

アルキル化剤で修飾した pyrrole-imidazole (PI)
ポリアミドの前立腺がん細胞に対する抗腫瘍効果の検討

日本大学大学院 医学研究科 博士課程

外科系 泌尿器科学専攻

船越 大吾

2022 年

指導教員 高橋 悟

アルキル化剤で修飾した pyrrole-imidazole (PI)
ポリアミドの前立腺がん細胞に対する抗腫瘍効果の検討

日本大学大学院 医学研究科 博士課程

外科系 泌尿器科学専攻

船越 大吾

2022 年

指導教員 高橋 悟

目次

【概要】	1
【略語一覧】	3
【諸言】	6
I 前立腺の解剖学的構造と前立腺がんの疫学.....	6
II 前立腺がんの標準治療.....	6
III 前立腺がんにおけるARシグナル経路.....	7
IV CRPCの治療薬.....	9
V CRPC治療抵抗性メカニズム.....	10
VI ARを補助する因子群の変性と新規治療薬の開発.....	12
【目的】	17
【方法】	18
【結果】	25
【考察】	28
【まとめ】	34
【謝辞】	35
【図・図説】	36
【表】	46
【研究業績】	55

【概要】

前立腺がんの成長と進行には、アンドロゲンとアンドロゲン受容体 (AR) を介したアンドロゲンシグナル伝達経路が重要な役割を担っている。進行した前立腺がん治療には内分泌療法が有効だが、治療抵抗性となり去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) へと進行する。オクタマー転写因子 1 (OCT1) は体内に幅広く存在しているが、前立腺では AR と協調する転写因子であり、AR 応答遺伝子の発現に影響を与えている。CRPC の増殖機序として、アンドロゲン受容体 (AR) のネガティブフィードバック機構が内分泌療法によって抑制されることにより、AR の感受性が亢進し、AR 応答遺伝子が活性化されることが明らかになっている [1, 2]。これまで OCT1 が AR 応答遺伝子 ACSL3 の発現を誘導し、アンドロゲン合成を促進することで、この感受性が亢進した AR とともに CRPC の増殖に重要な役割を果たしていることが判明しており、この OCT1 による ACSL3 発現誘導メカニズムを特異的に阻害する pyrrole-imidazole (PI) ポリアミド (OCT1-PIP) は CRPC モデル細胞の増殖抑制効果を示している。PI ポリアミドは、ドラッグデリバリーシステムを介さずに DNA に非共有結合することができ、また、さまざまな化学修飾を受けることができるという特徴がある。

本研究では、OCT1-PIP の腫瘍増殖抑制効果を高めるために、DNA アルキル化剤であるクロラムブシル (ChB) で修飾した PI ポリアミド (OCT1-PIP-ChB) を開発し、複数のがん細胞株の増殖に対する効果を解析した。ホルモン感受性前立腺がん細胞株 LNCaP、去勢抵抗性前立腺がんモデルで AR 陽性の 22Rv1 ならびに AR 陰性

の PC3、膵臓がん細胞株 BxPC3、大腸がん細胞株 HCT116、コントロールとして、正常前立腺上皮細胞 RWPE ならびに乳腺上皮細胞 MCF-10A を用いた。WST8 を用いた細胞増殖アッセイを行い、50%阻害濃度 (IC50) を求めた。各薬剤の IC50 は、MCF-10A を除いた細胞株では OCT1-PIP-ChB で最も低く、LNCaP と 22Rv1 の IC50 は他の細胞に比べて低かった。前立腺がん細胞に与える分子生物学的検討として 22Rv1 を用いてマイクロアレイを行ったところ、DNA 二本鎖切断修復機構に関与する遺伝子群が最も多く抑制されていた。さらに 22Rv1 Xenograft モデルを用いて *in vivo* における増殖能への影響を検討したところ、OCT1-PIP-ChB はコントロール群に比べ有意に腫瘍サイズの縮小を認めた。これらの結果から、本剤は PI ポリアミドに ChB を修飾することで、AR 陽性前立腺がん細胞に対して著しい増殖抑制効果を発揮する可能性を有し、新規治療剤としての可能性が示唆された。

【略語一覧】

ACSL3: acyl-coenzyme A synthetase 3

AKR1C3: Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C3

AR: androgen receptor

ARAT: androgen receptor-axis-targeted

ARE: androgen response element

AREs: androgen response elements

AR-V7: Androgen Receptor Splice Variant-7

BET: Bromodomain and extraterminal

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BRCA1: Breast Cancer 1

BRD2: Bromodomain Containing 2

BRD3: Bromodomain Containing 3

BRD4: Bromodomain Containing 4

BRDT: Bromodomain Testis Associated

CRPC: castration resistant prostate cancer

CYP17: cytochromeP45017 α -hydroxylase/17,20lyase

DAB: diaminobenzidine

DDS: drug delivery system

DHEAS: dehydroepiandrosterone

DHT: dihydrotestosterone

DMSO: Dimethyl sulfoxide

E2F: E2F transcription factor

FBS: fetal bovine serum

Fmoc: Fluorenyl-Methoxy-Carbonyl

FOXA1: forkhead box A1

GADD: Growth Arrest And DNA Damage

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GATA2: GATA binding protein 2

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HSD3B1: Hydroxy-Delta-5-Steroid Dehydrogenase, 3 Beta- And Steroid

Delta-Isomerase 1

IC50: inhibitory concentration 50

Im: N-methylimidazole

MAD2L2: Mitotic Arrest Deficient 2 Like 2

MYC: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

NABP1: Nucleic acid binding protein 1

OCT1: octamer transcription factor 1

PARP: poly (ADP-ribose) polymerase

PIP: pyrrole-imidazole polyamide

PSA: prostate specific antigen

PSG: Penicillin-Streptomycin-L-Glutamine Solution

Py: N-methylpyrrole

qRT-PCR: quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

siRNA: small interfering RNA

STAT: signal transducer and activator of transcription

WST: water-soluble tetrazolium salt

【諸言】

I 前立腺の解剖学的構造と前立腺がんの疫学

前立腺は膀胱の下方で尿道を取り囲むように位置し、主に精液産生に関連した役割を持つ。前立腺がんは、前立腺のおもに外腺に発生するがんであり、様々な組織型の悪性腫瘍が生じうるが、そのほとんどは腺がんである。食生活の欧米化ならびに高齢化社会の到来とあいまって、本邦における前立腺がんの罹患率と死亡率が年々増加している。本邦の前立腺がん罹患数について、2018年の国立がん研究センターの推計では、年間91,215人に達し男性がんで第1位を維持している[3]。このように前立腺がん新規治療薬の需要は今後さらに国内外で増加することが予想される。

II 前立腺がんの標準治療

前立腺がんの治療法には、手術療法、放射線療法、内分泌療法、化学療法と多くの選択肢があり、病期や病理所見によるがんの悪性度、患者の期待余命や治療による侵襲性および合併症などを考慮し治療法を選択する。乳がんにおけるエストロゲン受容体の有無とは異なり、前立腺がんでは後述するアンドロゲン受容体(AR)の発現については診断時に必須では無く、そのため発現状況による治療法検討についてはガイドラインでは言及されていない。低リスクの限局性前立腺がんには、前立腺癌マーカーである prostate specific antigen (PSA) の血中濃度値を定期的に測定し経過観察を行う PSA 監視療法という方法を選択する場合もある。

がんが前立腺内にとどまっている限局性前立腺がんの場合では、手術療法、放射線療法が適応となる。手術療法は最も根治性の高い治療法として位置付けられているが、10年以上の期待余命がある、全身状態や合併症などの問題がない等の条件を満たす必要がある。放射線療法も限局性前立腺がんの初期治療や術後の後療法または救済療法を目的に適用される。身体への負担が少ないことが大きな利点であり、高齢で合併症を有するような症例でも施行可能である。

手術療法、放射線療法が施行できない症例や転移を有する進行性前立腺がんについては内分泌療法が適応となる。前立腺がんは精巣や副腎皮質から産生されるアンドロゲン(男性ホルモン)の刺激によって増殖・進行するため、内分泌療法によりアンドロゲンを抑制しがんの進行を防ぐことができる。

Ⅲ 前立腺がんにおける AR シグナル経路

前立腺がんの増殖・進展は主に男性ホルモン並びに AR、それに続く AR シグナル経路により制御されており、男性ホルモンに感受性がある[4]。AR はステロイドホルモン受容体ファミリーに属し、N 末端領域、DNA 結合領域、リガンド結合領域に分かれる[5]。N 末端領域は AR の活性を調節しており、様々な補助因子が結合する。リガンド結合領域はアンドロゲンが結合する部位であり、アンドロゲンシグナル経路の第一段階に関係する。

テストステロンは前立腺がん上皮細胞において 5 α 還元酵素によりジヒドロテストステロンの(DHT)に変換される。DHT はテストステロンに比べ AR 内のリガンド結合領域に対する親和性が高く、前立腺細胞においては主要なリガンドである。DHT と結合した AR は N 末端領域にコファクターが結合することにより活性化され核内に移行する。そこで標的遺伝子(AR 応答遺伝子)のプロモーターないしエンハンサー領域内に存在する AR 結合配列 (Androgen responsive elements ; AREs) に AR が結合し、遺伝子の発現が活性化される(図1)。通常、遺伝子は4つのコアヒストンに巻き付いた構造でヌクレオソーム内に凝集されており、AR の ARE への結合を妨げている。そのため pioneer factor と呼ばれる GATA binding protein 2 (GATA2)および forkhead box A1 (FOXA1)が標的領域のクロマチンの凝集を開くことで転写因子の DNA 結合を促進する[6-8]。実際に AR 結合部位の 68%では GATA2、FOXA1、Octamer transcription factor 1 (OCT1)等の転写因子と相互作用することによって標的遺伝子の転写を制御している[9]。AR 応答遺伝子の多くは細胞増殖に関与しており、そのため去勢術あるいは男性ホルモンを抑制する内分泌療法は、ホルモン感受性前立腺がんに対する有効な治療の一つであるが、数年以内に多くの症例で治療抵抗性を示し、去勢抵抗性前立腺がん(Castration resistant prostate cancer; CRPC)と呼ばれる難治性がんへと移行する。

IV CRPC の治療薬

CRPC 細胞内では AR シグナル経路が変性しているため低濃度のアンドロゲンでも AR は異常活性を示し、AR を介したシグナル伝達経路が治療の鍵となることが明らかになっている[10]。そのため、日本では現在 CRPC に対する治療法としてタキサン系の抗がん剤に加え、ビカルタミドやフルタミドといった抗アンドロゲン剤より高度に AR シグナル経路を抑制するアビラテロン、エンザルタミド、アパルタミド、ダロルタミドに代表されるアンドロゲン受容体標的薬 (androgenreceptor-axis-targeted: ARAT) が承認されている。

(1) アビラテロン

アビラテロンは、コレステロールからアンドロゲン合成を行う合成酵素の一つである CYP17(cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20lyase) を選択的に阻害する薬剤である。CRPC では CYP17 の発現が亢進しており、去勢下でも微量のテストステロンが合成されるため、前立腺がん細胞内にアンドロゲンが供給されている[11]。同様に転移腫瘍組織でも、アンドロゲン合成酵素である CYP17、HSD3B1、AKR1C3 の発現が亢進し、腫瘍組織内のテストステロン含量が増加することが報告されている[12]。アビラテロンは精巣だけでなく、副腎や CRPC ならびに転移組織など、アンドロゲンを産生する全ての臓器に作用するため、より強力にアンドロゲン合成を抑制する。遠隔転移の有無にかかわらず全ての去勢抵抗性前立腺がんに適応がある。

(2) エンザルタミド

エンザルタミドは、AR へのアンドロゲンの結合を競合的に阻害し、AR の核内移行および AR と DNA 上の転写因子結合領域との結合を阻害し、AR 標的遺伝子の転写を抑制する非ステロイド性抗アンドロゲン薬である。AR に対する親和性が強く、高い AR 結合阻害能を有する[13]。アビラテロンと同様、遠隔転移の有無にかかわらず全ての去勢抵抗性前立腺がんに適応がある。

(3)アパルタミド

アパルタミド[14]は、エンザルタミドと同様、非ステロイド性抗アンドロゲン薬であり AR シグナル伝達を阻害する低分子化合物である。遠隔転移を有さない CRPC に適応がある。

(4)ダロルタミド

ダロルタミド[15]は、エンザルタミドやアパルタミドと異なり極性基を有するピラゾール環等を有する非ステロイド性抗アンドロゲン剤あり、脳への移行がより少ない特徴を有する。そのため全身倦怠感や食思不振などの副作用発現頻度が他の 2 剤と比較が少ないとされる。アパルタミド同様遠隔転移を有さない CRPC に適応がある。

V CRPC 治療抵抗性メカニズム

CRPC に対して、上述の薬物治療はこれまでの治療と比較し生命予後延長に著しい効果を示したが、しかし次第に治療抵抗性を獲得してしまう。それ故に、ARAT や抗がん剤耐性を示した CRPC に対する治療は確立されておらず、模索している状況で

ある。近年の研究では、CRPC 細胞内で認められた AR シグナル経路の変性は治療によってさらに進行し、新たな抵抗性を獲得していることが明らかになってきており、依然として AR シグナル経路は多剤耐性 CRPC で大きな役割を担っている[10]。このシグナル経路において、AR 自体に関連する変異では、発現増幅、ポイントミューテーションや splicing variant が挙げられ、その他の変性では AR 補助因子群の変性等が挙げられる[16]。(図 2)

AR 自体に関連する変異

① 発現増幅

AR 発現領域上流のエンハンサー領域やプロモーターの異常活性化、あるいは AR 発現領域自体が二重三重と増えることにより AR の発現が大幅に上昇する。限局性前立腺がんと比較して、CRPC では AR の増幅をより多く認めており、AR の増幅が全ての遺伝子変異のなかで最も多く 62.7%の症例において認めると報告されている[17]。

② 点突然変異

AR の遺伝子変異は、近年の次世代 Sequence の解析のなかでも CRPC の約 20%に認められている[18]。リガンド結合領域に突然変異した AR はリガンド特異性が低下し、アンドロゲン以外の分子をリガンドとして認識するようになり、従来の抗アンドロゲン剤でむしろ前立腺がんが増殖を示す抗アンドロゲン除去症候群と関係している

[19]。また、AR の構造がポイントミューテーションによって破壊され、ARAT に対する抵抗性の原因となっている。

③ AR の Splicing Variant

Splicing Variant の多くはリガンド結合領域が存在する C 末端が欠如しており、リガンドに依存することなく、恒常的に活性化された AR を誘導し前立腺がんを進行させる。

この 3 つの変異は ARAT とタキサン系抗がん剤に対する抵抗性に大きな影響を与えている[20]。

VI AR を補助する因子群の変性と新規治療薬の開発

前述のとおり AR シグナル経路は AR 以外にこれを補助する因子群も存在する。補助因子は DNA に結合せず直接 AR に結合し、転写協調因子は逆に AR に結合しないが DNA に結合し、それぞれ AR シグナル経路の調節を行っている。リガンド結合領域がない AR 変異体にはこの補助因子が変異体の活性に重要である[21]。また、転写協調因子は様々な種類が存在しており、ホルモン感受性前立腺がん細胞と CRPC 細胞を比較すると、E2F transcription factor (E2F)[22, 23]、v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC)[24, 25]や signal transducer and activator of transcription (STAT)[26]などの前立腺がんの進行

に働く転写協調因子が CRPC 細胞では多く発現し、CRPC に特異的な AR 応答遺伝子を発現することが報告されている[27]。

これら AR をサポートする因子群を標的とすれば、AR 自体の変異からの影響を受けないため、これらを標的とする ARAT とは異なったメカニズムをもつ新規治療薬の開発が注目されている。

一例として、AR の補助因子である Bromodomain and extraterminal (BET)ファミリータンパク質を標的とした BET 阻害剤が現在海外で臨床試験中である[28]。BET ファミリータンパク質は、ユビキタスに存在する BRD2、BRD3、BRD4 と、男性の生殖細胞に局在する BRDT の4つの BRD 含有タンパク質から成る。BET タンパク質は、AR の N 末端ドメインと直接相互作用する[29]。さらに、BRD4 は AR および AR の Splicing Variant である AR-V7 と多数の共有 DNA 結合座を持つ[29, 30]。これら一連の転写制御により、BRD4 は c-myc などのがん遺伝子の転写を促進し、がん細胞の増殖や分化に寄与する。前立腺がんにおいては AR 経路の発現および活性に影響を与えることから、特に注目されている。したがって、BET 阻害剤は、AR 標的遺伝子や MYC の発現をダウンレギュレートすることで、前立腺がんの進行を抑制する[29, 30]。

一方、本研究で着目している AR 転写協調因子 OCT1 は pioneer factor と共に AR と協調して働きで作用しアンドロゲンシグナル伝達を促進することが報告されている

[9]。AR 陽性前立腺がん細胞 LNCaP 細胞を用いた検討では OCT1 の標的遺伝子のうち acyl-coenzyme A synthetase 3 (ACSL3) が最も高発現の遺伝子として報告されている。ACSL3 は前立腺がん細胞内において副腎由来の dehydroepiandrosterone(DHEAS) からテストステロンの合成を促進することで前立腺がんの増殖、進行に関与している[31]。この発現を調節する OCT1 結合領域を同定し、特異的に抑制する PI ポリアミド(OCT1-PIP)が開発された[16]。

VII ピロールイミダゾールポリアミド(pyrrole-imidazole polyamide: PIP)の特性

従来遺伝子制御薬として siRNA、アンチセンス DNA ならびにがん化した細胞に細胞毒性遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを投与する治療法が挙げられる。しかし、干渉性RNAやアンチセンス DNA は生体内で分解され易いため安定性が低く、また生体内において細胞毒性遺伝子産物を発現させる治療法も必ずしも安全とはいえず、これらの治療法は前立腺がんの治療において十分な方法とはいえなかった。これに対し、前立腺がんの治療に有効かつ、安定で安全な化合物としてPIポリアミドが開発された。PIポリアミドは芳香族アミノ酸 N-methylpyrrole(Py) および N-methylimidazole(Im) で構成される中分子化合物である。DNA に配列特異的に結合する性質を持ち、Im/Py ペアは G(グアニン)・C(シトシン) を、Py/Py ペアは T(チミン)・A(アデニン) および A・T を認識するた

め、Im/Py と Py/Py の組み合わせ次第で多様な配列の DNA に結合させることが可能である[32, 33]。

PIポリアミドは転写因子よりも強力に二本鎖 DNA に配列特異的に結合する性質を持ち、遺伝子プロモーター上の転写因子結合配列を認識するように設計すると、転写因子を競合的に阻害し、下流の遺伝子発現を抑制することが出来る(図 3)。また、アンチセンス DNA、siRNA などの核酸医薬は核酸分解酵素により分解され易く、ドラッグデリバリーシステム(DDS)が必要であるのに対し、PI ポリアミドは核酸構造を持たない低分子化合物であるため、DDS がなくても細胞の核内に取り込まれ、核酸分解酵素やタンパク分解酵素による分解を受けずに生体内で安定して存在することができる。さらに siRNA は遺伝子発現をノックダウンするために副作用が懸念されるに対し、PI ポリアミドは疾病で亢進した遺伝子転写活性のみを抑制するため、エピジェネティックな制御が可能となる。さらにこれまでアルキル化剤であるクロラムブシル

(Chlorambucil: ChB)、ヒストンアセチル化酵素ならびにヒストン脱アセチル化酵素を制御する化合物との PI ポリアミドコンジュゲートが報告されている[34]。これらのうち、アルキル化剤は DNA および細胞内タンパクに結合し、陽性電荷中間体を生成することで核酸の陰性部分をアルキル化し、DNA2 本鎖間の架橋構造を形成し DNA 複製および RNA への転写を阻害し、アポトーシスを誘導する抗がん剤である。がん治療に広く適用されているが、前立腺がんには一般的に用いられてはいない。これらの

化合物の多くは DNA 配列と非特異的に相互作用することから、深刻な副作用を引き起こす。このアルキル化剤と特定の DNA 配列を認識するPIポリアミドを結合させることで、腫瘍特異的な変異配列だけを変性させ、腫瘍細胞のみを特異的に殺傷できる副作用の少ない薬剤の開発が可能となると考えられる。

我々は OCT1 が AR 応答遺伝子 ACSL3 の発現を誘導し、この ACSL3 がアンドロゲン合成を促進させ CRPC の増殖に重要な役割を担っていることを明らかにしている [35]。さらにこれを特異的に抑制する化合物 PI ポリアミド(OCT1-PIP)を開発し、有意な前立腺がん細胞増殖抑制効果を報告している[35]。

本研究は OCT1-PIP の腫瘍増殖抑制効果をより高めるために DNA アルキル化剤クロラムブシル(ChB)を修飾した化合物(OCT1-PIP-ChB)を開発し、複数のがん細胞株への影響を分子生物学的に解析した。

【目的】

本研究では従来の OCT1-PIP にアルキル化剤を複合させることにより(OCT1-PIP-ChB)、強い腫瘍抑制効果が期待される新規治療薬としての可能性を検討する。

OCT1-PIP による抗腫瘍効果の解析は、これまで主に AR 陽性前立腺がん細胞 LNCaP 細胞において行われてきた。本研究ではこの新しい OCT1-PIP-ChB を従来の評価手法に、CRPC のモデル細胞として 22Rv1 細胞や他のがん種細胞株も加えて総合的に検討を行った。

【方法】

I 細胞と細胞培地、材料

細胞として AR 陽性ホルモン感受性前立腺がん細胞株 LNCaP、AR 陽性去勢抵抗性前立腺がん細胞株 22Rv1、AR 陰性去勢抵抗性前立腺がん細胞株 PC3、膀胱がん細胞株 BxPC3、大腸がん細胞株 HCT116、正常前立腺上皮細胞 RWPE、乳腺上皮細胞 MCF-10A を American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)から購入した。細胞培養は全て 37°C、5%、CO₂条件下で行い、LNCaP 細胞、22Rv1 細胞、PC3 細胞、BxPC3細胞、RWPE 細胞は、10 %ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS, JRH Bioscience)、10,000units/mL ペニシリン G、10,000ug/mL ストレプトマイシン、29.2mg/mL L-グルタミンを含む 0.85% 塩化ナトリウム水溶液(Penicillin-Streptomycin-L-Glutamine Solution (×100);PSG、富士フイルム和光純薬(株)) を添加した RPMI 1640 培地(ナカライテスク、京都、日本)にて、HCT116 細胞は 10 %FBS を添加した McCoy's 5A 培地(Gibco, Carlsbad, CA, USA)にて、MCF-10A 細胞は L10 %ウシ胎児血清(fetal bovine serum; FBS, JRH Bioscience)、10,000units/mL ペニシリン G、10,000ug/mL ストレプトマイシン、29.2mg/mL L-グルタミンを含む 0.85% 塩化ナトリウム水溶液(Penicillin-Streptomycin-L-Glutamine Solution (×100);PSG、富士フイルム和光純薬(株)) を添加した DMEM 培地(ナカライテスク、京都、日本)にて行った。

II PI ポリアミドの合成

OCT1 の結合配列を認識する PI ポリアミド(OCT1-PIP)にアルキル化剤クロラムブシル(ChB)を結合した分子(OCT1-PIP-ChB)を設計し合成した。

合成はペプチド合成装置 PSSM-8(島津、京都、日本)を用いて、Fluorenyl-Methoxy-Carbonyl(Fmoc)合成法により固相合成し、High Performance Liquid Chromatography(HPLC)によって精製して使用した。純度については Shimadzu LCsolution (島津)でクロマトグラムを分析し、ポリアミドの部分に単一の大きなピークがあることを確認した。さらに Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)にて、PI ポリアミドが標的とする配列はマウスには認められず、ヒト特異的であることを確認した。

III 5-[2,4-Bis(sodiooxysulfonyl)phenyl]-3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazole-3-ium (WST8) assay

WST8 assay にてがん細胞の生存、増殖能に与える影響を解析した。対数増殖期にある LNCaP 細胞、22Rv1 細胞、PC3 細胞、BxPC3細胞、HCT116 細胞、MCF10A 細胞、RWPE 細胞を 8000 細胞/ウェルとなるよう計数する。96 穴マイクロプレートの各ウェルに以下の通りの薬剤を指定された濃度になるよう添加後 100 μ l ずつ播種し、CO₂ インキュベーター内で 48 時間培養した。

LNCaP 細胞、22Rv1 細胞、PC3 細胞、BxPC3細胞、HCT116 細胞、MCF10A、RWPE 細胞に対し、0.1, 1, 5, 10, 20 μ M の OCT1-PIP-ChB、LNCaP, 22Rv1 細胞には 10, 15, 20, 30, 60 μ M、それ以外の細胞には 10, 20, 40, 80, 160 μ M の OCT1-PIP、20, 100, 200, 1000, 2000 μ M の ChB を投与し、24 時間後に DHT(100 nM)を投与した。

Cell Count Reagent SF(ナカライテスク、京都、日本)を各ウェルに 10 μ l ずつ添加し、37 $^{\circ}$ C CO₂ インキュベーター内で 1 時間色反応させ、Wallac 1420 Arvo Mx Multilabel Counter (PerkinElmer)で 450 nm の吸光度を測定し生細胞数を定量化した。さらに 50%の増殖阻害効果を発揮するための薬剤濃度 inhibitory concentration 50(IC50)を計算し細胞間で比較した。各条件は 4 ウェルずつ行い、少なくとも 3 回の実験を施行した。

IV Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

22Rv1 に OCT1-PIP-ChB、OCT1-PIP、ChB をそれぞれ上記で算出した IC50 濃度になるよう投与し、24 時間培養後、RNeasy® mini kit 250(Qiagen)を用いて細胞よりトータル RNA を抽出し、iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて cDNA 合成を行った。それらの cDNA を用いて Power SYBR® Green Master Mix (ライフテクノロジージャパン、東京、日本) により

StepOne™リアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems®)を用いて定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) を行い、ACSL3、OCT1、Nucleic acid binding protein 1 (NABP1)、Mitotic Arrest Deficient 2 Like 2 (MAD2L2)の発現レベルを分析した。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の発現量に対する比として、各遺伝子の発現量を $\Delta\Delta Ct$ 法により計算した。

$\Delta\Delta Ct$ 法は qRT-PCR による相対定量法であり、目的遺伝子と内在性コントロール遺伝子の Ct 値(Threshold Cycle)を求め、目的遺伝子と内在性コントロール遺伝子の ΔCt 値(Ct 値の差)をもとに、未知サンプル間の $\Delta\Delta Ct$ 値(ΔCt 値の差)からサンプル間の目的遺伝子の発現量の比較定量を行う[36]。使用したプライマー配列(表2)。

V ウェスタンブロット解析

細胞蛋白の回収は whole cell lysates を RIPA buffer (50mol/L Tris-HCl Buffer pH7.6 150mmol/L NaCl 1%Nonidet P40 Substitute 0.5% Sodium Deoxycholate 0.1% SDS)にて溶解して行い、蛋白濃度測定は Pierce™ BCA Protein Assay Kit(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いて実施した。それぞれの蛋白を NuPAGE Novex 10% Bis-Tris Protein Gels, 1.5mm, 15wel (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)に入れ電気泳動し、メンブレンは

Immobilon-Ptransfer Membrane (Milipore, Bilerica, MA, USA)を使用し転写させた。メンブレンを一次抗体にて 24 時間インキュベートした後、二次抗体に 1 時間反応させ、発色試薬は Chemi-Lumi One Super(ナカライテスク、京都、日本)を用いた。

今回使用した抗体は以下の通りである。

Rabbit polyclonal Anti-OCT1 antibody (abcam, ab15112)

Rabbit polyclonal anti-AR-antibody (Santa Cruz, H-280)

Mouse monoclonal anti- β -actin antibody (Sigma, St Louis, MO, USA)

Anti-rabbit IgG antibody (Sigma, St Louis, MO, USA)

Anti-mouse IgG antibody (Sigma, St Louis, MO, USA)

VI マイクロアレイ解析

22Rv1 細胞に IC₅₀ 濃度の OCT1-PIP-ChB、コントロールとして同用量の DMSO を投与し、24 時間後 RNA を抽出しそれぞれ 50 μ l の RNase-free 水に溶解させ、NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc. , Rockland, DE, USA)を用いて濃度を測定後、マクロジェンジャパン(京都、日本)に依頼し、Agilent Human 8x60K v3 (アジレント テクノロジー株式会社、東京、日本)を用いてマイクロアレイを行った。

DMSO と比較して 1.5 倍以上の発現変動のある遺伝子群を抽出し metascape

(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)[37]によるエンリッチメント解析を行った。

VII Xenograft モデルを用いた腫瘍細胞増殖抑制効果の検討 (動物実験番号 10001481)

3×10^6 個の 22RV1 細胞を、6 週齢の雄ヌードマウス($n = 18$)の腋窩に皮下注射した。腫瘍サイズが 100 mm^3 に達したときに、OCT1-PIP-ChB またはコントロールとして DMSO を 0.003 mg/g (体重)、5 日間を 2クール、計 10 日間にわたって腹腔内投与した。腫瘍の大きさ、体重を投与後 4 週間後まで毎週測定した。腫瘍体積($V \text{ mm}^3$) は $V = 0.5 \times \text{最大径} \times \text{中央径} \times \text{最小径}$ で算出した。その後、動物を解剖して腫瘍組織を回収し、一部を 10 %ホルマリンにより 48 時間固定した。残りは凍結保存した。ホルマリン固定した組織をパラフィン包埋した後、切片を作成し、HE 染色および ACSL3、Ki67 および Cleaved caspase 3 抗体を用いた免疫組織染色を行った。

VIII 免疫組織化学法

免疫組織化学染色はアビジン・ビオチンシステム(ABC)法にて実施した。 $5 \mu\text{m}$ の組織切片を脱パラフィン化し、マイクロウェーブ法を用いた加熱による抗原賦活処理を行った。0.5% 過酸化水素メタノール溶液にて内因性ペルオキシターゼのブロッキングを行い、60 分間室温にて 5% Goat serum に浸した。1:100 希釈で anti-ACSL3

抗体 (SIGMA) および 抗ヒト Ki-67 抗原 MIB-1・マウスモノクローナル抗体 (Agilent Technologies, CA, USA) を、1:1000 希釈で Cleaved caspase 3 antibody (Cell Signaling Technology, MA, USA) を 24 時間処理したのち、二次抗体はビオチン標識二次抗体 (Vector, CA, USA) を 1:1000 希釈 2 時間室温下で反応させ、3,3'-diaminobenzidine (DAB) にて可視化した。

40 倍視野下で免疫染色陽性細胞を評価し、全細胞中の陽性細胞の割合を計測し、さらにそれを Score 化して分類 (score 0: なし、score 1: 1/100 以下、score 2, 1/100 から 1/10、score 3: 1/10 から 1/3、score 4: 1/3 から 2/3、score 5: 2/3 以上) し、染色強度を score 0: なし、score 1: 弱、score 2: 中、score 3: 強と分類し、合計を immunoreactivity (IR) score とし 0-8 段階で評価した [38]。

IX 統計学的解析

実験結果は Student's t 検定、One-way ANOVA を用いて評価した。を用いて評価した。統計ソフトは Graphpad prism for mac 80 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) および JMP 11 software (SAS Institute Japan, Inc., Tokyo, Japan) を使用し、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

【結果】

I PI ポリアミドの標的配列ならびに化学構造式

OCT1-PIP-ChB の DNA 認識様式と構造式を図に示す。ACSL3 転写開始点上流に位置するエンハンサー領域内に存在する OCT1 結合領域において OCT1 は AR の転写活性を制御し、ACSL3 の発現調節を行っている。この OCT1 結合領域に結合するよう設計した(図 4)。

II OCT1-PIP-ChB による細胞増殖抑制効果の検討(WST8 assay)

LNCaP 細胞、22Rv1 細胞、PC3 細胞、BxPC3細胞、HCT116 細胞、MCF10A 細胞、RWPE 細胞の各細胞株に対し、OCT1-PIP-ChB による細胞増殖抑制効果を評価するために、WST8 assay による細胞生存率の定量を行った。各薬剤の IC50 濃度を示す(表 1)。OCT1-PIP-ChB は前立腺由来細胞株(LNCaP, 22Rv1, PC3, RWPE)に対して他の薬剤と比べ高い感受性を呈していた。この中で 22Rv1 が最も IC50 が低値であった (図 5)。

III OCT1-PIP-ChB の ACSL3 発現量に対する効果

先述の細胞培地にて培養した AR 陽性ホルモン感受性前立腺がん細胞株 LNCaP、AR 陽性去勢抵抗性前立腺がん細胞株 22Rv1、AR 陰性去勢抵抗性前立腺がん細胞株 PC3、膵がん細胞株 BxPC3、大腸がん細胞株 HCT116、正常前立

腺上皮細胞 RWPE、乳腺上皮細胞 MCF-10A の各細胞株における蛋白レベルでの AR、OCT1 発現を Westernblot analysis により確認したところ、LNCaP 細胞、22Rv1 細胞において AR と OCT1 の発現を認めた(図 6A)。

22Rv1 細胞に IC50 濃度(1mM)の OCT1-PIP-ChB、OCT1-PIP、ChB または DMSO を加え、48 時間後に細胞を回収した。抽出した RNA より逆転写合成した cDNA を用いて qRT-PCR を行い ACSL3 の mRNA 発現量を比較検討した。One-way ANOVA 法ならびに Dunnett's multiple comparisons test で DMSO を対照として検討したところ OCT1-PIP-ChB で *ACSL3* の発現が有意に抑制されていた($p < 0.01$ vs. DMSO, 図 6B)。

IV 前立腺がん細胞に対する OCT1-PIP-ChB の分子生物学的検討

OCT1-PIP-ChB の前立腺がん細胞に与える分子生物学的検討として IC50 濃度の OCT1-PIP-ChB で 24 時間投与した 22Rv1 細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った。385 遺伝子に有意な変動(1.5 倍以上の発現変化)認め、抑制系に働いているのは 189 遺伝子、促進系に働いているのは 186 遺伝子認めた。これら OCT1-PIP-ChB 投与群と対照群での発現量が異なる遺伝子の z スコアを用いた階層的クラスタを図 7A に示す。この中で抑制系に働く遺伝子のみ Metascape 解析にかけたところ、DNA 二本鎖切断修復機構に関与する遺伝子群が最も多く抑制されていたこと

がわかった(図 7B)。これら遺伝子群のなかでマイクロアレイ上発現変動が大きかった *NABP1* ならびに *MAD2L2* において、対照群である DMSO で処理した検体と比較し mRNA レベルでの発現量が減少した(図 7C)。

V Xenograft モデルにおける OCT1-PIP-ChB の腫瘍細胞増殖抑制効果の検討

OCT1-PIP-ChB を投与したマウスでは、DMSO に比較し有意に腫瘍増殖が抑制されていた(図 8A)。またこの期間に著しい体重減少など、薬剤投与による明らかな有害事象を認めたマウスはいなかった(図 8B)。

腫瘍組織より病理切片を作成し、HE 染色(図 8C)と Ki-67、Cleaved caspase 3 の抗体を用いて免疫組織染色を行った。OCT1-PIP-ChB を投与したマウスの 22Rv1 異種移植片において、腫瘍の内部は線維化している領域が多くを占め(図 8C)、Cleaved caspase 3 の発現は増加し、ACSL3、Ki-67 の発現は減少する傾向にあった(図 8DE)。この結果から、OCT1-PIP-ChB 投与により腫瘍組織においてアポトーシスが誘導され、腫瘍増殖が抑制されている可能性が示唆された。

【考察】

本研究において、OCT1-PIP に ChB を付加することで、AR 陽性前立腺がん細胞に対し特異的に、かつ低濃度でのがん細胞増殖抑制効果が認められた。

進行性前立腺がんの治療の最大の問題点は CRPC に対して、前述した抗がん化学療法や新規前立腺がん治療薬による治療を行ったとしても、一定の生存期間延長効果は見込めるものの、最終的には全ての薬物治療に対して抵抗性を獲得してしまうことである[39]。前立腺がんの増殖・進展は主にアンドロゲン並びにアンドロゲン受容体(AR)、それに続く AR シグナル経路により制御されている[4]。今回我々は AR 転写協調因子である OCT1、さらには OCT1 の標的遺伝子うち ACSL3 に着目した。

以前我々は前立腺がん治療を目的とし、ACSL3 の上流領域にある OCT1 結合領域を標的とした PI ポリアミド、OCT1-PIP を開発し、OCT1 結合領域を標的としたポリアミドがゲノム全体の OCT1 結合を阻害し、ACSL3 の誘導を含むアンドロゲンシグナルを阻害していることを明らかにしている[31, 35]。過去の検討では、AR/OCT1 標的遺伝子群や OCT1-PIP 処理によって誘発される包括的な転写の変化を調べるために、マイクロアレイと ChIP-seq によって包括的な遺伝子発現を解析している[35]。その結果 OCT1-PIP は、OCT1 結合領域を特異的に認識することで、グローバルな OCT1 を介したアンドロゲンシグナルを抑制できることが明らかになっている。また ACSL3 遺伝子上流にある OCT1 結合配列(TTTGCAGTATA)をマウスの遺伝子で BLAST

検索を行ったところ、マウス *acs13* 上流に同配列は認められなかった。これより、*ACSL3* 遺伝子上流にある OCT1 結合配列(TTTGCAGTATA)はヒト特異的な配列であることが示唆された。さらに、OCT1 を阻害することで、CRPC 細胞株 (22Rv1 細胞) の異種移植における去勢抵抗性腫瘍の成長が抑制されることも明らかになった [35]。一方で、AR/OCT1 制御遺伝子の中で、*ACSL3* が前立腺がん細胞で重要な標的遺伝子であることも同様に明らかになっており[31]、このことから *ACSL3* を標的とするこのポリアミド配列は前立腺がんの増殖、進展に特に関与している可能性が高い。本研究では OCT1-PIP に殺細胞効果がある DNA アルキル化剤 ChB を組み合わせた OCT1-PIP-ChB を開発した。ChB を含む DNA アルキル化作用のある PI ポリアミドが急性骨髄性白血病のモデルマウスにおいて顕著な抗腫瘍効果を示すことが報告されているが[34]、CRPC に対する新規治療薬としてこの OCT1-PIP-ChB が有効かどうかについて、CRPC モデル細胞 22Rv1 細胞株や他のがん種細胞株も加えて総合的に検討を行った。

まずは WST8 assay にてがん細胞の生存、増殖能に与える影響を解析した。細胞株間の比較では、OCT1-PIP-ChB は同濃度の OCT1-PIP あるいは ChB 単剤と比べて LNCaP および 22Rv1 に対し高い増殖抑制効果を認め、これは PIP ならびに ChB による相乗効果を示唆する結果であった。OCT1-PIP では高濃度でないと抗腫瘍効果を認めなかったため、その分細胞毒性を来たし全ての細胞株において腫瘍増

殖抑制効果を示したものと考えられる。OCT1-PIP-ChB は低濃度で抗腫瘍効果を認めることから、細胞毒性を来す事なく作用したと考察された。

文献的には今回我々が用いた細胞株の中で LNCaP、22Rv1 以外の細胞株は AR 陰性であり、さらに *OCT1* ならびに *ACLS3* が発現しているとの報告はないが[40]、病理組織を扱った公共データベースでは大腸がんならびに膵がん組織にも OCT1 はある程度発現が認められた

(<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000143190-POU2F1/pathology>)[41]。

本研究のウエスタンブロットでは LNCaP、22Rv1、PC3、BxPC3、HCT116、RWPE、MCF-10A のうち、LNCaP、22Rv1 細胞株でのみ AR、OCT1 の発現を認め、PC3、MCF-10A に OCT1 発現を認めた。WST8 で得られた 22Rv1 に対する OCT1-PIP-ChB の IC50 濃度(1.0 mM)と同濃度で各薬剤(ChB、PIP、OCT1-PIP-ChB)をそれぞれ 22Rv1 に投与し、Control とともに AR/OCT1 の標的遺伝子である ACSL3 の発現を比較したところ、OCT1-PIP-ChB のみ ACSL3 の発現が Control と比較し有意に抑制されていることを確認した。のことから OCT1-PIP-ChB により LNCaP、22Rv1 細胞株でみられる AR と OCT1 の協調作用が抑制され、さらに ChB により細胞傷害が発生し、結果的に腫瘍抑制に至ったと考えられた。本来ならば OCT1-PIP においても ACSL3 発現が抑えられるはずであるが、OCT1-PIP-ChB の IC50 と同じ濃度で投与しており、低濃度のため十分な効果を発揮することは

なかったと考えられる。また、去勢抵抗性前立腺がんにおける細胞抑制効果を検討するために DHT 刺激を用いなかったことも影響していると思われる。

OCT1-PIP-ChB の 22RV1 細胞への作用メカニズムを検証するためにマイクロアレイ解析を行ったところ、DNA 二重鎖修復機能に関与する遺伝子群が主に抑制されていた。これに関連して、過去の報告において、OCT1 は DNA 二本鎖切断により活性化されることが報告されている[42]。マイクロアレイで変動が確認された DNA 二重鎖修復機能に関与する遺伝子群のうち *NABP1*、*MAD2L2* の 2 遺伝子において発現抑制を qRT-PCR で確認した。この中で *NABP1* は DNA 複製フォークの維持やゲノムの安定性、酸化的 DNA 損傷や二本鎖 DNA 切断の修復に関与していることが明らかになっている[43, 44]。また *MAD2L2* は哺乳類のテロメアにおける DNA 修復活性を制御する新規因子として報告されている[45]。これらのことから ChB による DNA 損傷に加え、両遺伝子の抑制による DNA 修復障害が、細胞死に働いている可能性が考えられた。一方で OCT1 は *BRCA1* と協調して DNA 修復に働く癌抑制遺伝子 Growth Arrest And DNA Damage(GADD)45 の発現を誘導させることが知られている[46]。

さらに OCT1 は Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)ファミリーと相互作用することにより標的遺伝子配列への結合が安定化されることが知られている[47]。PARP

は DNA 一本鎖修復に働く酵素であり、以上のことから OCT1 は DNA の損傷修復機構に広く関与している可能性がある。

22Rv1 細胞には通常の AR とリガンドであるアンドロゲンの非存在下でも常に活性化状態にある変異型 AR が存在し、アンドロゲン非存在下でも高い増殖能、浸潤能を示す。本研究で OCT1-PIP-ChB は 22Rv1 細胞において *ACSL3* の発現を抑制し、標的遺伝子への特異性が示唆された。加えて *in vivo* では OCT1-PIP-ChB は対照と比較し、ヌードマウスの皮下に移植した 22Rv1 細胞由来の腫瘍の増殖を有意に抑制し、細胞のアポトーシスを誘導することを確認した。

PI ポリアミドは Pyrrole および Imidazole の組み合わせを認識し、配列特異的に DNA 配列に共有結合することでその転写因子の作用を抑制させる。また生体内で安定性が高く、siRNA のように特殊なデリバリー試薬を要さないという特徴を有することが知られている[33]。もう一つの重要な利点は、マウスおよびラットに投与した際に、PI ポリアミドの静脈内、皮下、腹腔内注射は重大な健康障害を起こさないということである。Raskatov らは、PI ポリアミドを投与した前立腺がん異種移植マウスでは、わずかな体重減少(10%未満)が見られたと報告している[48-50]。Yang らは、PI ポリアミドを投与した LNCaP マウスでは有意な体重減少が見られたが、PI ポリアミドを投与した非腫瘍マウスでは毒性の兆候は見られなかったと報告している[51]。本研究では、PI ポリアミドを投与したマウスに有意な体重減少などの毒性徴候は見られなかった

が、今後臨床応用にはアルキル化 PI ポリアミドの毒性効果についてのさらなる調査が必要である。

本研究により、OCT1-PIP-ChB の遺伝子治療としての有用性が示唆された。また、OCT1-PIP-ChB は CRPC であれば初期でも後期でもどのフェーズであっても有効であると考えられる。細胞株を用いた *in vitro* の検討で有意な抗腫瘍効果が認められたため、今後は患者由来がん細胞モデルなどより臨床に近い検体を用いて前臨床試験を行い、同等な効果が認められるか、さらなる研究が必要であると考ええる。

【まとめ】

本研究では、前立腺がん抑制効果が認められている OCT1-PIP に殺細胞効果を付加するために、DNA アルキル化剤であるクロラムブシル (ChB) を修飾した改良 PI ポリアミド (OCT1-PIP-ChB) を開発した。前立腺がん細胞のみならず、正常前立腺上皮細胞や大腸がん細胞ならびに膵がん細胞など他臓器由来のがん細胞株を用いて増殖に対する効果を解析し、腫瘍特異性効果を検証した。マイクロアレイならびに qRT-PCR で、OCT1-PIP-ChB が二本鎖 DNA 修復経路に影響を与えていることを同定した。さらに *in vivo* における去勢抵抗性前立腺がんモデル細胞の増殖抑制効果を認め、用いたマウスでは体重減少や有害事象は認められなかった。本剤は PI ポリアミドに ChB を修飾することで、AR 陽性前立腺がん細胞に対して著しい増殖抑制効果を発揮する可能性を有し、新規治療剤としての可能性が示唆された。

【謝辞】

本研究の遂行に当たり、終始親身な御指導、ご鞭撻を賜りました日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野主任教授 高橋 悟博士に謹んで感謝の意を表します。また、実験を行うにあたり、親身な御指導、貴重な御助言を賜りました東京都健康長寿医療センター研究所研究部長、日本大学医学部泌尿器科客員教授兼務 井上 聡博士、東京都健康長寿医療センター研究所専門副部長 高山賢一博士に心から感謝いたします。実験全般、研究内容につきご指導いただいた日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野准教授 大日方大亮博士、同分野 山本慎一郎博士、日本大学医学部内科学系総合内科総合診療医学分野（現日本大学歯学部解剖学第I講座）藤原恭子博士に心から御礼申し上げます。本研究をまとめるにあたり、貴重な御助言を賜りました日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野の皆様へ深く感謝申し上げます。本研究のために命を失った数多くのマウスたちに哀悼の意を捧げます。

最後に、物心両面にわたり援助をいただいた両親に感謝いたします。

【図・図説】

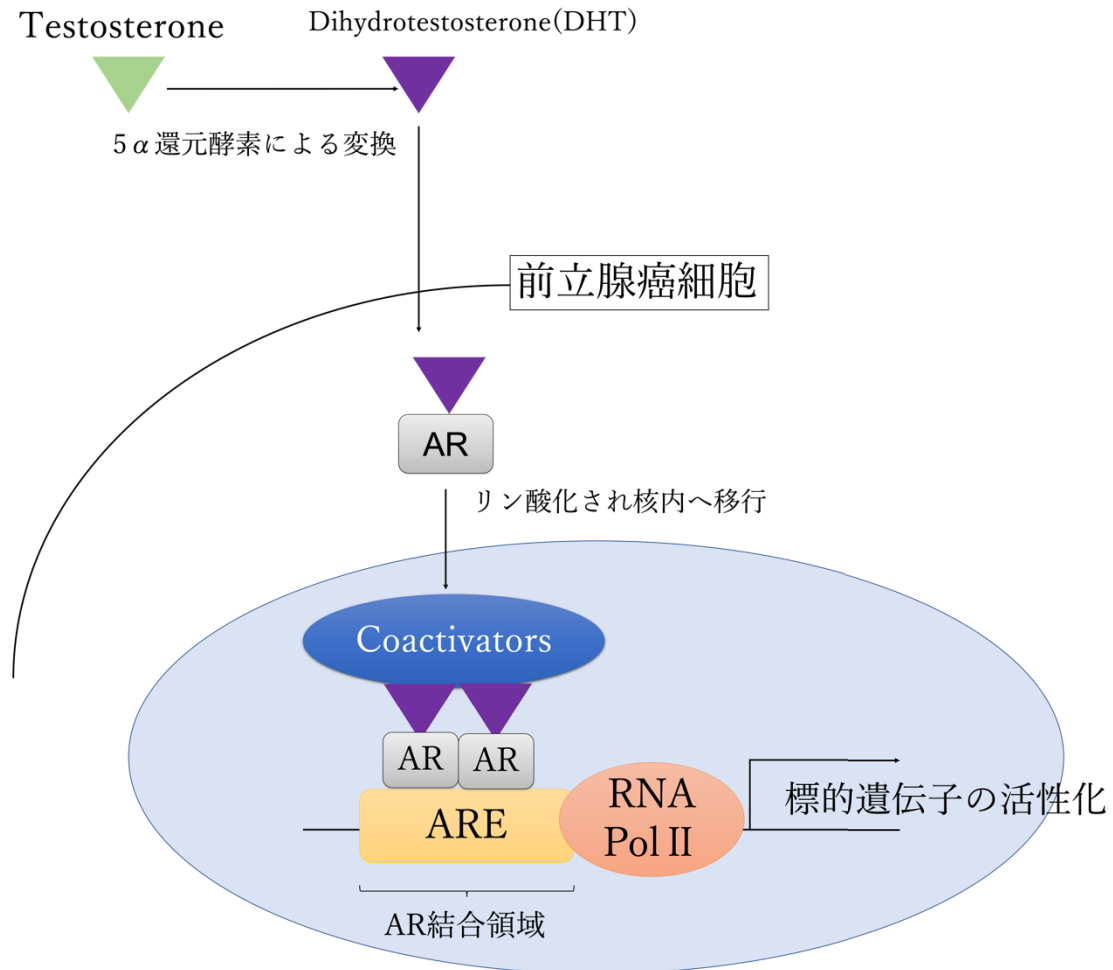


図1 前立腺がん細胞内でのアンドロゲンシグナル経路

5α還元酵素によりテストステロンは活性の強いDHTに変換される。ARはリガンド結合領域でDHTと、またN末端領域で補助因子と結合すると活性化され核内に移動する。DNA上のAR結合領域(AR response element: ARE)に結合し、標的遺伝子の転写を誘導する。その結果、細胞増殖に有利な遺伝子が発現し、前立腺がんの発生や進行を促進する。RNA polymerase II: RNA Pol II

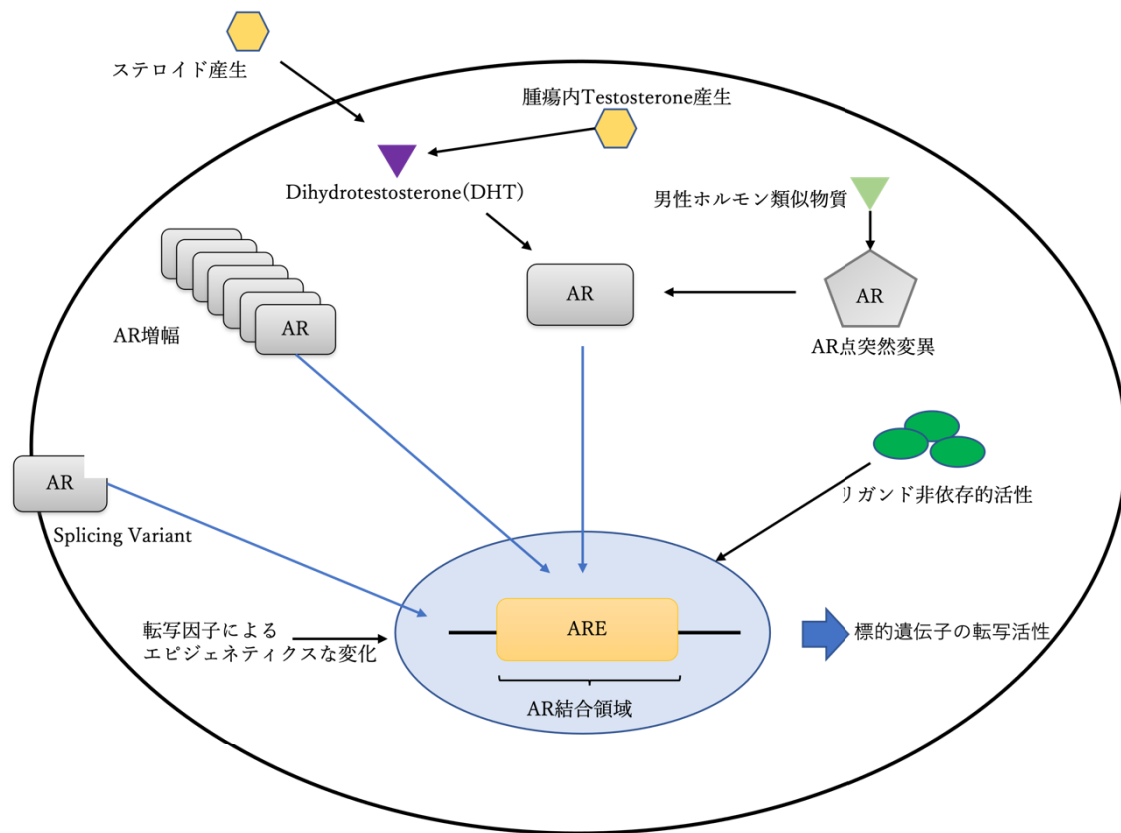


図 2 前立腺がんの去勢抵抗性獲得のメカニズム

去勢抵抗性の原因には、AR の遺伝子発現領域の増幅による AR 産生の上昇、AR の点突然変異による DHT や男性ホルモン以外の物質がリガンドとして結合すること、splicing variant により活性化がリガンド不要となること、腫瘍内でのステロイド合成、転写因子の変異によるエピジェネティックな変化、ならびに AR を介さないシグナル活性化などがあげられる。

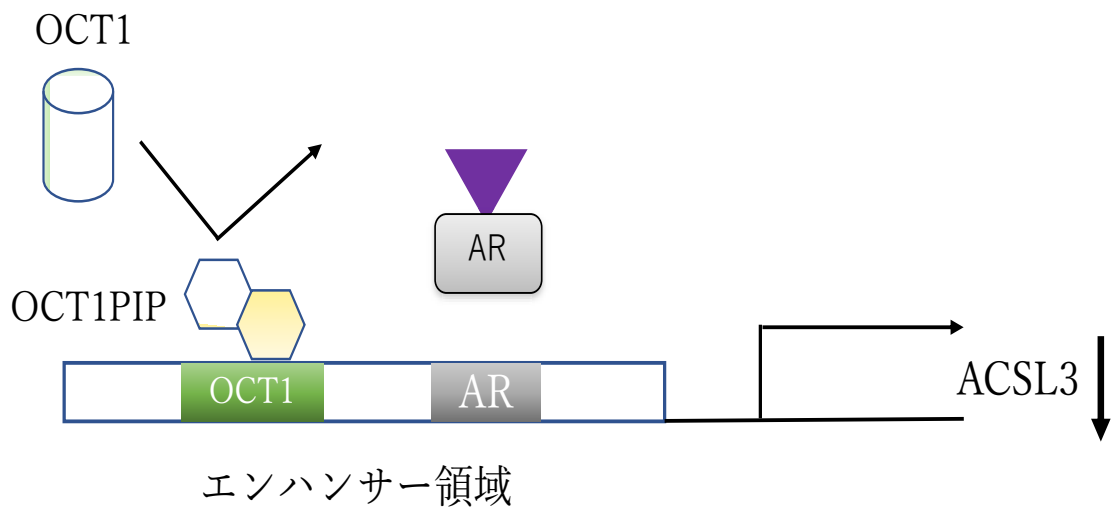


図 3 OCT1 pyrrole-imidazole polyamide (OCT1-PIP)の作用機序

PIP は、DNA 二重らせんのマイナーグループに配列特異的に結合する性質を持つ。OCT1 はゲノム上の AR 結合部位近傍に結合し、標的遺伝子 ACSL3 の転写を誘導する。アンドロゲン応答遺伝子 ACSL3 エンハンサー領域内に存在する OCT1 結合配列特異的に結合する PI ポリアミド(OCT1-PIP)により、エンハンサー領域の活性が抑制され、結果的に ACSL3 の発現は低下する。

(A) OCT1-PIP-ChB target sequence

ACSL3 enhancer region

5' -TAAGCAGAACTTTGTTCT-3'



3' -ATTCGTCTTGAACAAGA-5'

○: *N*-methylpyrrole (Py), ●: *N*-methylimidazole (Im),

β: Beta-alanine, Dp: dimethylpropanediamine, ChB: Chlorambucil

(B)

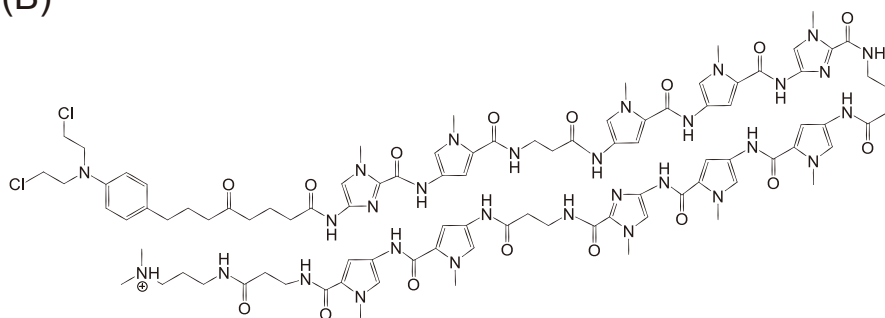


図 4 OCT1-PIP-ChB の特性

(A) ACSL3 のエンハンサー領域に存在する OCT1 結合配列およびそれを標的とする OCT1-PIP-ChB の結合様式。(B)OCT1-PIP-ChB の構造。PIP は固相法を用

いて合成し、高速液体クロマトグラフィー(0.1% AcOH/CH₃CN、0 ~ 66 パーセン

トの直線勾配、0 ~ 20 分、340 nm、CHEMCOBOND5-ODS-H カラムを介して)

によって精製した。また、クロラムブシルを保護するため、精製する際に回収用フラスコ

をアルミホイルで包んで遮光をした。

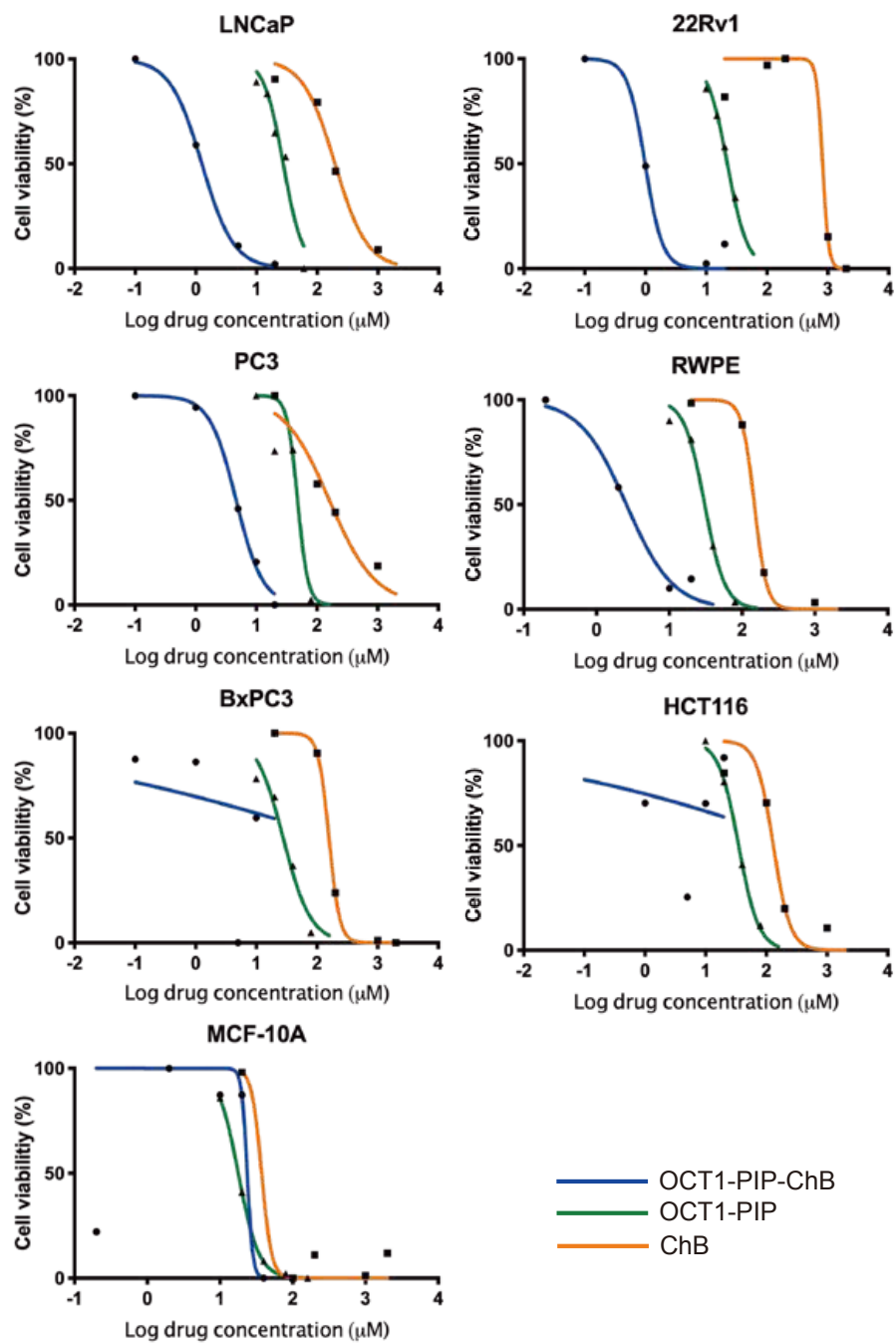


図 5 各薬剤で処理したそれぞれの細胞の IC₅₀ 曲線

薬剤投与 48 時間後の細胞生存率を処理濃度の対数に対してプロットした。データポイントは、3 回測定した平均値である。

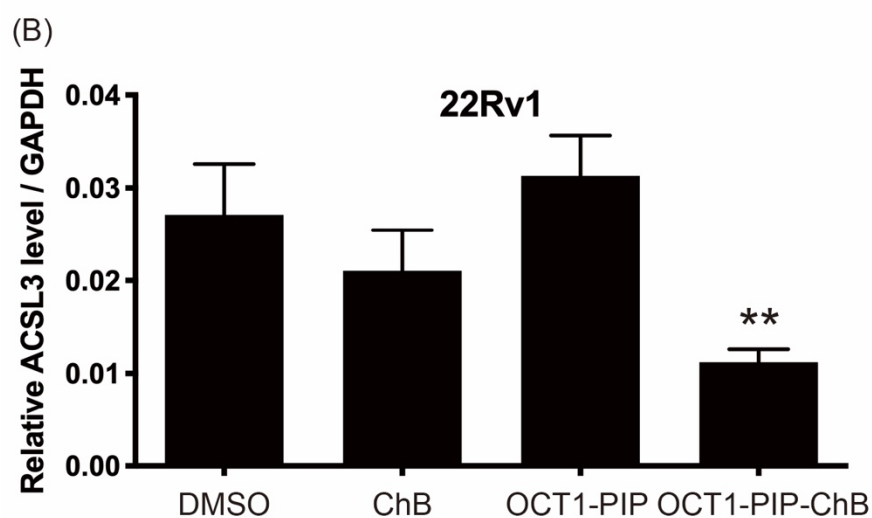
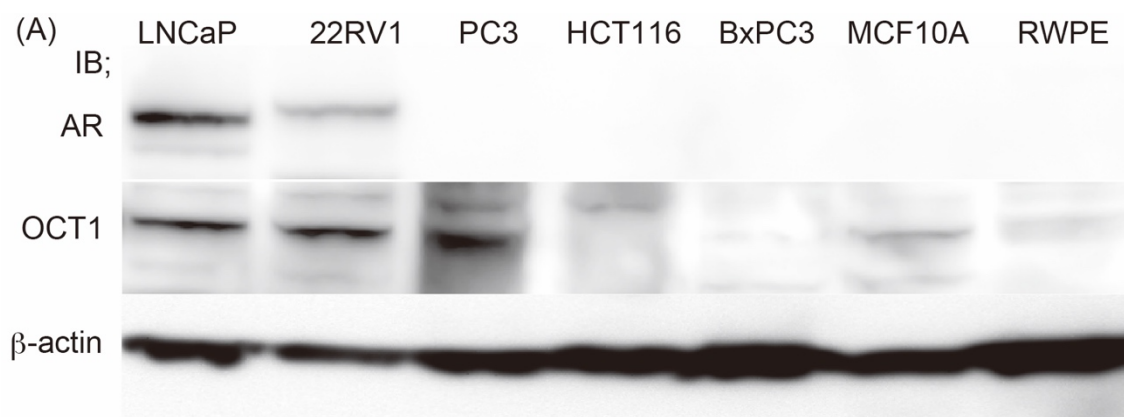


図 6 OCT1 ならびに OCT1 標的遺伝子 ACSL3 の発現評価

(A)各細胞における AR ならびに OCT1 の発現状況。各細胞は標準的な培養液で培養後、タンパクを回収してウエスタンブロットを行った。(B) 22Rv1 における各薬剤の ACSL3 発現への影響。OCT1-PIP-ChB の IC50 濃度である 1 mM でそれぞれの薬剤を 22Rv1 に投与し 48 時間後に RNA を回収し、RT-qPCR を行った。**, $p < 0.01$ vs. DMSO

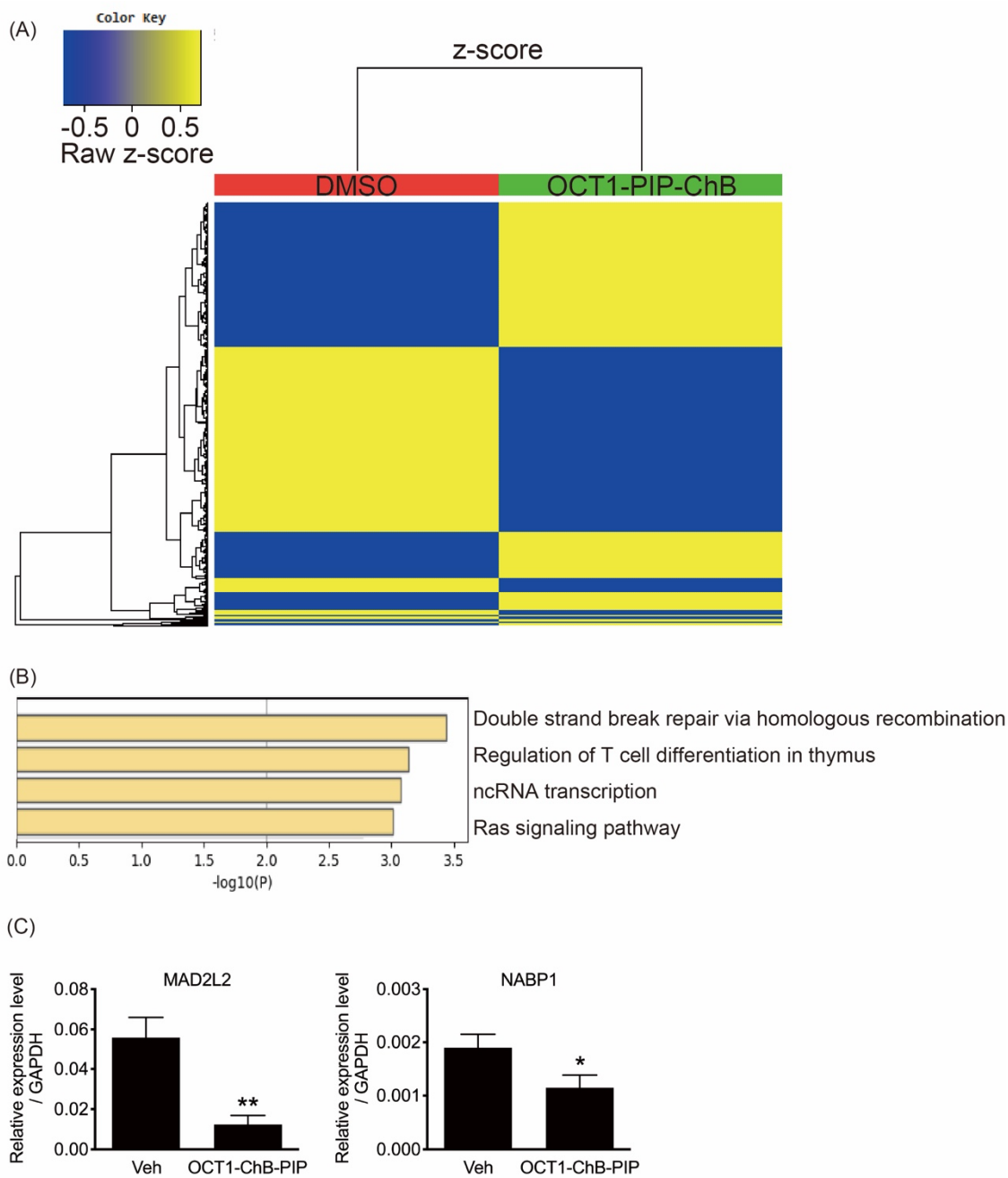


図 7 OCT1-ChB-PIP の 22Rv1 に対する分子生物学的な影響

(A) OCT1-PIP-ChB 投与群と対照群での発現量が異なる遺伝子の z スコアを用い

た階層的クラスタ。(B) OCT1-PIP-ChB で発現が有意(1.5 倍以上)に抑制される遺

伝子を用いて Metascape によるパスウェイ解析を行った。(C) Double strand break

repair に関連する遺伝子でマイクロアレイにおいて有意に抑制された遺伝子のうち発現変動が大きかった上位 2 遺伝子を qRT-PCR で定量した。

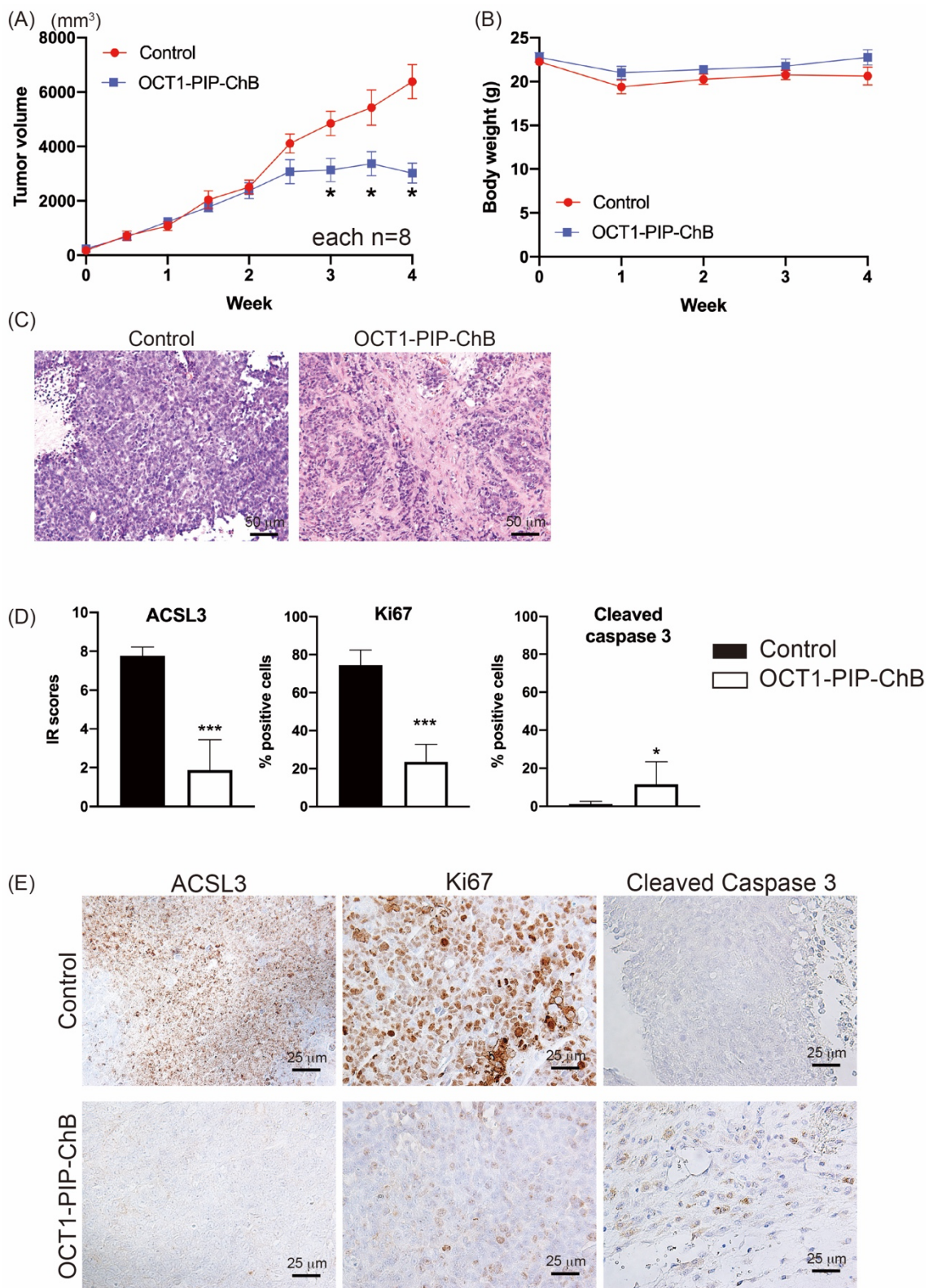


図 8 OCT1-PIP-ChB の *in vivo* における効果

(A) 22Rv1 をヌードマウスに皮下接種し、100 mm³を超えた日より投与を開始。

Control は DMSO を用いた。腫瘍体積(Vmm³)は $V = 0.5 \times \text{最大径} \times \text{中央径} \times \text{最小}$

径、平均の標準誤差(n は各8)であらわした。(B) 経過観察期間中の各群における

体重の推移。(C) それぞれ代表的な観察期間が終了した後に摘出した腫瘍の HE

所見を示す。(D) 免疫染色による定量評価。各群ランダム視野の IR score

(ACSL3)、%陽性細胞(Ki67, Cleaved caspase 3)を計測した。(E) それぞれ代表的

な観察期間が終了した後に摘出した腫瘍の各抗体による免疫組織化学所見を示す。

【表】

表 1. 使用細胞の特性

細胞	細胞の特性
LNCaP	AR positive prostate cancer
22Rv1	AR positive castration resistant prostate cancer
PC3	AR negative prostate cancer
BxPC3	Pancreatic cancer
HCT116	Colon cancer
RWPE	Prostatic epithelium
MCF10A	Mammary gland epithelium

表 2. 本研究で用いたプライマー

遺伝子	プライマー
<i>GAPDH</i>	Forward: 5' - GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA -3'
	Reverse: 5' - GTGGTCGTTGAGGGCAATG -3'
<i>ACSL3</i>	Forward: 5' - GCACAGGCGTGTTTTATGTATAATTT-3'
	Reverse: 5' - CAATGGCTGGACCTCCTAGAGT-3'
<i>NABP1</i>	Forward: 5' - GACGCGTGACCAAACCAAA -3'
	Reverse:: 5' - TTTGAAGTTCACCACCCCTTC-3'
<i>MAD2L2</i>	Forward: 5' - GATAAAGAGCACCGCCCAGT-3'
	Reverse:: 5' - CAGCTGCTCCACATGAGACA-3'

表 3. 各細胞における IC50 濃度

Cell line	Incubation time	OCT1-PIP-ChB (IC50)(μ M)	ChB (IC50)(μ M)	OCT1-PIP (IC50)(μ M)
LNCaP	48	1.254	196.3	27.53
22Rv1	48	0.984	821.3	22.21
PC3	48	4.643	160.3	47.88
MCF-10A	48	23.72	37.43	17.85
RWPE	48	2.576	147.7	30.71
BXPC3	48	230.7	158.1	27.73
HCT116	48	506	130.6	34.98

【引用文献】

- [1] L.L. Liu, N. Xie, S. Sun, S. Plymate, E. Mostaghel, X. Dong, Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells, *Oncogene*, 33 (2014) 3140-3150.
- [2] C. Cai, H.H. He, S. Chen, I. Coleman, H. Wang, Z. Fang, S. Chen, P.S. Nelson, X.S. Liu, M. Brown, S.P. Balk, Androgen receptor gene expression in prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor through recruitment of lysine-specific demethylase 1, *Cancer Cell*, 20 (2011) 457-471.
- [3] M. Hori, T. Matsuda, A. Shibata, K. Katanoda, T. Sobue, H. Nishimoto, G. Japan Cancer Surveillance Research, Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2009: a study of 32 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 45 (2015) 884-891.
- [4] C. Helsen, T. Van den Broeck, A. Voet, S. Prekovic, H. Van Poppel, S. Joniau, F. Claessens, Androgen receptor antagonists for prostate cancer therapy, *Endocr. Relat. Cancer*, 21 (2014) T105-118.
- [5] M.J. Tsai, B.W. O'Malley, Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members, *Annu. Rev. Biochem.*, 63 (1994) 451-486.
- [6] K.S. Zaret, J.S. Carroll, Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression, *Genes Dev.*, 25 (2011) 2227-2241.
- [7] L.A. Cirillo, K.S. Zaret, Specific interactions of the wing domains of FOXA1 transcription factor with DNA, *J. Mol. Biol.*, 366 (2007) 720-724.
- [8] I. Cuesta, K.S. Zaret, P. Santisteban, The forkhead factor FoxE1 binds to the thyroperoxidase promoter during thyroid cell differentiation and modifies compacted chromatin structure, *Mol. Cell. Biol.*, 27 (2007) 7302-7314.
- [9] Q. Wang, W. Li, X.S. Liu, J.S. Carroll, O.A. Janne, E.K. Keeton, A.M. Chinnaiyan, K.J. Pienta, M. Brown, A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth, *Mol. Cell*, 27 (2007) 380-392.
- [10] J.A. Locke, E.S. Guns, A.A. Lubik, H.H. Adomat, S.C. Hendy, C.A. Wood, S.L. Ettinger, M.E. Gleave, C.C. Nelson, Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer, *Cancer Res.*, 68 (2008) 6407-6415.
- [11] M. Yamaoka, T. Hara, M. Kusaka, Overcoming persistent dependency on androgen signaling after progression to castration-resistant prostate cancer, *Clin. Cancer Res.*, 16 (2010) 4319-4324.
- [12] R.B. Montgomery, E.A. Mostaghel, R. Vessella, D.L. Hess, T.F. Kalthorn, C.S. Higano, L.D. True, P.S. Nelson, Maintenance of intratumoral androgens in metastatic

prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth, *Cancer Res.*, 68 (2008) 4447-4454.

[13] C. Tran, S. Ouk, N.J. Clegg, Y. Chen, P.A. Watson, V. Arora, J. Wongvipat, P.M. Smith-Jones, D. Yoo, A. Kwon, T. Wasielewska, D. Welsbie, C.D. Chen, C.S. Higano, T.M. Beer, D.T. Hung, H.I. Scher, M.E. Jung, C.L. Sawyers, Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer, *Science*, 324 (2009) 787-790.

[14] D.E. Rathkopf, M.R. Smith, C.J. Ryan, W.R. Berry, N.D. Shore, G. Liu, C.S. Higano, J.J. Alumkal, R. Hauke, R.F. Tutrone, M. Saleh, E. Chow Maneval, S. Thomas, D.S. Ricci, M.K. Yu, C.J. de Boer, A. Trinh, T. Kheoh, R. Bandekar, H.I. Scher, E.S. Antonarakis, Androgen receptor mutations in patients with castration-resistant prostate cancer treated with apalutamide, *Ann. Oncol.*, 28 (2017) 2264-2271.

[15] T. Sugawara, S.J. Baumgart, E. Nevedomskaya, K. Reichert, H. Steuber, P. Lejeune, D. Mumberg, B. Haendler, Darolutamide is a potent androgen receptor antagonist with strong efficacy in prostate cancer models, *Int. J. Cancer*, 145 (2019) 1382-1394.

[16] D. Obinata, K. Takayama, S. Takahashi, S. Inoue, Crosstalk of the Androgen Receptor with Transcriptional Collaborators: Potential Therapeutic Targets for Castration-Resistant Prostate Cancer, *Cancers (Basel)*, 9 (2017).

[17] D. Robinson, E.M. Van Allen, Y.M. Wu, N. Schultz, R.J. Lonigro, J.M. Mosquera, B. Montgomery, M.E. Taplin, C.C. Pritchard, G. Attard, H. Beltran, W. Abida, R.K. Bradley, J. Vinson, X. Cao, P. Vats, L.P. Kunju, M. Hussain, F.Y. Feng, S.A. Tomlins, K.A. Cooney, D.C. Smith, C. Brennan, J. Siddiqui, R. Mehra, Y. Chen, D.E. Rathkopf, M.J. Morris, S.B. Solomon, J.C. Durack, V.E. Reuter, A. Gopalan, J. Gao, M. Loda, R.T. Lis, M. Bowden, S.P. Balk, G. Gaviola, C. Sougnez, M. Gupta, E.Y. Yu, E.A. Mostaghel, H.H. Cheng, H. Mulcahy, L.D. True, S.R. Plymate, H. Dvinge, R. Ferraldeschi, P. Flohr, S. Miranda, Z. Zafeiriou, N. Tunariu, J. Mateo, R. Perez-Lopez, F. Demichelis, B.D. Robinson, A. Sboner, M. Schiffman, D.M. Nanus, S.T. Tagawa, A. Sigaras, K.W. Eng, O. Elemento, A. Sboner, E.I. Heath, H.I. Scher, K.J. Pienta, P. Kantoff, J.S. de Bono, M.A. Rubin, P.S. Nelson, L.A. Garraway, C.L. Sawyers, A.M. Chinnaiyan, Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer, *Cell*, 162 (2015) 454.

[18] H. Beltran, R. Yelensky, G.M. Frampton, K. Park, S.R. Downing, T.Y. MacDonald, M. Jarosz, D. Lipson, S.T. Tagawa, D.M. Nanus, P.J. Stephens, J.M. Mosquera, M.T. Cronin, M.A. Rubin, Targeted next-generation sequencing of advanced

prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity, *Eur. Urol.*, 63 (2013) 920-926.

[19] T. Hara, K. Nakamura, H. Araki, M. Kusaka, M. Yamaoka, Enhanced androgen receptor signaling correlates with the androgen-refractory growth in a newly established MDA PCa 2b-hr human prostate cancer cell subline, *Cancer Res.*, 63 (2003) 5622-5628.

[20] D. Obinata, M.G. Lawrence, K. Takayama, N. Choo, G.P. Risbridger, S. Takahashi, S. Inoue, Recent Discoveries in the Androgen Receptor Pathway in Castration-Resistant Prostate Cancer, *Front. Oncol.*, 10 (2020) 581515.

[21] I.a. Asangani, V.L. Dommeti, X. Wang, R. Malik, M. Cieslik, R. Yang, J. Escara-Wilke, K. Wilder-Romans, S. Dhanireddy, C. Engelke, M.K. Iyer, X. Jing, Y.-M. Wu, X. Cao, Z.S. Qin, S. Wang, F.Y. Feng, A.M. Chinnaiyan, Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer., *Nature*, 510 (2014) 278-282.

[22] J. DeGregori, T. Kowalik, J.R. Nevins, Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes, *Mol. Cell Biol.*, 15 (1995) 4215-4224.

[23] C. Giacinti, A. Giordano, RB and cell cycle progression, *Oncogene*, 25 (2006) 5220-5227.

[24] C. Kaltz-Wittmer, U. Klenk, A. Glaessgen, D.E. Aust, J. Diebold, U. Lohrs, G.B. Baretton, FISH analysis of gene aberrations (MYC, CCND1, ERBB2, RB, and AR) in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy, *Lab. Invest.*, 80 (2000) 1455-1464.

[25] N.N. Nupponen, L. Kakkola, P. Koivisto, T. Visakorpi, Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas, *Am. J. Pathol.*, 153 (1998) 141-148.

[26] J.E. Darnell, Jr., I.M. Kerr, G.R. Stark, Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins, *Science*, 264 (1994) 1415-1421.

[27] N.L. Sharma, C.E. Massie, A. Ramos-Montoya, V. Zecchini, H.E. Scott, A.D. Lamb, S. MacArthur, R. Stark, A.Y. Warren, I.G. Mills, D.E. Neal, The androgen receptor induces a distinct transcriptional program in castration-resistant prostate cancer in man, *Cancer Cell*, 23 (2013) 35-47.

[28] I.A. Asangani, K. Wilder-Romans, V.L. Dommeti, P.M. Krishnamurthy, I.J. Apel, J. Escara-Wilke, S.R. Plymate, N.M. Navone, S. Wang, F.Y. Feng, A.M. Chinnaiyan, BET Bromodomain Inhibitors Enhance Efficacy and Disrupt Resistance to AR Antagonists in the Treatment of Prostate Cancer, *Mol. Cancer Res.*, (2016).

- [29] I.A. Asangani, V.L. Dommeti, X. Wang, R. Malik, M. Cieslik, R. Yang, J. Escara-Wilke, K. Wilder-Romans, S. Dhanireddy, C. Engelke, M.K. Iyer, X. Jing, Y.M. Wu, X. Cao, Z.S. Qin, S. Wang, F.Y. Feng, A.M. Chinnaiyan, Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer, *Nature*, 510 (2014) 278-282.
- [30] L. Cai, Y.H. Tsai, P. Wang, J. Wang, D. Li, H. Fan, Y. Zhao, R. Bareja, R. Lu, E.M. Wilson, A. Sboner, Y.E. Whang, D. Zheng, J.S. Parker, H.S. Earp, G.G. Wang, ZFX Mediates Non-canonical Oncogenic Functions of the Androgen Receptor Splice Variant 7 in Castrate-Resistant Prostate Cancer, *Mol. Cell*, 72 (2018) 341-354 e346.
- [31] T. Migita, K.I. Takayama, T. Urano, D. Obinata, K. Ikeda, T. Soga, S. Takahashi, S. Inoue, ACSL3 promotes intratumoral steroidogenesis in prostate cancer cells, *Cancer Sci.*, 108 (2017) 2011-2021.
- [32] P.B. Dervan, Molecular recognition of DNA by small molecules, *Bioorg. Med. Chem.*, 9 (2001) 2215-2235.
- [33] P.B. Dervan, B.S. Edelson, Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13 (2003) 284-299.
- [34] K. Morita, K. Suzuki, S. Maeda, A. Matsuo, Y. Mitsuda, C. Tokushige, G. Kashiwazaki, J. Taniguchi, R. Maeda, M. Noura, M. Hirata, T. Kataoka, A. Yano, Y. Yamada, H. Kiyose, M. Tokumasu, H. Matsuo, S. Tanaka, Y. Okuno, M. Muto, K. Naka, K. Ito, T. Kitamura, Y. Kaneda, P.P. Liu, T. Bando, S. Adachi, H. Sugiyama, Y. Kamikubo, Genetic regulation of the RUNX transcription factor family has antitumor effects, *The Journal of Clinical Investigation*, 127 (2017) 2815-2828.
- [35] D. Obinata, K. Takayama, K. Fujiwara, T. Suzuki, S. Tsutsumi, N. Fukuda, H. Nagase, T. Fujimura, T. Urano, Y. Homma, H. Aburatani, S. Takahashi, S. Inoue, Targeting Oct1 genomic function inhibits androgen receptor signaling and castration-resistant prostate cancer growth, *Oncogene*, 35 (2016) 6350-6358.
- [36] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25 (2001) 402-408.
- [37] Y. Zhou, B. Zhou, L. Pache, M. Chang, A.H. Khodabakhshi, O. Tanaseichuk, C. Benner, S.K. Chanda, Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets, *Nat Commun*, 10 (2019) 1523.
- [38] D. Obinata, K. Takayama, T. Urano, T. Murata, J. Kumagai, T. Fujimura, K. Ikeda, K. Horie-Inoue, Y. Homma, Y. Ouchi, S. Takahashi, S. Inoue, Oct1 regulates cell growth of LNCaP cells and is a prognostic factor for prostate cancer, *Int. J. Cancer*, 130 (2012) 1021-1028.

- [39] H.I. Scher, S. Halabi, I. Tannock, M. Morris, C.N. Sternberg, M.A. Carducci, M.A. Eisenberger, C. Higano, G.J. Bubley, R. Dreicer, D. Petrylak, P. Kantoff, E. Basch, W.K. Kelly, W.D. Figg, E.J. Small, T.M. Beer, G. Wilding, A. Martin, M. Hussain, G. Prostate Cancer Clinical Trials Working, Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group, *J. Clin. Oncol.*, 26 (2008) 1148-1159.
- [40] Y. Li, M. Dong, F. Kong, J. Zhou, Octamer transcription factor 1 mediates epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer, *Tumour Biol.*, 36 (2015) 9941-9946.
- [41] M. Uhlen, L. Fagerberg, B.M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C.A. Szgyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J.O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J.M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, F. Ponten, Proteomics. Tissue-based map of the human proteome, *Science*, 347 (2015) 1260419.
- [42] C. Schild-Poulter, A. Shih, D. Tantin, N.C. Yarymowich, S. Soubeyrand, P.A. Sharp, R.J. Hache, DNA-PK phosphorylation sites on Oct-1 promote cell survival following DNA damage, *Oncogene*, 26 (2007) 3980-3988.
- [43] E. Bolderson, E. Petermann, L. Croft, A. Suraweera, R.K. Pandita, T.K. Pandita, T. Helleday, K.K. Khanna, D.J. Richard, Human single-stranded DNA binding protein 1 (hSSB1/NABP2) is required for the stability and repair of stalled replication forks, *Nucleic Acids Res.*, 42 (2014) 6326-6336.
- [44] D.J. Richard, E. Bolderson, L. Cubeddu, R.I. Wadsworth, K. Savage, G.G. Sharma, M.L. Nicolette, S. Tsvetanov, M.J. McIlwraith, R.K. Pandita, S. Takeda, R.T. Hay, J. Gautier, S.C. West, T.T. Paull, T.K. Pandita, M.F. White, K.K. Khanna, Single-stranded DNA-binding protein hSSB1 is critical for genomic stability, *Nature*, 453 (2008) 677-681.
- [45] V. Boersma, N. Moatti, S. Segura-Bayona, M.H. Peuscher, J. van der Torre, B.A. Wevers, A. Orthwein, D. Durocher, J.J.L. Jacobs, MAD2L2 controls DNA repair at telomeres and DNA breaks by inhibiting 5' end resection, *Nature*, 521 (2015) 537-540.
- [46] W. Fan, S. Jin, T. Tong, H. Zhao, F. Fan, M.J. Antinore, B. Rajasekaran, M. Wu, Q. Zhan, BRCA1 regulates GADD45 through its interactions with the OCT-1 and CAAT motifs, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 8061-8067.

- [47] J. Nie, S. Sakamoto, D. Song, Z. Qu, K. Ota, T. Taniguchi, Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase, *FEBS Lett.*, 424 (1998) 27-32.
- [48] J.A. Raskatov, N.G. Nickols, A.E. Hargrove, G.K. Marinov, B. Wold, P.B. Dervan, Gene expression changes in a tumor xenograft by a pyrrole-imidazole polyamide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109 (2012) 16041-16045.
- [49] N.G. Nickols, P.B. Dervan, Suppression of androgen receptor-mediated gene expression by a sequence-specific DNA-binding polyamide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104 (2007) 10418-10423.
- [50] X. Wang, H. Nagase, T. Watanabe, H. Nobusue, T. Suzuki, Y. Asami, Y. Shinojima, H. Kawashima, K. Takagi, R. Mishra, J. Igarashi, M. Kimura, T. Takayama, N. Fukuda, H. Sugiyama, Inhibition of MMP-9 transcription and suppression of tumor metastasis by pyrrole-imidazole polyamide, *Cancer Sci.*, 101 (2010) 759-766.
- [51] F. Yang, N.G. Nickols, B.C. Li, G.K. Marinov, J.W. Said, P.B. Dervan, Antitumor activity of a pyrrole-imidazole polyamide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110 (2013) 1863-1868.

【研究業績】

船越 大吾

I 発表	① 一般発表	2
	② 特別発表	なし
II 論文	① 原著論文	なし
	② 症例報告	なし
	③ 総説	なし
III 著書		なし

以上

I 発表

一般発表

1. 船越大吾, 大日方大亮, 高山賢一, 藤原恭子, 高橋悟, 井上聡. アルキル化剤を修飾したピロールイミダゾールポリアミドの前立腺がん細胞に対する抗腫瘍効果の検討. 第 79 回日本がん学会学術総会, 広島, 2020.10
2. 船越大吾, 大日方大亮, 鈴木秋吾, 橋本翔, 高田将吾, 桜井文紀, 堀祐太郎, 村田保貴, 吉澤剛, 松井強, 持田淳一, 山口健哉, 高橋悟. 当院における逐次療法の観点から検討したアビラテロンの臨床効果について. 第 106 回日本泌尿器科学会総会, 京都, 2018.04

特別発表

なし

II 論文

① 原著論文

なし

② 症例報告

なし

③ 総説

なし

Ⅲ 著書

なし