

令和元年6月28日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11009

研究課題名(和文) オルファン型核内レセプターNR4A1に対する新規リガンドの膀胱癌治療への応用

研究課題名(英文) The Orphan Nuclear Receptor 4A1: A Potential New Therapeutic Target for Bladder Cancer.

研究代表者

田岡 利宜也 (TAOKA, RIKIYA)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：10403784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はオルファン型核内レセプターNR4A1の新規リガンドであるC-DIMsの膀胱癌治療への応用を目指して計画されたが、C-DIMsの十分な供給が得られず、CF3DODA-Meの研究へ移行した。その結果、CF3DODA-Meにより増加した細胞内活性酸素(ROS)が、specificity protein (Sp)およびSp-regulated proteinの発現抑制に繋がり、最終的に抗腫瘍効果を示す可能性を裏付けるもので、膀胱癌幹細胞、およびヌードマウス皮下移植モデルにおいても同様であった。本研究はROSの抗腫瘍メカニズム、そしてCF3DODA-Meの膀胱癌治療への応用の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱癌は、既存の抗癌剤に加え免疫チェックポイント阻害剤が導入され、手術や放射線療法を組み合わせたMulti-Modal Therapyが積極的に行われる現在においても未だ満足できる治療アウトカムを得ていない。本研究で用いたCF3DODA-Meは、膀胱癌に対し十二分な抗腫瘍効果を発揮する薬剤で、既存治療薬と異なる作用機序も想定されることから、導入する治療戦略スペースは必ず存在する。本研究の結果は、膀胱癌で悩まれる多くの患者の福音になる可能性を秘めるほか、ROSの新たな抗腫瘍メカニズムを示すもので、社会的・学術的意義は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：CF3DODA-Me is a new compound derived synthetically from licorice. In this study, we have investigated the anticancer effects of CF3DODA-Me, and determined its effects on Specificity protein (Sp) transcription factors and reactive oxygen species (ROS) activity in bladder cancer cells. In bladder cancer cells, CF3DODA-Me induced ROS, and inhibited cell viability, survival, and the expression of Sp and Sp-regulated proteins (VEGF, VEGFR2, Bcl-2, Survivin). These anticancer effects were clearly attenuated by co-treatment with antioxidant GSH. Silencing of Sp reduced Sp-regulated proteins and induced apoptosis. In bladder cancer stem cells, CF3DODA-Me downregulated Sp and Sp-regulated proteins, and inhibited sphere formation. In vivo setting, CF3DODA-Me also reduced the expression of Sp, increased amount of active caspase-3 positive cells, and inhibited tumor growth as compared to the control. These results demonstrated a novel ROS-dependent mechanism of anticancer activity for CF3DODA-Me.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：膀胱癌 活性酸素 specificity protein 幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)
研究開始当初の背景

本研究はオルファン型核内レセプターNR4A1 の新規リガンドである C-DIMs の膀胱癌治療への応用を目指し計画されたが十分な供給が得られず、C-DIMs と同じく Specificity Protein (Sp) に作用する可能性のある甘草由来の新規化合物 CF3DODA-Me (図 1)を用いた研究へ移行した。

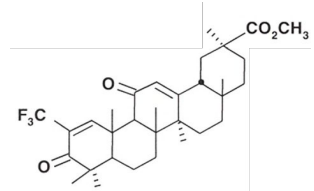


図 1 : CF3DODA-Me

Sp は、GC-rich DNA に結合し転写を促進する蛋白質で、多くの腫瘍細胞で高発現しており、治療標的として近年注目されている。本研究を開始するにあたって申請者らは、Sp の発現低下がアポトーシスを抑制する Bcl-2 や Survivin、そして細胞増殖に関わる VEGF、あるいは VEGFR などの Sp-regulated protein の発現抑制に繋がり、最終的に腫瘍細胞の増殖抑制効果を示すことを既に報告していた (Expert Opin Ther Targets. 18(7):759-69, 2014)。

一方、Reactive oxygen species (ROS)は、DNA ダメージを介したアポトーシスによる抗腫瘍効果が想定されているが、詳細なメカニズムは不明である。近年、ROS が Sp 合成に参与する可能性が報告され注目されている (Mol Cell Biol. 34(13):1382-95, 2014)。

2. 研究の目的

本研究は、新規化合物 CF3DODA-Me の膀胱癌細胞に対する抗腫瘍効果、およびその Sp 発現制御メカニズムと ROS との関連を証明することを目的とし、最終的に CF3DODA-Me を用いた膀胱癌の新規治療戦略の基盤データを集積し、ROS や Sp を介した抗腫瘍メカニズムを明らかとする。

3. 研究の方法

膀胱癌細胞株 (RT4、J82、253JB-) を用い、細胞増殖を MTT assay で、アポトーシスを PI-FACS による DNA fragmentation と Western blot による active caspase-3 で評価した。Sp と Sp-regulated protein(Bcl-2, Survivin, VEGF, VEGFR2)の発現は Western blot で解析したほか、細胞内 ROS は DCF-DA assay で測定し、Sp 機能は RNA 干渉実験で検討した。加えて、Cycloheximide を用いて作製した膀胱癌幹細胞とヌードマウス皮下に移植した膀胱癌細胞における抗腫瘍効果を解析した。

4. 研究成果

CF3DODA-Me は濃度依存性に膀胱癌細胞の増殖を抑制し(図 2-a)、アポトーシス経路を活性化した(図 2-b)。加えて、CF3DODA-Me は細胞内 ROS を増加させ(図 3)、Sp と Sp-regulated protein の発現を抑制した(図 4)。一方、抗酸化剤との共培養は CF3DODA-Me による細胞内 ROS の増加、Sp の発現抑制やアポトーシス経路の活性化効果を打ち消し、Sp を標的とする RNA 干渉は CF3DODA-Me と同様の抗腫瘍効果を示した。CF3DODA-Me は、膀胱癌幹細胞において Sp と Sp-regulated protein の発現を抑制し、sphere formation を阻害したほか(図 5)、ヌードマウス皮下移植膀胱癌細胞の増殖抑制(図 6)、Sp の発現抑制と active caspase-3 陽性率の増加を示した。

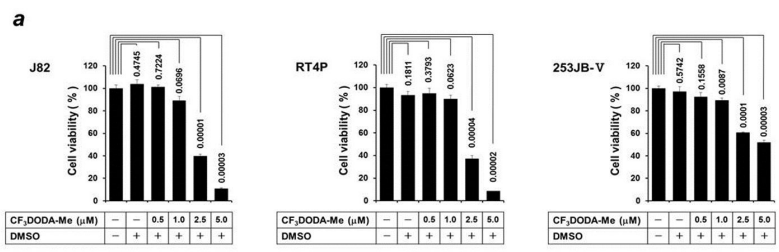


図 2-a: Cell viability

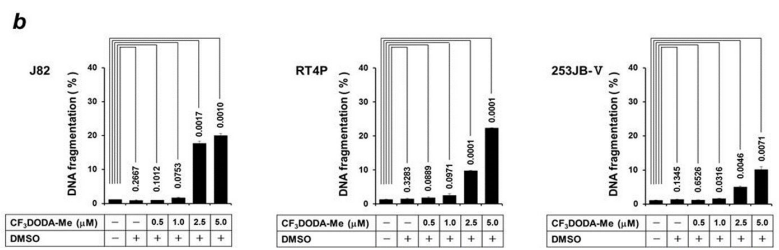


図 2-b: DNA fragmentation

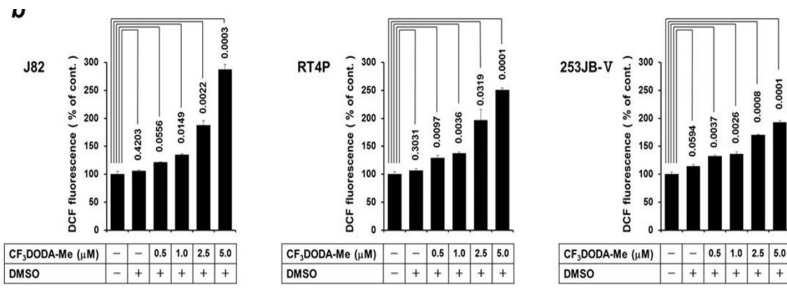


Figure 3: Intracellular ROS

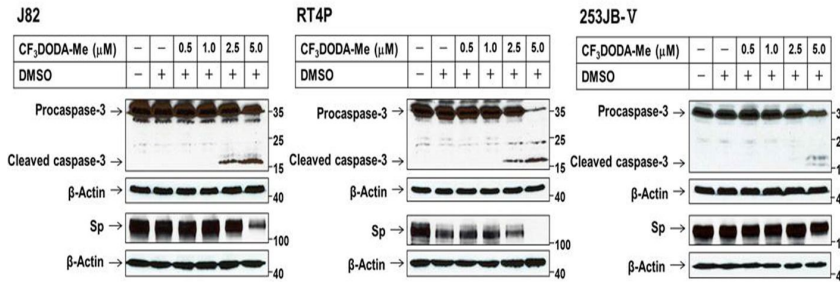


Figure 4: Western blotting

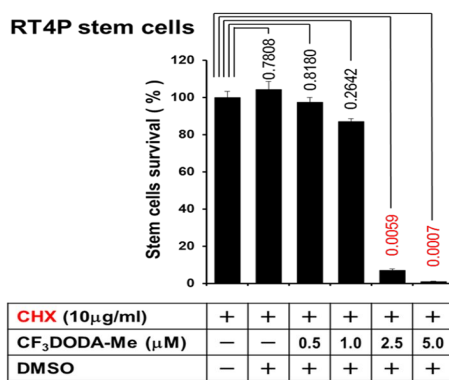


Figure 5: Cancer stem cells

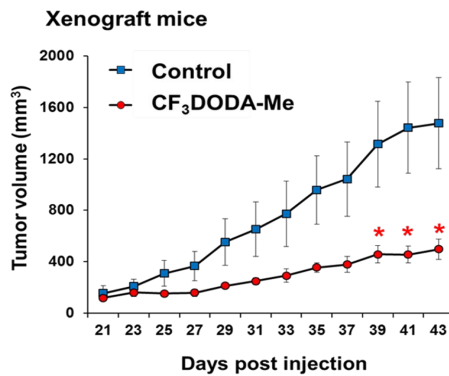
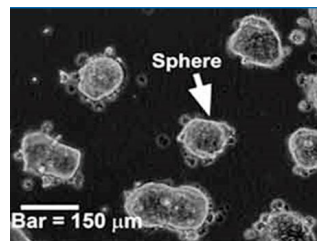


Figure 6: Xenograft mice model

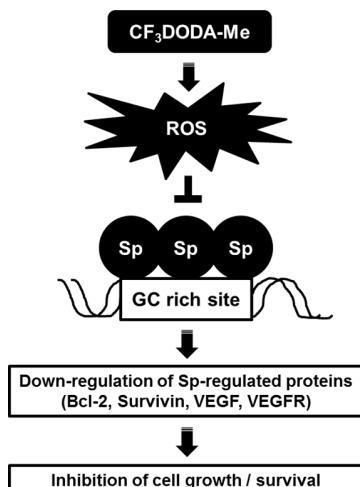


Figure 7: The mechanism of action of CF3DODA-Me

これらの結果は、CF3DODA-Me によって増加した細胞内の ROS が、Sp および Sp-regulated protein の発現抑制に繋がり、最終的に抗腫瘍効果を示す可能性を初めて裏付けるもので、CF3DODA-Me の膀胱癌治療への応用の可能性を示唆し、さらには ROS の抗腫瘍メカニズムが示すもので学術的インパクトは大きい。

5. 主な発表論文等

上記成果に関して、論文作成中であり、知的財産保護の観点から公表は控えている。

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：笥 善行

ローマ字氏名：Kakehi Yoshiyuki

所属研究機関名：香川大学

部局名：大学本部

職名：学長

研究者番号(8桁): 20214273

(2)研究分担者

研究分担者氏名：杉元 幹史

ローマ字氏名：Sugimoto Mikio

所属研究機関名：香川大学

部局名：医学部 泌尿器科学

職名：教授

研究者番号(8桁): 10243768

(3)研究協力者

研究協力者氏名：Safe Stephen (テキサス A&M 大学・薬理学教授)

研究協力者氏名：Ashish Kamat (MD アンダーソン癌センター・泌尿器科学教授)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。