

| | |
|---------|--|
| 氏名・(本籍) | 松田 芳教 (秋田県) |
| 専攻分野の名称 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 医博甲第 1031 号 |
| 学位授与の日付 | 令和 2 年 9 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 研究科・専攻 | 医学系研究科医学専攻 |
| 学位論文題名 | Impact of nuclear YAP1 expression in residual cancer after neoadjuvant chemohormonal therapy with docetaxel for high-risk localized prostate cancer (高リスク限極性前立腺癌に対する術前内分泌併用ドセタキセル療法後の残存腫瘍における核内 YAP1 発現の影響) |
| 論文審査委員 | (主査) 大森 泰文 教授 (副査) 柴田 浩行 教授 中山 勝敏 教授 |

学位論文内容要旨

論文題目

Impact of nuclear YAP1 expression in residual cancer after neoadjuvant chemohormonal therapy with docetaxel for high-risk localized prostate cancer

(論文題目の和訳)

高リスク限局性前立腺癌に対する術前内分泌併用ドセタキセル療法後の残存腫瘍における核内 YAP1 発現の影響

申請者氏名 松田 芳教

研究目的

前立腺癌は欧米を中心に罹患率、死亡数が増加しており、男性において最も重要な癌の 1 つである。前立腺癌において去勢療法は有効な治療であるが、徐々に効果は減弱し、去勢抵抗性前立腺癌となる。去勢抵抗性前立腺癌においてドセタキセルを用いた化学療法は基本的治療法の一つである。しかし、多くの症例ではいずれドセタキセル抵抗性を示す事が知られており、その機序は明らかでない。

今回我々はドセタキセル抵抗性を有する前立腺癌細胞株における Hippo 経路蛋白発現の影響と、術前化学内分泌療法後に前立腺全摘除術を施行されたヒト前立腺癌検体における、ステロイド受容体及び Hippo 経路蛋白の発現と治療成績や予後との関連を検討した。

研究方法

In vitro 実験では、AR-V7 を発現し、臨床での内分泌療法抵抗性前立腺癌プロファイルを比較的反映していると考えられる前立腺癌細胞株 (22Rv1) を使用した。これを使用しドセタキセル抵抗性を獲得させた前立腺癌細胞株 (22Rv1-DR) を樹立した。ウエスタンブロッティング法で parental の 22Rv1 と 22Rv1-DR の Hippo 経路蛋白の発現を比較した。また、22Rv1-DR に対して siRNA を用い、Hippo 経路蛋白の一つである YAP1 遺伝子の発現を抑制した。YAP1 阻害下で細胞増殖、細胞周期、細胞死への影響を評価した。

当院で倫理委員会の承認のもと行った高リスク限局性前立腺癌患者に対する術前化学内分泌療法の効果を検討した第 II 相臨床試験において摘出された患者 70 例 (内、術前化学療法施行群 44 例、術前ホルモン療法施行群 11 例、非術前療法群 15 例の 3 群を含む) の前立腺癌検体を用い、癌上皮を含む前立腺組織計 203 コアの Tissue Microarray を作成した。

各コアの癌上皮細胞核、癌上皮細胞質、間質細胞におけるステロイド受容体及び Hippo 経路蛋白 (AR, GR, PR, ER α , YAP1, MOB4A) の発現強度、発現領域を免疫染色で測定し、スコア化した。治療の異なる 3 群間における各蛋白発現の差異を比較検討した。また化学内分泌

療法群での各蛋白発現と生化学的再発の関連相関を統計的に解析した。

研究成績

22Rv1-DR は 22Rv1 に比較し、ドセタキセル IC₅₀ が有意に上昇 (7.92 vs 2.39 nmol/L $p = 0.002$) し、MDR1 高発現であり、ドセタキセル投与下でアポトーシス抵抗性であった。また全細胞溶解液では 22Rv1 と 22Rv1-DR に Hippo 経路蛋白発現の差を認めなかったが、22Rv1-DR 細胞核内において YAP1 発現高値・活性上昇と TEAD 発現の低下が認められた。siRNA による YAP1 遺伝子発現阻害は 22Rv1-DR の細胞増殖を有意に阻害した (day4, $p = 0.038$; day6, $p = 0.049$)。また YAP1 遺伝子発現阻害はアポトーシスや細胞周期へ影響しなかった。以上より化学内分泌療法抵抗性前立腺癌細胞株では Hippo 経路関連蛋白 YAP1 は核内で高発現、活性化し、細胞増殖に関連する可能性が示唆された。

ヒト前立腺癌組織に関して、AR と GR は癌上皮と間質の両方に発現し、PR と ER α は主に間質に発現した。癌上皮細胞核 AR は非術前療法群で他群より有意に高かった ($p < 0.001$)。癌上皮細胞核 GR 発現、および間質細胞質 PR 発現は術前化学内分泌療法群で他群より有意に高かった ($p < 0.001$)。癌上皮細胞核 YAP1 発現は化学内分泌療法群で高値であったが、各群間で有意な差はなかった ($p = 0.104$)。

単変量解析において術前 PSA 高値、病理学的 T3 以上、病理学的 N1、癌上皮細胞核 AR 高発現、癌上皮細胞核 YAP1 高発現は有意に術前化学内分泌療法施行群の生化学的再発に関連した ($p = 0.006$, $p < 0.001$ $p = 0.001$ $p = 0.017$ $p = 0.033$)。多変量解析において術前 PSA 高値、病理学的 N1、癌上皮細胞核 YAP1 高発現は術前化学療法施行群の生化学的再発の独立した危険因子であった (HR = 1.03 95%CI 1.01-1.05 $p = 0.001$; HR=3.94 95%CI, 1.06-14.62, $p = 0.04$; HR= 3.32, 95%CI, 1.32-8.37, $p = 0.011$)。以上より核内 YAP1 は化学内分泌療法後の残存癌上皮で高発現し、手術後の生化学的再発の独立した危険因子であった。

結論

前立腺癌化学内分泌療法抵抗性に YAP1 が関連する可能性が示唆された。化学内分泌療法後全摘手術症例のバイオマーカーとなる可能性のみならず、新規の治療標的となりうる可能性が示唆された。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 大森泰文

申請者： 松田芳教

論文題名： Impact of nuclear YAP1 expression in residual cancer after neoadjuvant chemohormonal therapy with docetaxel for high-risk localized prostate cancer
(和訳) 高リスク限局性前立腺癌に対する術前内分泌併用ドセタキセル療法後の残存腫瘍における核内 YAP1 発現の影響

要旨

高リスク限局性前立腺癌に対して行われる術前内分泌併用ドセタキセル療法(CHT)後に、治療抵抗性を呈しているとみなされる局所残存腫瘍内での核内 YAP1 発現の意義を検討した。まず、ヒト前立腺癌 22Rv1 細胞のドセタキセル(DTX)耐性株を樹立し、親株である DTX 感受性株と比較検討した。耐性株においては薬剤耐性タンパクである MDR1 の発現が誘導されており、感受性株において DTX により誘導されるアポトーシスが、耐性株では観察されなくなった。また、YAP1 タンパクの発現をみたところ、両株の間で YAP1 の細胞質および核内総発現量に差はなかったものの、核内 YAP1 の発現量は耐性株で著明に増加していた。さらにこれら核内 YAP1 の大部分は脱リン酸化された機能性 YAP1 であり、RNA 干渉で YAP1 をノックダウンすると細胞増殖が抑制された。次に、摘出された前立腺癌の 70 検体を DTX による CHT 施行群、術前内分泌療法施行群、非術前療法群の 3 群に分け、それぞれにおける YAP1 の発現を、アンドロゲン受容体やグルココルチコイド受容体等の発現とともに検討するために、全検体を用いて tissue microarray を作製し、免疫組織化学染色にて発現量をスコア化、細胞内局在とともに評価した。核内 YAP1 の発現量は CHT 施行群で高値ではあったが、各群間で有意な差はなかった。しかしながら、単変量解析では核内 YAP1 の高発現は有意に CHT 施行群の生化学的再発(血中 PSA 値の上昇)に関連しており、多変量解析では

CHT 施行群における生化学的再発の独立した危険因子であった。したがって、核内 YAP1 の発現は DTX による CHT を施行された患者において、高リスクを示唆するバイオマーカーになり得ることが示された。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

核内 YAP1 の発現を CHT に対する治療抵抗性に関連付けるという、斬新な着目に基づく研究である。また、核内 YAP1 の重要性を *in vitro* の実験と臨床検体を用いた解析を組み合わせ明瞭に示した集学的な論文構成となっており、説得力が秀逸である。

2) 重要性

内分泌療法や化学療法に対して治療抵抗性を示す高リスク前立腺癌の存在は、きわめて重要な臨牀的課題である。本論文はそのようなタイプの癌を鑑別するためのバイオマーカーとして、また新たな治療標的として核内 YAP1 が有用であることを示しており、高く評価される。

3) 研究方法の正確性

DTX 耐性株の樹立は、IC₅₀に基づいた定法に従ってなされており、生化学的実験や細胞生物学的実験も正しく対照を取りながら行われている。各実験も再現性を検討しながら進めており信頼がおける。臨床検体を用いた免疫組織化学染色とそのスコアリングは、経験ある複数の病理専門医が盲検で行っており、バイアスの入る余地がない。いずれのデータについても統計学的検討を加えられており、客観的な評価法で、正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

研究の目的、方法、結果に関して詳細かつ簡潔に記載されている。また、必ずしも単純とはいえない研究結果であるが、可能性のある多くの解釈を公正に扱い、深みのある論理的な考察を展開しており、今後、本論文がこの研究分野で重要なリファレンスになるものと考えられる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。