

平成21年5月7日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390437
 研究課題名（和文）
 尿路性器癌の抗癌剤耐性獲得における新規分子機構解明と治療法開発のための基盤研究
 研究課題名（英文）
 Fundamental research for new molecular mechanism of anticancer resistance in urogenital cancer
 研究代表者
 那須 保友（NASU YASUTOMO）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：20237572

研究成果の概要：

抗がん剤による治療を行った場合に、徐々にその効果が低下することは臨床上しばしば認めることであり、そのメカニズムを解明しその結果に基づき新たな治療法を開発することは極めて重要なことである。がん細胞に対してアポトーシス（細胞死）誘導するREIC/Dkk-3が耐性獲得抑制、耐性克服もしくは感受性増強のための標的となることを明らかにした。特に、REIC/Dkk-3により抗がん剤耐性獲得におけるkey moleculeであるP-glycoproteinの発現が低下することを突き止めた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2007年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	11,600,000	3,480,000	15,080,000

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学、遺伝子治療学

1. 研究開始当初の背景

JNKおよびREIC/Dkk-3をはじめとするJNK関連ストレス応答分子と薬剤耐性化の関連を明らかにすることで耐性獲得の新規分子機構を解明し、さらには耐性克服を企図した分子修飾の方策を突き止めることが可能となる。一連の抗癌剤耐性獲得の機序とストレス応答分子との関連性を示唆する報告は散見されるが、

耐性克服を企図しかつ臨床応用化の実現可能性を有する分子修飾法に関する具体的研究成果は得られていないため

2. 研究の目的

尿路性器癌に対する抗癌剤耐性獲得における新規分子機構としてMAPK familyのひとつでありストレス応答分子のひとつであるJNKに着目し以下のことを明らかにする。

(1) JNKならびにJNK関連分子が抗癌剤耐性獲得に関与しているか否かを分子細胞生物学的に明らかにする。

(2) 従来より明らかにされている耐性獲得機序であるMDR、MRP、GST-IIなどとの関連性を明らかにする。

JNKおよびJNK関連分子を標的とし抗癌剤耐性克服ならびに感受性増強を企図した治療法開発の可能性を明らかにする。

すなわち、尿路性器癌に対する抗癌剤耐性獲得における新規分子機構としてのJNKと関連遺伝子の意義を明らかにし、癌の治療における標的となりうるか否かを検証し、有効な治療法を開発するための科学的基盤を形成することである。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞株

使用した癌細胞株は野生型 MCF7 (MCF7/Wt), 多剤耐性型 MCF7(MCF7/ADR), MDA-MB-231, SK-BR-3, HCC1806. コントロールとして, 子宮頸癌細胞株 HeLa, 線維芽細胞株 OUMS24, 正常乳腺上皮 HMEC を使用した。

(2) 蛋白発現分析

細胞株から蛋白を抽出し, それぞれの目的蛋白に応じた抗体を使用してウエスタンブロットを行い, 蛋白発現を定量した. REIC に対する抗体は岡山大学細胞生物学教室で作成した。

(3) REIC アデノウイルスベクター

REIC 遺伝子の Full-length cDNA を COS-TPC method にてアデノウイルスベクターに挿入した. ベクターのコントロールとして LacZ 遺伝子を挿入したアデノウイルスベクターを使用した。

(4) Apoptosis Assay

In Vitro においては, アデノウイルスベクターを感染させてから 48 時間培養した後, Hoechst33342 solution を用いて細胞核の濃

縮, 断片化を観察してアポトーシスの評価とした. また In Vivo では, TUNEL 染色法を用いて腫瘍細胞のアポトーシスの評価を行った。

(5) Cell Viability Assay

96 穴の培養プレートを使用して, アデノウイルスベクターを感染させてから 48 時間培養した後, ドキソルビシン濃度の異なる培養液中で 72 時間培養し, MTT assay 法にて生存している細胞数を定量した。

(6) ドキソルビシンの細胞内濃度測定

REIC 遺伝子を強制発現させた癌細胞株において, 10 μ M のドキソルビシン濃度の培養液中で 36 時間培養した. ドキソルビシンは赤色の自家蛍光を持っているため, それを蛍光顕微鏡で観察し, 細胞内のドキソルビシン量を定量した。

(7) マウス皮下腫瘍モデル

生後 5-6 週のヌードマウスの皮下に MCF7/Wt を 5×10^6 個移植し, 皮下腫瘍モデルを作成した. MCF7 はエストロゲン受容体陽性のため, あらかじめ皮下にエストラジオールの徐放剤を移植した. 皮下腫瘍が 3-6mm 程度になったところで, 腫瘍内にアデノウイルスベクターを局注し感染させ, 3 週間にわたり, 腫瘍の体積を評価した。

4. 研究成果

(1) 癌細胞株における REIC 発現の抑制

スクリーニングとして各種乳癌細胞株において REIC 蛋白の発現を検討した. 線維芽細胞株, 正常乳腺上皮においては REIC 蛋白の発現が見られたが, 薬剤耐性 MCF7/ADR も含め, 今回使用したすべての癌細胞株においてその発現は抑制されていた. このことは前立腺癌など他の癌腫における結果と同様であった。

(2) アデノウイルスベクター感染による REIC

強制発現

MCF7/Wt, MCF7/ADR についてアデノウイルスベクターを感染させて REIC 蛋白発現の検討を行った。いずれの細胞株においても、アデノウイルスベクターの濃度依存性に REIC の強発現がみられた。以後十分な蛋白強制発現が得られる 100MOI を実験に使用するベクター濃度とした。

(3)REIC 強制発現によるアポトーシス誘導
In Vitro において REIC 強制発現がアポトーシスを誘導することの検討を行った。MCF7/Wt, MCF7/ADR, SK-BR-3 の細胞株すべてにおいて REIC アデノウイルスベクター感染が有意にアポトーシスを誘導していた。しかし正常乳腺上皮 (HEMC) については、同濃度の REIC アデノウイルスベクター感染でも有意なアポトーシス誘導は見られなかった。

(4)REIC 強制発現と薬剤耐性の関係
REIC 強制発現が薬剤耐性に及ぼす影響を野生型 MCF7 (MCF7/Wt) と多剤耐性 MCF7 (MCF7/ADR) を用いて検討した。MCF7/Wt では REIC 強制発現はドキソルビシンの感受性に影響を与えなかったが、MCF7/ADR ではドキソルビシン濃度 10 μ M, 25 μ M において REIC 強制発現群で有意に感受性が增強していた。

(5)REIC 強制発現と JNK 経路の関係
MCF7/Wt, MCF7/ADR について REIC 強制発現が JNK-c-Jun 経路に及ぼす影響を検討した。いずれの系においても JNK, c-Jun の発現量そのものに変化はなかった。MCF7/Wt, MCF7/ADR いずれにおいても REIC 強制発現が JNK をリン酸化誘導することでその活性を増強し、c-Jun リン酸化を来していた。活性化された c-Jun は、cleaved caspase-3 が発現増強していることからアポトーシス誘導に関与していると考えられた。またそれと同時に、活性化 c-Jun は多剤耐性のマーカーである P-glycoprotein (P-gp) を抑制しており、REIC

強制発現がドキソルビシンに対する薬剤耐性緩和に関与していると考えられた。REIC 強制発現系に JNK 阻害剤を加えると c-Jun 活性化、P-gp 抑制は解除され、これらの反応が JNK 依存性であることが示唆された。

(6)REIC 強制発現と細胞内ドキソルビシン濃度の関係

自家蛍光を測定することにより細胞内ドキソルビシン濃度を測定した。MCF7/ADR において REIC 強制発現群では細胞内ドキソルビシン濃度の上昇が見られた。このことは、REIC 強制発現により多剤耐性マーカーである薬剤排出性膜蛋白の P-gp が抑制されるとした仮説を裏付けるものであった。

(7) In VivoにおけるREIC強制発現の腫瘍増殖抑制効果

ヌードマウス皮下腫瘍モデルで腫瘍増殖抑制効果を検討した。コントロール群に比べ、REIC アデノウイルスベクターを腫瘍内注射した群において著明な腫瘍増殖抑制効果を認めた。また、TUNEL染色において高率にアポトーシスを認め、増殖抑制効果がREIC強制発現からのアポトーシス誘導によるものであることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件)

- 1) Kawasaki K., Watanabe M., Sakaguchi M., Ogasawara Y., Ochiai K., Nasu Y., Doihara H., Kashiwakura Y., Huh N-h., Kumon H., Date H.: REIC/Dkk-3 overexpression downregulates P-glycoprotein in multidrug-resistant MCF7 /ADR cells and induces apoptosis in breast cancer, *Cancer Gene Therapy*, 16, 65-75, (2008) 【査読有り】
- 2) Abarzua F., Kashiwakura Y., Takaoka M., Watanabe M., Ochiai K., Sakaguchi M., Iwawaki T., Tanimoto R., Nasu Y., Huh NH.,

Kumon H.: An N-terminal 78 amino acid truncation of REIC/Dkk-3 effectively induces apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun*, 375, 614-618, (2008) 【査読有り】

3) Kobayashi, T., Sakaguchi M., Tanimoto R., Abarzua, F., Takaishi M., Kaku, H. Kataoka, K., Saika T., Nasu Y., Miyazaki M., Kumon H., Huh : N-h. Mechanistic Analysis of Resistance to REIC/Dkk-3-induced Apoptosis in Human Bladder Cancer Cells, *Acta Med Okayama*, 62, 379-384, (2008) 【査読有り】

4) Tanimoto R, Abarzua F, Sakaguchi M., Takaishi M, Nasu Y., Kumon H, Huh NH : 「REIC/Dkk-3 as a potential gene therapeutic agent against human testicular cancer.」, *Int J Mol Med.*, 19, 363-368, (2007)、【査読有り】

5) Abarzua F, Sakaguchi M., Tanimoto R, Sonogawa H, Li DW, Edamura K, Kobayashi T, Watanabe M, Kashiwakura Y, Kaku H, Saika T., Nakamura K, Nasu Y., Kumon H, Huh NH : 「Heat shock proteins play a crucial role in tumor-specific apoptosis by REIC/Dkk-3.」, *Int J Mol Med.*, 20, 37-43, (2007) 【査読有り】

6) Edamura K, Nasu Y., Takaishi M, Kobayashi T, Abarzua F, Sakaguchi M., Kashiwakura Y, Ebara S., Saika T., Watanabe M, Huh NH, Kumon H : Adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene transfer inhibits tumor growth and metastasis in an orthotopic prostate cancer model., *Cancer Gene Ther.*, 14, 765-772, (2007) 【査読有り】

7) Nasu Y., Saika T., Ebara S., Kusaka N, Kaku H, Abarzua F, Manabe D, Thompson T. C, Kumon H: Suicide gene therapy with adenoviral delivery of HSV-tK gene for patients with

local recurrence of prostate cancer after hormonal therapy, *Mol Ther.*, 15, 834-840, (2007) 【査読有り】

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

産業財産権の名称: 抗癌剤耐性癌において

抗癌剤増強作用を有する癌細胞死誘導剤

発明者: 公文裕巳、那須保友、渡部昌実、柏倉祐司、川崎賢祐

権利者: 国立大学法人岡山大学、桃太郎源株式会社

産業財産権の種類:

番号: 特願2007-287373

出願年月日: 2007年11月5日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須 保友 (NASU YASUTOMO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 20237572

(2) 研究分担者

阪口 政清 (SAKAGUCHI MASAKIYO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 70379840

雑賀 隆史 (SAIKA TAKASHI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号: 10314676

江原 伸 (EBARA SHIN)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助手
研究者番号: 70379741