。

次に、全長アンドロゲン受容体およびアンドロゲン受容体バリエント 7 の細胞内発現への化合物の影響を評価した。その結果、エンザルタミドは、全長アンドロゲン受容体およびアンドロゲン受容体バリエント 7 の発現には、影響しないことが明らかとなった (Fig. 2-10, 2-11)。一方、TAS3681 は、全長アンドロゲン受容体だけでなく、アンドロゲン受容体バリエント 7 の発現量を用量依存的に減少させた (Fig. 2-10, 2-11)。

さらに、全長アンドロゲン受容体およびアンドロゲン受容体バリエント 7 の細胞内局在への化合物の影響について評価した。全長アンドロゲン受容体は細胞質と核の両方で検出されたが、アンドロゲン受容体バリエントは既報のように主に核に局在していた [56]。エンザルタミドはアンドロゲン受容体バリエントの核における発現と全長アンドロゲン受容体の細胞質および核における発現に影響を与えなかった (Fig. 2-12)。対照的

に、TAS3681 は全長アンドロゲン受容体とアンドロゲン受容体バリエントの発現をそれぞれの局在領域で減少させた。

さらに、エンザルタミドは、SAS MDV No.3-14 の細胞増殖に影響しなかった (Fig. 2-13)。先行研究における siRNA を用いたノックダウン実験にて、本細胞の増殖がアンドロゲン受容体だけでなくアンドロゲン受容体バリエント 7 にも依存していることが確認されている[53]ことから、本細胞は、アンドロゲン受容体バリエント 7 発現によるエンザルタミド耐性を示すと考えられた。対照的に、TAS3681 はアンドロゲン受容体バリエントの発現量低下作用と同濃度域において、SAS MDV No.3-14 の細胞増殖を抑制した。

### 3.4 アンドロゲン受容体バリエント 7 発現エンザルタミド耐性モデル評価系の構築と TAS3681 の有効性の評価 (*in vivo*)

アンドロゲン受容体バリエント 7 発現前立腺癌モデルマウスを用いて、エンザルタミドを連日経口投与した結果、エンザルタミドに対する耐性が先行研究の中で確認されている[53]。本研究では、さらに TAS3681 の同モデル系における有効性を評価するため、SAS MDV No.3-14 細胞を皮下注射した去勢雄性 SCID マウスに TAS3681 を 1 日 2 回、14 日間経口投与した[53]。マウスにおける TAS3681 の半減期 (3.63 時間) を考慮し、TAS3681 は、1 日 2 回 経口投与した。各 TAS3681 投与群 (7.5、15、22.5mg/kg/日) の平均相対腫瘍体積と溶媒群の腫瘍体積の比 (T/C 比、%) は、それぞれ 64%、41%、24%

であった。すべての投与量において、溶媒群と各 TAS3681 群との平均腫瘍体積の差は統計学的に有意であった ( $p < 0.025$ ) (Fig.2-14)。腫瘍の退縮は、TAS3681 を 15 mg/kg/日投与したマウス 10 匹中 1 匹、および TAS3681 を 22.5 mg/kg/日投与したマウス 10 匹中 3 匹で観察された (Fig. 2-15)。TAS3681 の投与は、SAS MDV No.3-14 腫瘍を有する去勢 SCID マウスにおいて、用量依存的に血清 PSA レベルの低下を引き起こした。TAS3681 を 15 および 22.5mg/kg/日投与した場合、投与 14 日後のベースラインからの平均 PSA 変化率の溶媒群と TAS3681 両群との差は統計学的に有意であった ( $p < 0.025$ ) (Fig. 2-16)。

本研究では、採取した腫瘍 (15 日目) における全長アンドロゲン受容体およびアンドロゲン受容体バリエーションタンパク質の発現をウェスタンブロット法で解析した。Fig. 2-17 に示すように、異種移植片腫瘍における全長アンドロゲン受容体およびアンドロゲン受容体バリエーションタンパク質の発現は、TAS3681 によって用量依存的に低下した。これらの結果から、TAS3681 はエンザルタミド耐性前立腺腫瘍に対して、腫瘍中の全長アンドロゲン受容体およびアンドロゲン受容体バリエーションタンパク質レベルの低下を伴う有意な抗腫瘍効果を発揮することが示された。

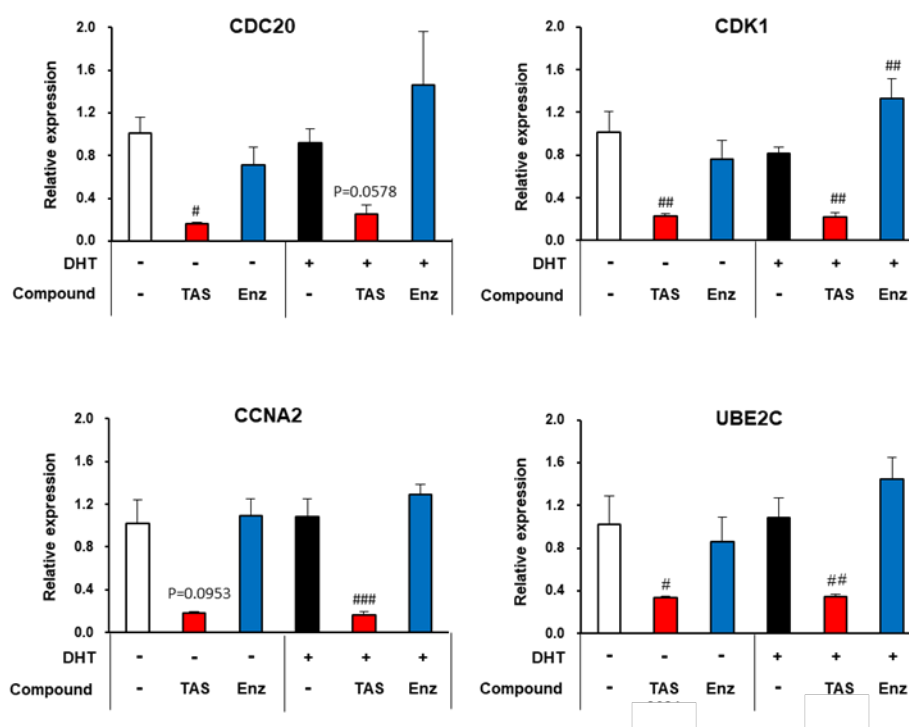


Fig. 2-9 Effect of TAS3681 and enzalutamide on AR-V7-related target genes in SAS MDV No. 3-14 cells. SAS MDV No. 3-14 cells were cultured under androgen-deprived conditions for one day and treated with DMSO or 7.5  $\mu$ M of TAS3681 or enzalutamide in the absence or presence of DHT for one day. Total RNA was extracted from the cells, and cDNA was synthesized. The mRNA expression of UBE2C in SAS MDV No. 3-14 cells was analyzed by RT-qPCR analysis. The level of each target gene was normalized to the corresponding expression of GAPDH, and the relative mRNA expression in the DMSO-treated cells with-out DHT was set as 1. Results are expressed as mean of triplicate wells  $\pm$  SD. Statistical significance was analyzed by Dunnett's test, # $p$  < 0.05 versus DMSO-treated cells in the absence of DHT; ## $p$  < 0.01 versus DMSO-treated cells in the presence of DHT. *CDC20*, cell division cycle 20; *CDK1*, cyclin-dependent kinase 1; *CCNA2*, cyclin A2; UBE2C, ubiquitin conjugating enzyme E2 C.

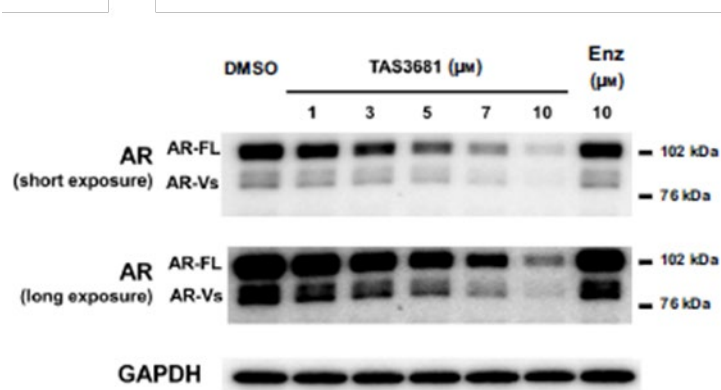


Fig. 2-10 Downregulation of AR-FL and AR-Vs protein expression in SAS MDV No. 3-14 cells exposed to TAS3681. SAS MDV No. 3-14 cells were exposed to TAS3681 or enzalutamide for one day at the indicated concentrations. Cell lysates were subjected to immunoblotting for AR (N-terminal) and GAPDH to confirm equal protein loading. Then, AR-FL and AR-V proteins were detected by assessment of luminescence over a short or long period, respectively. A representative experiment (of 3) is shown.

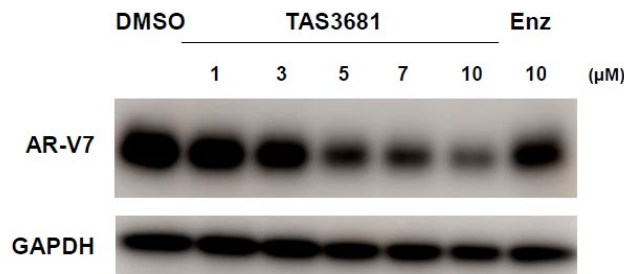


Fig. 2-11 Downregulation of AR-V7 protein expression in SAS MDV No. 3-14 cells treated with TAS3681. SAS MDV No. 3-14 cells were treated with TAS3681 or enzalutamide for one day at the indicated concentrations. Cell lysates were subjected to immunoblotting for AR-V7 and GAPDH to confirm equal protein loading. Enz, enzalutamide; AR-V7, androgen receptor splice variant 7.

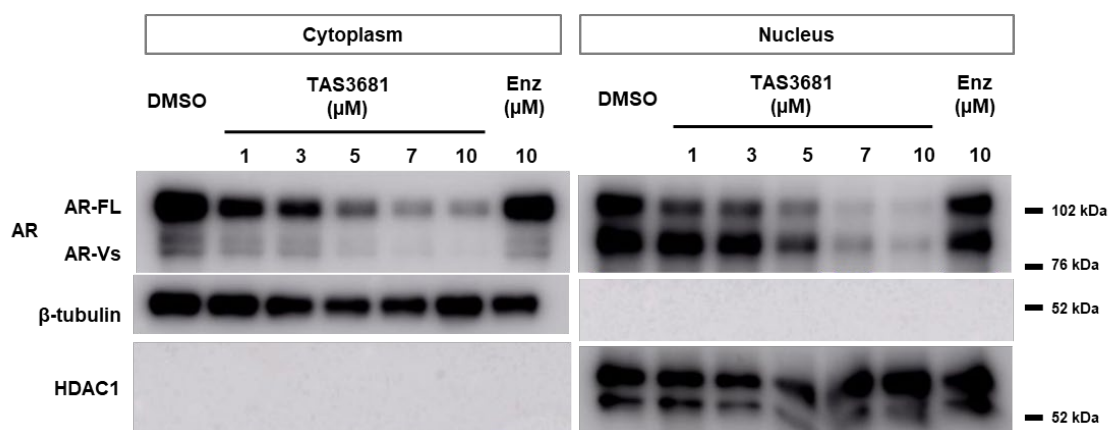


Fig. 2-12 Effect of TAS3681 on AR-FL and AR-Vs protein levels in nuclear and cytoplasmic fractions. SAS MDV No. 3-14 cells grown in androgen-depleted medium were treated with TAS3681, enzalutamide, or vehicle control for one day. Levels of cytoplasmic and nuclear AR-FL and AR-Vs were assessed by WB analysis. WB of the nuclear and cytoplasmic fractions was performed with anti-HDAC1 (nuclear) and anti-β-tubulin (cytoplasmic) antibodies to confirm successful cell fractionation. A representative experiment (of 3) is shown.

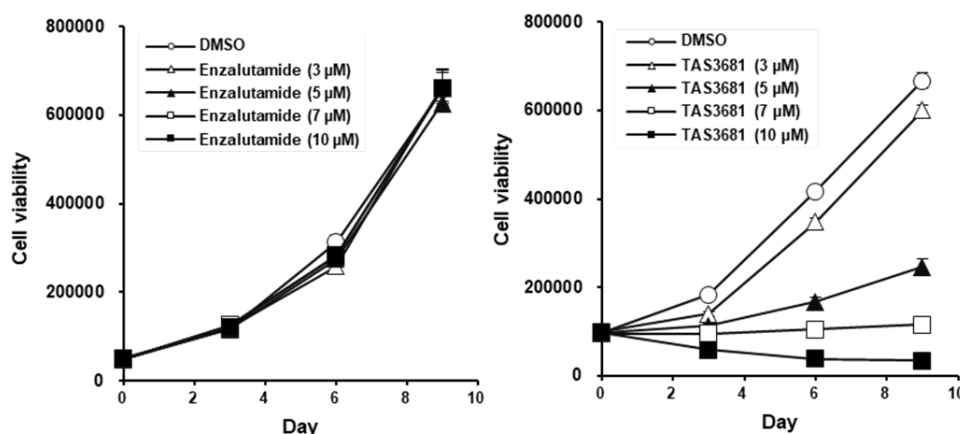


Fig. 2-13 Effects of TAS3681 and enzalutamide on the growth of SAS MDV No. 3-14 cells. SAS MDV No. 3-14 cells were treated with enzalutamide (left) and TAS3681 (right) at the indicated concentrations for 3, 6, or 9 days in an androgen-free medium. Results are expressed as mean ± SD (n = 3).

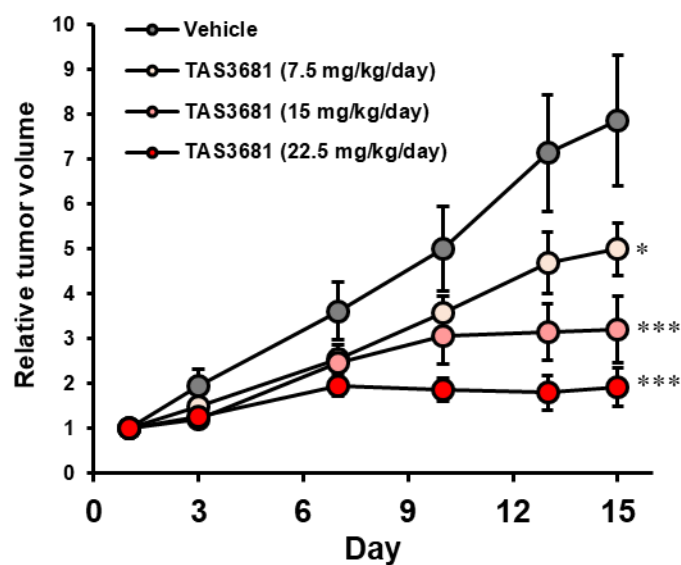


Fig. 2-14 Antitumor effect of TAS3681 in castrated SCID mice implanted with human prostate cancer SAS MDV No. 3-14 cells. SAS MDV No. 3-14 cells were implanted subcutaneously into the right flank of castrated SCID mice. Vehicle or TAS3681 (7.5, 15, or 22.5 mg/kg/day) was administered orally twice a day for 14 days. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 10). \* $p$  < 0.025, \*\*\* $p$  < 0.0005 versus vehicle group using Williams' test.



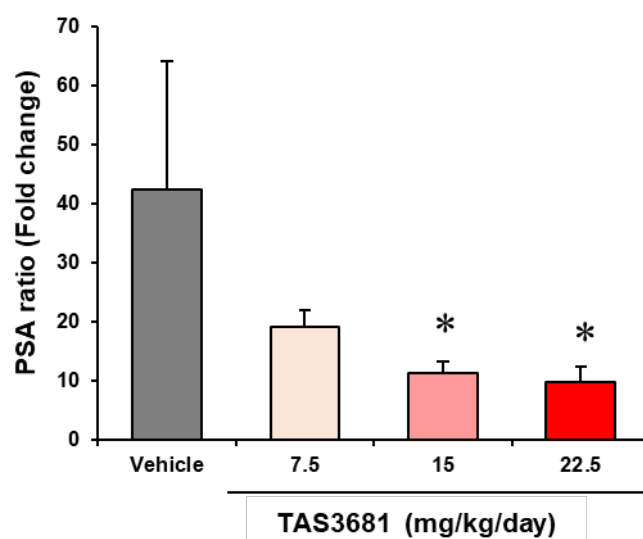


Fig. 2-16 Effect of TAS3681 on serum PSA levels in castrated SCID mice bearing SAS MDV No. 3-14 human prostate cancer xenografts. On days 1 or 15, blood was collected, and serum was prepared. The PSA ratio indicated a fold change from the baseline after 14 days of treatment. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=10 mice in each group except for vehicle group; n=9). A representative experiment (of 2) is shown. \*p < 0.025 versus vehicle group using Williams' test.

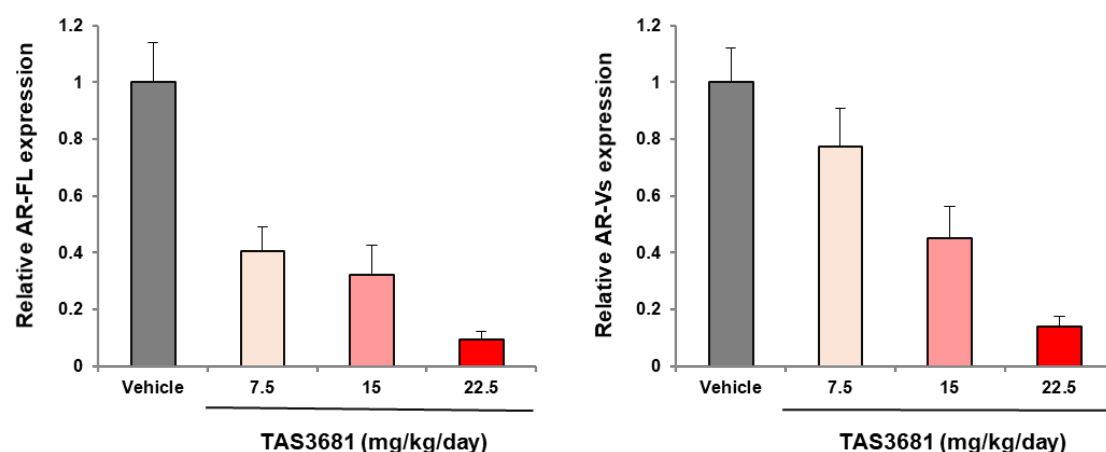


Fig. 2-17 Downregulation of AR-FL (left) and AR-Vs protein (right) expression in tumors of castrated SCID mice after treatment with TAS3681. Tumors were harvested on day 15, and tumor tissue lysates were subjected to immunoblotting for AR-FL, AR-Vs, and  $\beta$ -actin. The expression of AR-FL protein or AR-Vs protein in tumor tissue was normalized to that of  $\beta$ -actin, and the relative AR-FL and AR-Vs expression in the vehicle-treated group was set as 1. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 10). AR-FL, androgen receptor full length; AR-Vs, androgen receptor splice variants.

## 4. 考察

本研究では、第二世代抗アンドロゲン剤（本研究では、エンザルタミド）に対する各種耐性モデルの有用性を検討するために、臨床にて問題となっているアンドロゲン受容体の増幅、アンドロゲン受容体リガンド結合ドメインの変異およびアンドロゲン受容体のスプライスバリエーションの発現モデルを構築し、第二世代抗アンドロゲン剤（エンザルタミド）の耐性について確認した。

まず、臨床でエンザルタミド耐性を示す前立腺癌の特徴の一つとして、AR 過剰発現に着眼した。従来の前立腺癌細胞モデル（VCaP 細胞株）は内因性アンドロゲン受容体増幅を示すが、エンザルタミドやダロルタミドを含む第二世代アンドロゲン受容体シグナル阻害剤に対して、感受性を示す[57]。本研究においても、VCaP 細胞株を用いたアンドロゲン受容体のレポーターアッセイ系および細胞増殖アッセイ系においてエンザルタミドが感受性を示した。このことは、先行研究の結果と一致する。そこで、本研究においては、アンドロゲン受容体過剰発現前立腺癌細胞モデルとして、アンドロゲン受容体発現ベクターを遺伝子導入した VCaP 細胞を使用した。その結果、エンザルタミドは、VCaP 細胞（親細胞）における DHT 誘発アンドロゲン受容体転写活性化および増殖を完全に阻害する一方で、アンドロゲン受容体発現ベクターを遺伝子導入したアンドロゲン受容体過剰発現 VCaP 細胞ではエンザルタミドが完全に機能を抑制出来なかった。このことは、アンドロゲン受容体発現量の増加がエンザルタミド耐性の原因の一

つであることを示唆している。次に、エンザルタミド耐性癌の課題として、AR 過剰発現に着眼した。TAS3681 は、細胞内のアンドロゲン受容体タンパク質レベルを低下させ、親細胞およびアンドロゲン受容体過剰発現細胞の両方において、DHT によるアンドロゲン受容体転写活性化および細胞増殖を効果的に阻害した。これらの結果は、TAS3681 がアンドロゲン受容体過剰発現に対して完全に拮抗することを示しており、アンドロゲン受容体低下作用によりアンドロゲン受容体アンタゴニスト作用を十分に発揮できたことによる考えられる。

次に、臨床においてエンザルタミド耐性を示す前立腺癌の特徴の一つとしてエンザルタミドがアゴニストに変わるリガンド結合部位の変異に着眼した。従来のアンドロゲン受容体のリガンド結合部位の変異を有する前立腺癌細胞モデル（W742C, T878A）に対して、エンザルタミドは感受性を示した[58]。本研究においても、変異アンドロゲン受容体（W742C, T878A）を導入した細胞株を用いたレポーターアッセイ系においてエンザルタミドは、アンタゴニスト作用を示した。このことは、先行研究の結果と一致する。。近年、臨床において、変異型アンドロゲン受容体（F877L）がエンザルタミドとアパルタミドをアゴニストに変換するため、エンザルタミドとアパルタミド耐性をもたらすことが報告された[42, 58]。さらに、エンザルタミドは変異型アンドロゲン受容体（F877L）に対しては弱いアゴニストとして作用し、二重変異型アンドロゲン受容体（F877L/T878A）に対しては、強いアゴニストとして作用することが報告されている[58,

59]。そこで、本研究においては、アンドロゲン受容体のリガンド結合部位の変異モデルとして、アンドロゲン受容体発現のリガンド結合部位の変異（F877L）を遺伝子導入した細胞を使用した。その結果、変異アンドロゲン受容体（F877L）を導入した細胞は、エンザルタミドに対して耐性（アゴニスト作用）を示した。また、エンザルタミドは、変異アンドロゲン受容体（F877L）を導入した前立腺癌細胞（F877L 発現 LNCaP 細胞）の DHT 依存的細胞増殖を抑制しなかった。エンザルタミド耐性の課題として、AR(F877L)の変異に対する作用に着眼した。TAS3681 は、エンザルタミドと異なる骨格を有することで、AR(F877L)に対してアゴニスト作用を示さず、細胞増殖抑制作用を示した。

臨床において、エンザルタミド耐性を示す前立腺癌の特徴の一つとしてアンドロゲン受容体バリエント7を発現する前立腺癌に着眼した。従来の去勢抵抗性前立腺癌 *in vivo* モデルは、エンザルタミドに対して感受性を示した[53]。そこで、従来の *in vivo* 去勢 LNCaP 異種移植腫瘍マウスモデルにエンザルタミドを長期投与する条件下で、増殖する腫瘍から細胞株を取得し、得られた細胞株（SAS MDV No.3-14 細胞）が、アンドロゲン受容体バリエント 7 を発現していることを先行研究にて確認した。さらに、SAS MDV No.3-14 細胞を *in vivo* に移植した去勢抵抗性前立腺癌モデルは、エンザルタミド耐性を示した。これらの所見は、これまでの報告における実験モデルを用いた観察結果

と一致している。すなわち、アンドロゲン受容体バリエントの発現は、去勢抵抗性前立腺癌の異種移植モデルにおいて、アビラテロン治療後に有意に上昇し、エンザルタミドによる長期治療後の前立腺癌細胞で観察された[48, 50]。本研究では、アンドロゲン受容体バリエント 7 発現前立腺癌の研究ツールとして、SAS MDV No.3-14 細胞を用いた。

SAS MDV No.3-14 細胞において、内在性全長アンドロゲン受容体とアンドロゲン受容体バリエント 7 は、増殖促進因子として機能する。本研究において、エンザルタミドは、アンドロゲン受容体バリエント 7 の下流因子である *UBE2C* や *CDC20* といった細胞増殖因子の mRNA 発現を抑制しないことが示され、このことはアンドロゲン受容体バリエント 7 発現が、SAS MDV No.3-14 細胞におけるエンザルタミド耐性の原因の一因であることを示している。また、本研究において、SAS MDV No.3-14 細胞の細胞増殖をエンザルタミドが抑制できなかったことは、SAS MDV No.3-14 細胞を用いた耐性モデル系において、エンザルタミドが、アンドロゲン受容体バリエント 7 の機能を抑制出来ないことを示唆する。さらに、先行研究において、SAS MDV No.3-14 細胞を移植した異種移植片 *in vivo* モデル評価系においてもエンザルタミドが腫瘍縮小効果を示さなかったことから、*in vitro* で構築した去勢抵抗性前立腺癌モデル系の特徴が *in vivo* 系でも維持されていると考えられる[53]。一方、アンドロゲン受容体バリエント 7 の発現量を低下させる TAS3681 は、SAS MDV No.3-14 細胞において、アンドロゲン受容体バリエントの標的遺伝子発現を抑制し、細胞増殖抑制作用を示した。

前述の通り、去勢抵抗性前立腺癌患者における第二世代抗アンドロゲン剤耐性を克服するために合成開発された TAS3681 は、アンドロゲン受容体・アンドロゲン受容体バリエーションタンパク質の発現量を低下させる作用を有する新規抗アンドロゲン剤である。本研究において新たに構築した各耐性モデル評価系において、TAS3681 は効果を示した。近年、第二世代抗アンドロゲン剤（アピラテロンやエンザルタミド）による治療を受けた去勢抵抗性前立腺癌患者を対象にした TAS3681 の安全性・忍容性を評価する臨床試験において、TAS3681 は一定の有効性を示した[60]。これまでの報告によると、TAS3681 の臨床試験でリクルートされた患者層におけるアンドロゲン受容体の増幅、アンドロゲン受容体リガンド結合ドメインの変異およびアンドロゲン受容体スプライスバリエーション 7 発現の出現頻度は、それぞれ約 50%、約 10%（F877L 以外の変異も含む）および約 25-40%である[12, 61-63]。TAS3681 が上記患者層に対して有効性を示したことから、今回 TAS3681 が有効性を示した 3 つのエンザルタミド耐性モデルは、一定の臨床外挿性があることが示唆された。今後の臨床試験結果の解析において、患者毎の耐性機序が明らかになり、各種耐性機序への TAS3681 の有効性を考察することで、本研究にて構築した第二世代抗アンドロゲン剤耐性モデルにおける TAS3681 の有効性についての更なる考察が可能になると考えられる。

TAS3681 は、これまでの抗アンドロゲン剤と異なる骨格を有し、その薬理学的な特徴として、本研究にて構築した 3 つのエンザルタミドに対する耐性モデル全てに対して

有効な点が挙げられる。転移性去勢抵抗性前立腺癌は、患者間および患者内の分子不均一性が著しく高いことが以前から知られている[64]。すなわち、前立腺癌患者間あるいは同一患者内で異なる複数の耐性が生じることが示唆される。TAS3681 は、エンザルタミドに対する 3 つの代表的な耐性機序全てを阻害するため、エンザルタミドに対して耐性となった大部分の患者に対して有効性が期待できる。

今後の展望として、第二世代抗アンドロゲン剤未治療の患者においても TAS3681 は有効性が期待できると考えられる。エンザルタミドは、第一世代抗アンドロゲン剤よりもアンドロゲン受容体に対する結合親和性を高め、第一世代の抗アンドロゲン剤の課題 (W742C や T878A へのアゴニスト活性) を克服した抗アンドロゲン剤であることから、現在ファーストラインの去勢抵抗性前立腺癌治療薬として広く使われている[65]。しかしながら、前述の通りエンザルタミドがアンドロゲン受容体シグナルを強力に、かつ長期に阻害することでアンドロゲン受容体の過剰発現、新たなアンドロゲン受容体のリガンド結合部位の変異およびアンドロゲン受容体スプライシングバリエーションの出現が生じると考えられる。TAS3681 は何れの耐性機序に対しても有効性を示すことから、仮にエンザルタミドと同様に TAS3681 を、第二世代抗アンドロゲン剤未治療の去勢抵抗性前立腺癌患者の治療に用いた場合には、エンザルタミドよりも長く治療効果を維持できる期待値がある。しかしながら、エンザルタミドとは異なる構造故に TAS3681 独自の耐性変異が生じる可能性も考えられる。今後の TAS3681 の臨床試験結果の解析か

ら、エンザルタミド耐性機序を有する去勢抵抗性前立腺癌患者への TAS3681 の有効性に関する結果が得られることから、それら結果をもって、TAS3681 の有効性が不十分な耐性機序や新たな固有の耐性機序に対する対策が今後の薬剤開発の観点から重要である。さらに、今後の新薬のための評価モデルの臨床外挿性を高めるためには、臨床検体を適切な方法で解析し、新たに生じる耐性機序や標的分子の生物学的な特徴を解析し、その発症機序を理解することが、重要である。

## 5. 小括

本研究では、男性特有の組織である前立腺を原発相として転移し、かつ既存の抗アンドロゲン療法に対して耐性を獲得した去勢抵抗性前立腺癌の臨床病態に着目した。また、本研究では、その病態を模した *in vitro* 評価系（アンドロゲン受容体過剰発現系、変異型アンドロゲン受容体発現系および、アンドロゲン受容体バリエーション 7 発現系）を構築した上で、既存アンドロゲン受容体シグナル阻害剤抵抗性との関係性を明らかにし、それら評価系の有用性を提示した。また、各耐性モデル系において、アンドロゲン受容体発現量低下作用を併せ持つ新規抗アンドロゲン剤である TAS3681 を評価し、効果を示すことを明らかにした。第二世代抗アンドロゲン剤による治療後の去勢抵抗性前立腺癌患者を対象にした臨床試験において TAS3681 が、一定の有効性を示したことを考え合わせると、本耐性モデルの妥当性が示唆されたと考えられる。

## 総括

本研究では、“前立腺に起因した難治性疾患の新規治療薬創製を指向した各種病態モデルの有用性検討”と題して、難治性疾患に関して臨床で得られている知見を基にした非臨床病態モデルの新規構築を行い、その評価系の特徴を明らかにした。

第一章では、前立腺肥大で誘発される下部尿路障害とその発症機序に着目し、下部尿路閉塞ラットモデルにおける排尿障害と神経脱落との関連性を明らかにした。続いて、下部尿路閉塞ラットモデルにおける排尿筋収縮力を尿流動体測定データに基づいた新たな切り口で解析することで、同モデルを排尿筋過活動だけでなく排尿筋収縮力低下を示す収縮不全型排尿筋過活動モデルとして新たに特徴づけた。また、*in vitro/in vivo* にて神経突起伸長作用を有する TAC-302 が、本病態モデルの各評価指標を改善し、さらに臨床試験においても排尿効率および排尿筋収縮力低下を改善したことは、構築した収縮不全型排尿筋過活動モデルの臨床外挿性があることを示唆する。

第二章では、第二世代抗アンドロゲン剤に対して耐性を示した去勢抵抗性前立腺癌患者にて認められる様々なアンドロゲン受容体の変化を、非臨床モデル系にて再現し、第二世代抗アンドロゲン剤に対する耐性を確認することで、第二世代抗アンドロゲン剤耐性を示す新たな *in vitro* モデル系を特徴付けた。新たに構築した耐性モデル評価系を

用いて、アンドロゲン受容体低下作用を有する新規抗アンドロゲン剤である TAS3681 を評価したところ、何れの耐性モデル評価系においても、TAS3681 は効力を示した。また、TAS3681 が、第二世代抗アンドロゲン剤による治療が行われた去勢抵抗性前立腺癌患者において、一定の PSA レスポンスを示したことは、新たに構築した耐性モデル評価系の臨床外挿性があることを示唆する。

最後に、各章にて評価した化合物は、いずれも新たに構築したモデル系にて有効性を示したものの、その有効性は十分ではなかった。したがって、新たに構築した収縮不全型過活動モデルを用い、障害を受けた神経を標的とした化合物の更なる評価を行うこと（第一章）や、各種去勢抵抗性前立腺癌モデル系におけるアンドロゲン受容体およびアンドロゲン受容体バリエーションのシグナルを抑制する TAS3681 とは機序が異なる新規化合物の評価（第二章）により、臨床において、高い治療効果を示す化合物の創製が可能となることが期待される。

今後、本研究で得られた知見を基にして、前立腺に起因した難治性疾患に対する薬剤開発が進み、新規治療薬がいち早く患者様のもとへ届けられることを期待したい。

## 参考文献

1. Gandaglia, G., et al., *Epidemiology and prevention of prostate cancer*. Eur Urol Oncol, 2021. **4**(6): p. 877–92.
2. Launer, B.M., et al., *The rising worldwide impact of benign prostatic hyperplasia*. BJU Int, 2021. **127**(6): p. 722-728.
3. Roehrborn, C.G., *Pathology of benign prostatic hyperplasia*. Int J Impot Res, 2008. **20 Suppl 3**: p. S11-8.
4. Barendrecht, M.M., et al., *Is the use of parasympathomimetics for treating an underactive urinary bladder evidence-based?* BJU Int, 2007. **99**(4): p. 749-52.
5. Sayegh, N., U. Swami, and N. Agarwal, *Recent Advances in the Management of Metastatic Prostate Cancer*. JCO Oncol Pract, 2022. **18**(1): p. 45-55.
6. Nomiya, M., K.E. Andersson, and O. Yamaguchi, *Chronic bladder ischemia and oxidative stress: new pharmacotherapeutic targets for lower urinary tract symptoms*. Int J Urol, 2015. **22**(1): p. 40-6.
7. Liu, F., et al., *Protective effects of inosine on urinary bladder function in rats with partial bladder outlet obstruction*. Urology, 2009. **73**(6): p. 1417-22.
8. Schäfer, W., *Principles and clinical application of advanced urodynamic analysis of voiding function*. Urol Clin North Am, 1990. **17**(3): p. 553-66.
9. Gonzalez de Aguilar, J.L., et al., *Neurotrophic activity of 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one in cultured central nervous system neurons*. Brain Res, 2001. **920**(1-2): p. 65-73.
10. Borg, J., P.J. Kesslak, and C.W. Cotman, *Peripheral administration of a long-chain fatty alcohol promotes septal cholinergic neurons survival after fimbria-fornix transection*. Brain Res, 1990. **518**(1-2): p. 295-8.
11. Saito, M., et al., *Effect of cyclohexenonic long-chain fatty alcohol on rat overactive bladder induced by bladder neck obstruction*. Eur J Pharmacol, 2004. **501**(1-3): p. 143-9.
12. Antonarakis, E.S., et al., *AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer*. N Engl J Med, 2014. **371**(11): p. 1028-38.
13. Joseph, J.D., et al., *A clinically relevant androgen receptor mutation confers resistance to second-generation antiandrogens enzalutamide and ARN-509*. Cancer Discov, 2013. **3**(9): p. 1020-9.
14. Culig, Z., et al., *Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system*. Br J Cancer, 1999. **81**(2): p. 242-51.
15. Spans, L., et al., *Comparative genomic and transcriptomic analyses of LNCaP and*

- C4-2B prostate cancer cell lines*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e90002.
16. Woods-Burnham, L., et al., *The 22Rv1 prostate cancer cell line carries mixed genetic ancestry: Implications for prostate cancer health disparities research using pre-clinical models*. Prostate, 2017. **77**(16): p. 1601-1608.
  17. Ng, K., S. Smith, and J. Shamash, *Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer (mHSPC): Advances and Treatment Strategies in the First-Line Setting*. Oncol Ther, 2020. **8**(2): p. 209-230.
  18. Abrams, P., et al., *The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society*. Neurourol Urodyn, 2002. **21**(2): p. 167-78.
  19. Harrison, S.C., et al., *Bladder instability and denervation in patients with bladder outflow obstruction*. Br J Urol, 1987. **60**(6): p. 519-22.
  20. Gosling, J.A., et al., *Decrease in the autonomic innervation of human detrusor muscle in outflow obstruction*. J Urol, 1986. **136**(2): p. 501-4.
  21. O'Connor, L.T., Jr., E.D. Vaughan, Jr., and D. Felsen, *In vivo cystometric evaluation of progressive bladder outlet obstruction in rats*. J Urol, 1997. **158**(2): p. 631-5.
  22. Mills, I.W., et al., *Studies of the pathophysiology of idiopathic detrusor instability: the physiological properties of the detrusor smooth muscle and its pattern of innervation*. J Urol, 2000. **163**(2): p. 646-51.
  23. Speakman, M.J., et al., *Bladder outflow obstruction--a cause of denervation supersensitivity*. J Urol, 1987. **138**(6): p. 1461-6.
  24. Kokubun S, S.K., Takahashi N, et al. , *NEURON PROTECTION AGENT TAC-302 PREVENTS BLADDER DENERVATION AND DYSFUNCTION FOLLOWING PARTIAL BLADDER OUTLET OBSTRUCTION IN RAT*. Poster presented at ICS-IUGA annual meeting 2010: p. 23-27.
  25. Pandita, R.K., et al., *Cystometric evaluation of bladder function in non-anesthetized mice with and without bladder outlet obstruction*. J Urol, 2000. **164**(4): p. 1385-9.
  26. Abrams, P.H., et al., *The results of prostatectomy: a symptomatic and urodynamic analysis of 152 patients*. J Urol, 1979. **121**(5): p. 640-2.
  27. Akino, H., M. Gohara, and K. Okada, *Bladder dysfunction in patients with benign prostatic hyperplasia: relevance of cystometry as prognostic indicator of the outcome after prostatectomy*. Int J Urol, 1996. **3**(6): p. 441-7.
  28. Zhang, P., Z. Wu, and J. Gao, *Influence of bladder outlet obstruction and detrusor contractility on residual urine in patients with benign prostatic hyperplasia*. Chin Med J (Engl), 2003. **116**(10): p. 1508-10.
  29. Elbadawi, A., S.V. Yalla, and N.M. Resnick, *Structural basis of geriatric voiding*

- dysfunction. *II. Aging detrusor: normal versus impaired contractility*. J Urol, 1993. **150**(5 Pt 2): p. 1657-67.
30. Kok, D.J., et al., *Changes in bladder contractility and compliance due to urethral obstruction: a longitudinal followup of guinea pigs*. J Urol, 2000. **164**(3 Pt 2): p. 1021-4; discussion 1025.
  31. Oh, M.M., et al., *Is there a correlation between the outcome of transurethral resection of prostate and preoperative degree of bladder outlet obstruction?* Asian J Androl, 2012. **14**(4): p. 556-9.
  32. Dunn, C.J., A. Matheson, and D.M. Faulds, *Tamsulosin: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the management of lower urinary tract symptoms*. Drugs Aging, 2002. **19**(2): p. 135-61.
  33. Nagabukuro, H., S. Okanishi, and T. Doi, *Effects of TAK-802, a novel acetylcholinesterase inhibitor, and various cholinomimetics on the urodynamic characteristics in anesthetized guinea pigs*. Eur J Pharmacol, 2004. **494**(2-3): p. 225-32.
  34. Yoshida, M., et al., *Efficacy of TAC-302 for patients with detrusor underactivity and overactive bladder: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 study*. World J Urol, 2022. **40**(11): p. 2799-2805.
  35. de Groat, W.C. and N. Yoshimura, *Afferent nerve regulation of bladder function in health and disease*. Handb Exp Pharmacol, 2009(194): p. 91-138.
  36. Chapple, C.R., et al., *Loss of sensory neuropeptides in the obstructed human bladder*. Br J Urol, 1992. **70**(4): p. 373-81.
  37. Zeng, J., et al., *Cause of residual urine in bladder outlet obstruction: an experimental study in the rat*. J Urol, 2012. **188**(3): p. 1027-32.
  38. Komura, K., et al., *Current treatment strategies for advanced prostate cancer*. Int J Urol, 2018. **25**(3): p. 220–31.
  39. de Bono, J.S., et al., *Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer*. N Engl J Med, 2011. **364**(21): p. 1995–2005.
  40. Scher, H.I., et al., *Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy*. N Engl J Med, 2012. **367**(13): p. 1187–97.
  41. Antonarakis, E.S., et al., *AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer*. N Engl J Med, 2014. **371**(11): p. 1028–38.
  42. Joseph, J.D., et al., *A clinically relevant androgen receptor mutation confers resistance to second-generation antiandrogens enzalutamide and ARN-509*. Cancer Discov, 2013. **3**(9): p. 1020–9.
  43. Wadosky, K.M. and S. Koochekpour, *Molecular mechanisms underlying resistance to*

- androgen deprivation therapy in prostate cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(39): p. 64447-64470.
44. Azad, A.A., et al., *Androgen receptor gene aberrations in circulating cell-free DNA: biomarkers of therapeutic resistance in castration-resistant prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(10): p. 2315–24.
  45. Wyatt, A.W., et al., *Genomic alterations in cell-free DNA and enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer*. JAMA Oncol, 2016. **2**(12): p. 1598–606.
  46. Romanel, A., et al., *Plasma AR and abiraterone-resistant prostate cancer*. Sci Transl Med, 2015. **7**(312): p. 312re10.
  47. Salvi, S., et al., *Circulating cell-free AR and CYP17A1 copy number variations may associate with outcome of metastatic castration-resistant prostate cancer patients treated with abiraterone*. Br J Cancer, 2015. **112**(10): p. 1717–24.
  48. Mostaghel, E.A., et al., *Resistance to CYP17A1 inhibition with abiraterone in castration-resistant prostate cancer: induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(18): p. 5913–25.
  49. Soifer, H.S., et al., *Direct regulation of androgen receptor activity by potent CYP17 inhibitors in prostate cancer cells*. J Biol Chem, 2012. **287**(6): p. 3777–87.
  50. Hoefer, J., et al., *Critical role of androgen receptor level in prostate cancer cell resistance to new generation antiandrogen enzalutamide*. Oncotarget, 2016. **7**(37): p. 59781–94.
  51. Grasso, C.S., et al., *The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer*. Nature, 2012. **487**(7406): p. 239–43.
  52. Sharp, A., et al., *Androgen receptor splice variant-7 expression emerges with castration resistance in prostate cancer*. J Clin Invest, 2019. **129**(1): p. 192–208.
  53. Seki, M., et al., *Analysis of novel enzalutamide-resistant cells: upregulation of testis-specific Y-encoded protein gene promotes the expression of androgen receptor splicing variant 7*. Transl Cancer Res, 2020. **9**(10): p. 6232–45.
  54. Gottlieb, B., et al., *The androgen receptor gene mutations database: 2012 update*. Hum Mutat, 2012. **33**(5): p. 887–94.
  55. Hu, R., et al., *Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(14): p. 3457–62.
  56. Cao, B., et al., *Androgen receptor splice variants activating the full-length receptor in mediating resistance to androgen-directed therapy*. Oncotarget, 2014. **5**(6): p. 1646–56.
  57. Moilanen, A.M., et al., *Discovery of ODM-201, a new-generation androgen receptor*

- inhibitor targeting resistance mechanisms to androgen signaling-directed prostate cancer therapies*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12007.
58. Lallous, N., et al., *Functional analysis of androgen receptor mutations that confer anti-androgen resistance identified in circulating cell-free DNA from prostate cancer patients*. Genome Biol, 2016. **17**: p. 10.
  59. Prekovic, S., et al., *The effect of F877L and T878A mutations on androgen receptor response to enzalutamide*. Mol Cancer Ther, 2016. **15**(7): p. 1702–12.
  60. Bono, J.S.D., et al., *First-in-human study of TAS3681, an oral androgen receptor (AR) antagonist with AR and AR splice variant (AR-SV) downregulation activity, in patients (pts) with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) refractory to abiraterone (ABI) and/or enzalutamide (ENZ) and chemotherapy (CT)*. Journal of Clinical Oncology, 2021. **39**(15\_suppl): p. 5031-5031.
  61. Conteduca, V., et al., *Androgen receptor gene status in plasma DNA associates with worse outcome on enzalutamide or abiraterone for castration-resistant prostate cancer: a multi-institution correlative biomarker study*. Ann Oncol, 2017. **28**(7): p. 1508-1516.
  62. Torquato, S., et al., *Genetic Alterations Detected in Cell-Free DNA Are Associated With Enzalutamide and Abiraterone Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer*. JCO Precis Oncol, 2019. **3**.
  63. Rathkopf, D.E., et al., *Androgen receptor mutations in patients with castration-resistant prostate cancer treated with apalutamide*. Ann Oncol, 2017. **28**(9): p. 2264-2271.
  64. Watson, P.A., V.K. Arora, and C.L. Sawyers, *Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(12): p. 701-11.
  65. Tran, C., et al., *Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer*. Science, 2009. **324**(5928): p. 787–90.

## 本論文内容に関する発表論文

1. TAC-302 promotes neurite outgrowth of isolated peripheral neurons and prevents bladder denervation related bladder dysfunctions following bladder outlet obstruction in rats

Neurourology and Urodynamics. 2017;1–9.

S. Yoshida, N. Orimoto, H. Tsukihara, T. Noma, A. Hakozaki, E. Sasaki

2. Therapeutic effect of TAC-302, a cyclohexenoic fatty alcohol derivative, on bladder denervation-related storage and voiding dysfunctions in rats

Neurourology and Urodynamics. 2018;1–8.

S. Yoshida, T. Noma, K. Miyoshi, H. Tsukihara, N. Orimoto, A. Hakozaki, E. Sasaki

3. TAS3681, an androgen receptor antagonist, prevents drug resistance driven by aberrant androgen receptor signaling in prostate cancer

Molecular Oncology. *In press*.

S. Yoshida, D. Kajiware, M. Seki, M. Tayama, H. Y. Tanaka, H. Mizutani, R. Fujita,

K. Yamamura, S. Okajima, M. Asai, K. Minamiguchi

## 謝辞

本論文の作成にあたり、有益な御助言、御高閲を賜りました 九州大学大学院薬学研究院 薬剤学分野 小柳 悟 教授、国際医療福祉大学 福岡薬学部 教授 家入 一郎 教授、九州大学大学院 薬学研究院 薬物動態学分野 松永 直哉 教授、九州大学大学院 薬学研究院 薬物動態学分野 濱村 賢吾 講師に謹んで深謝いたします。

また、本研究の端緒を与えて頂くと共に、研究全般および論文執筆に際して、多大なるご理解をいただきました 大鵬薬品工業株式会社 水洗 慎司 博士に深く感謝いたします。

本研究活動を行う機会を与えてくださり、終始有益な御助言と温かいご指導を承りました、大鵬薬品工業株式会社 林 勸生 博士、大鵬薬品工業株式会社 野間 崇央 博士、大鵬薬品工業株式会社 南口 和久 博士、TAC-302 プロジェクトチームおよび TAS3681 プロジェクトチームの皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、本研学生活を通じて惜しみない援助と多大なるご理解をいただきました 家族に心から感謝いたします。