

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09683

研究課題名(和文)膀胱癌再発抑制のための癌抑制性ペプチド膀胱注入の効果と毒性の検討

研究課題名(英文)Efficacy and toxicity of bladder instillation of anti-tumor peptide for inhibition of bladder tumor in mice

研究代表者

島居 徹 (Shimazui, Toru)

筑波大学・医学医療系・客員研究員

研究者番号：80235613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：p16やp53を介したp14の異常によるRbリン酸化抑制の異常は膀胱発癌・進展の重要な分子機構と考えられる。今回、p16とヒトp14相同のマウスp19を欠損するマウス膀胱腫瘍細胞株MB49の膀胱移植モデルにおいて、p16、p19ペプチドの抑制効果と毒性を検討した。

ペプチド膀胱注入によるMB49移植腫瘍は、対照76.9%に対し、p16群0%、p19群0%、p16p19併用群9.1%と抑制された。ペプチド群は上皮に乳頭状変化が認められたが、Ki-67増殖核を認めず腫瘍性変化でないと考えられた。またペプチドの全身投与による血液毒性、臓器の組織学的変化は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱癌は膀胱を温存して治療する場合、経尿道的切除が行われるが、切除後の癌細胞の再生着による膀胱再発が多く、抗癌剤やBCGの膀胱注入による予防が標準的であるが、効果の限界や強い副作用、抵抗性などの課題がある。本研究で膀胱癌の発生・進展にかかわる分子の異常を修復するペプチドの膀胱注入が膀胱腫瘍の発生を抑制しうることを動物モデルで示したことは、今後、膀胱注入による分子標的治療のひとつと考えられ、新たな治療選択肢として発展していくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Retinoblastoma (Rb) protein pathway is key molecules of bladder tumor (BT) development, and Rb dysfunction is associated with p16 or p14 to p53 pathway. Here, we evaluate the efficacy and toxicity of peptide administration for mouse p16 and mouse p19, which is homology of human p14, on mouse bladder implantation model for using p16- and p19-abscent mouse BT cell line.

MB49 bladder implantation tumor was inhibited by peptide transduction by bladder instillation of peptides, for 0% to 9.1% of BT development in peptide groups as compared with 76.9% of control group. Papillary epithelium was frequently observed in peptide groups, whereas no Ki-67 labelling indicated different from tumor profile.

No hematological and histological organ toxicity was observed in systemic administration of p16 or p19 peptides in mice.

研究分野：泌尿器科腫瘍

キーワード：膀胱腫瘍 機能性ペプチド p16 p14 p19 膀胱移植モデル 膀胱注入 毒性試験

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は、筋層非浸潤性癌は膀胱内再発しやすく、進筋層浸潤癌は浸潤、転移が問題となる。前者は経尿道的切除に加え抗癌剤や BCG の膀胱内注入が行われるが、抗腫瘍効果の限界や強い副作用、抵抗性になった場合や一部にみられる浸潤癌への進展などの課題があり、他の薬物選択肢が乏しいことから全摘出が必要になりうる。

多くの癌では、癌抑制遺伝子とそのシグナル経路として、p53 遺伝子、Retinoblastoma (Rb) 遺伝子が発生や進行に関わるとされ、p16^{INK4a} (以下 p16) は INK4 family の癌抑制蛋白で Cyclin-dependent kinase (cdk) 4, 6、Cyclin D を制御することで Rb 蛋白のリン酸化を抑えており、膀胱癌においても、初期は p16 の機能異常が、また浸潤癌や進行癌への進展過程では p53 の機能異常 (Shaw NJ, et al. 2005) が関わる事が指摘されている。

p16 の機能異常を回復させる p16 機能性ペプチド (r9-p16 Minimal Inhibitory sequence (MIS) (Fahraeus R, et al. 1998)) (以下 p16 ペプチド) とトランスポーターペプチド (Wr-T : Kondo E, et al. 2004) を用いた p16 ペプチド導入システムは p16 欠損腫瘍において p16 および Rb 分子の機能回復による抗腫瘍効果が報告されている。このシステムを応用し、さらに p53 機能を回復させる p14^{ARF} (以下 p14) を標的とした機能性ペプチド (以下 p14 ペプチド) の開発による Rb-p53 経路に対するペプチド導入治療が膀胱癌の再発から進展までを制御しうる新規の治療体系になると仮定し、それを基礎的に検討するため本研究プロジェクトを計画した。

2. 研究の目的

膀胱癌の発癌・進展には多くの遺伝子変異が関わっているが、中でも p53 と p16 の異常は筋層非浸潤性の腫瘍から進行癌に至るまでの重要な分子・遺伝子機構である (Shaw NJ, et al. 2005)。P16 は cyclin dependent kinase (CDKs) を制御し、Rb 蛋白のリン酸化を抑えることで機能を維持している (Le Fere-Belda MA, et al. 2004)。Wu Q, et al. (1996) は p16 遺伝子導入により膀胱癌細胞株の増殖と造腫瘍性が抑制されることを報告しており、p16 の機能回復は膀胱癌を抑制することが知られている (Wu Q, et al. 1996)。我々は、P16 腫瘍抑制性ペプチドが血液腫瘍において劇的に増殖を抑制すること (Kondo E, et al. 2004) をふまえて、ペプチド導入システムである Wr-T システムを用いてこの p16 ペプチドがマウス膀胱癌皮下移植腫瘍を抑制すること、また肺転移モデルで肺転移を抑制することを報告した (Shimazui T, et al. 2013, Shimazui T, et al. 2019)。今回、新たに p14 機能性ペプチドによる p53 を介した Rb 蛋白リン酸化の制御を検討するとともに、膀胱癌の膀胱内再発を抑制する膀胱内注入療法の新たな選択肢の開発を目的として基礎的検討を行う。具体的計画として、マウス膀胱癌細胞株 MB49 を用いたマウス膀胱腫瘍移植モデルにおいて、p16 ペプチドとヒト p14 と相同のマウス p19 の機能性ペプチドの膀胱注入による膀胱癌細胞株の生着抑制、ならびに全身投与による毒性の検討を行う。

3. 研究の方法

細胞培養：マウス膀胱癌細胞株 (MB49) を 10% FCS 加 RPMI1640 培地にて培養した。

ペプチド導入と細胞増殖抑制：基礎的検討として、MB49 細胞株に対して、Wr-T システムによりペプチドを導入 4 日間培養後の細胞増殖抑制を評価した。細胞を 5,000 細胞/well に調整し前培養をおこなった。ペプチド導入は対照、p16 単独、p19 単独、p16/p19 混合の 4 群で、ペプチド濃度は各々 2 μ M と 8 μ M とし、4 日間培養し、WST-8 (富士フィルム和光純薬、#343-07623、熊本) で 450nm の吸光度で評価した。

マウス膀胱移植モデル：6 週齢の雌 C57BL/6 マウスのあらかじめ poly-L-LYSINE (#P4707 Sigma-Aldrich Japan) 処理を行った膀胱内に、10⁵ 個/50mL PBS の MB49 細胞株を注入、対照群は 50mL PBS を、ペプチド群は 50mL ペプチドを最終濃度 80nM になるよう膀胱注入し 2 時間維持した。3 週間後に安楽死の上、屠殺し、膀胱を組織学的に解析した。

ペプチド合成：ペプチド導入用トランスポーターペプチド Wr-T (アミノ酸配列 KETWWETWWTEWWTEWSQGPGrrrrrrrr (r:D 体アルギニン) (Kondo E, et al. 2004)、FITC 標識 r9-p16 MIS ペプチドはバイオゲート(株) (山形) にて合成し、p16 は FLDTLVVLR、FLDTLVVLRHG (Fahraeus R, et al. 1998)、マウス p19 は MGRRFLVTVRIQRAGRPLQE-GPGrrrrrrrr とした。

ペプチド導入：Wr-T と p16 ペプチドを室温で 60 分間混合させた後、ペプチド導入を行った。膀胱移植モデルの抑制実験における膀胱内最終濃度は各々 50nM、80nM とし、毒性試験では 100nmol、25nmol を心注にて投与した。

組織学的評価：膀胱あるいはその他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリンで一昼夜固定後、パラフィン包埋し、4 μ m 厚に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡下に組織学的な異常、変化を観察した。

Ki-67 免疫組織化学染色：膀胱組織を 10% 中性緩衝ホルマリンに一昼夜固定。通常のパラフィン包埋の上、4 μ m 厚で薄切し、組織学的観察は前述の通り HE 染色で行った。免疫染色は、抗 Ki-67 ウサギモノクローナル抗体 (SP6) (#418071、ニチレイ) を一次抗体として常温 1 時間反応、二次抗体以降にヒストファインシンプルステインマウス MAX-PO (R) (#414341、ニチレイ) を用い、DAB で発色、核染色はヘマトキシリンで行った。

Ki-67 免疫染色による増殖核の標識率：強拡大下に標識の良好な領域で 100 核中の陽性核数を計測し、増殖核標識率とした。

ペプチドの全身投与後の毒性：5 週齢の雌雄のマウス各 12 匹を使用し、群は対照群、p16 群、p19 群、併用群で 1 群 3 匹とした。各ペプチドを 100nmol (Wr-T 25nmol) を心注し、2 週間後の短期毒性を血液検査(血算、生化学)と多臓器の組織学的観察で評価した。

4 . 研究成果

結果:MB49 へのペプチド導入と細胞増殖抑制：ペプチド導入後の細胞増殖を Fig.1 に示した。対照群の 4 日目の増殖度を 100%とした場合の比率ではペプチド導入による増殖抑制は濃度依存性がみられた。p16 ペプチド導入の抑制が p19 ペプチドよりも強い傾向がみられ、併用による相乗効果は乏しい傾向であった。

ペプチドの膀胱注入による膀胱腫瘍の生着抑制：組織学的に腫瘍あるいは乳頭状変化あるいは過形成、これらの認められない正常上皮が観察された(Fig. 2A-2F)。各群における各々の割合、Ki-67 免疫染色と増殖核の標識率は各々Table 1 および Fig. 3 に示したが、増殖核が標識されたのは腫瘍組織で、過形成や乳頭状上皮には増殖核はほとんど標識されなかった。

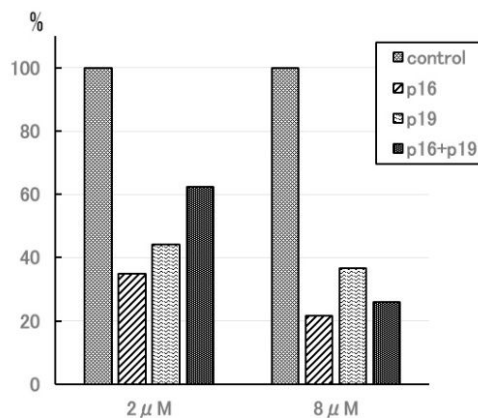


Fig.1 WST-8 assay for MB49 after peptide transduction

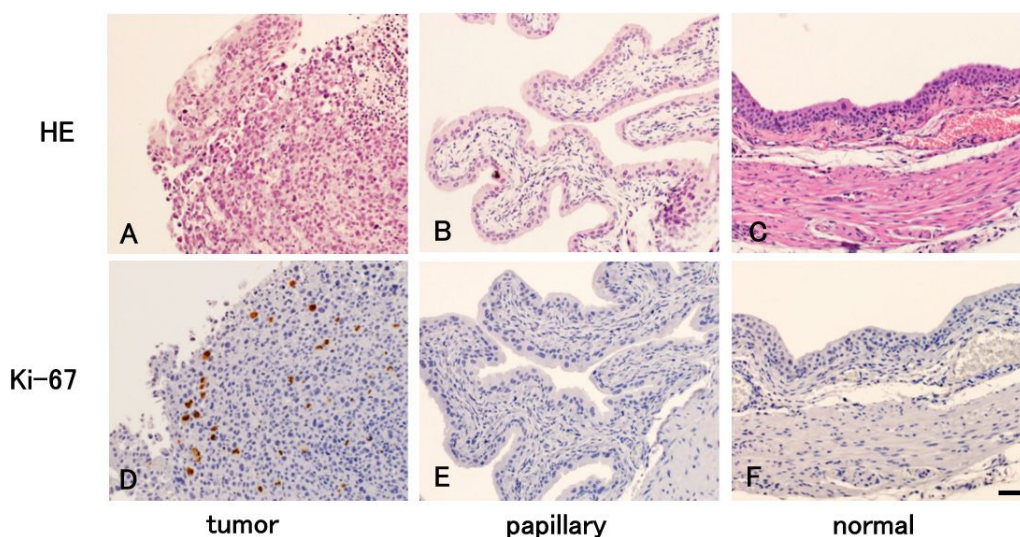


Fig.2 Histological findings of bladder by HE and Ki67 immuno-staining after peptide transfer on bladder transplantation model in mice

Table 1. Histology and Ki-67 labelling index after bladder instillation of peptide in mice

Histology	Control (n=13)		P16 (n=13)		P19 (n=13)		p16+p19 (n=11)	
	%	Ki (%)	%	Ki (%)	%	Ki (%)	%	Ki (%)
Tumor	76.9	7.54	0	-	0	-	9.1	17.0
Papillary	7.7	0	76.9	0.2	61.5	0.25	81.8	0.44
Hyperplasia	7.7	0	15.4	1.0	0	-	0	-
Normal	7.7	0	7.7	0	38.4	0	9.1	0

Ki: Ki-67 labelling index

毒性の検討：マウスの体重変化は Fig. 4 のとおりで、対照群、ペプチド投与群で明かな差は認められなかった。血算、生化学検査の結果、早期毒性については有意な血液毒性や組織学的傷害は認められず、細胞分裂が盛んな骨髄の組織学的所見にも明かな差を認めなかった(Table 2, 3)。

考察：膀胱癌の発生、進展には p16-Rb リン酸化経路は重要な機序であるが、p53 の機能異常も重要であり、p53 のシグナルを制御し、p53 機能を回復させるとされるヒト p14 ペプチドが報告されており、基礎的検討で p16/p14 ペプチドの同時導入での効果が報告されている(Kondo E, et al. 2008)。今回これらの経路に異常と考えられるマウス p16 と p19 を欠損している膀胱癌の膀胱移植モデルを用いて、これらの分子の機能回復が腫瘍発生を抑制しうるかを検討した。P16 ペプチド、p19 ペプチドともに膀胱癌の発生は認められず、抑制効果があると考えられたが、単独で十分な効果が見られたため、両ペプチドの併用が相乗的效果を呈するかは明かではなかった。ペプチドを低用量で用いるなどの修飾が今後検討必要であろう。また腫瘍の発生は認められなかったが、乳頭状変化や上皮過形成が高頻度に見られ、この観点では p19 ペプチドの方がその頻度が低いことから、今後使用ペプチドの最適化・個別化を検討する必要があると思われる。

一方、毒性については全身投与でも短期的毒性、組織障害は認められず、p16 ペプチドの長期毒性は先行研究(Shimazui T, et al. 2019)で認めていなかったが、p19 ペプチドの長期毒性は今後検討の必要があると思われる。

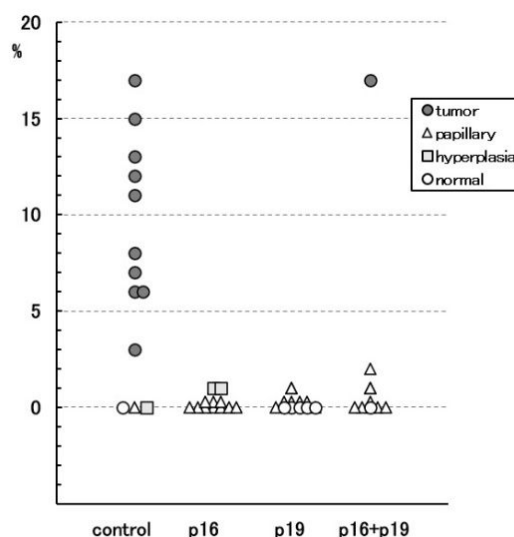


Fig. 3 Ki-67 labelling index of bladder lesions after peptide transduction in mice

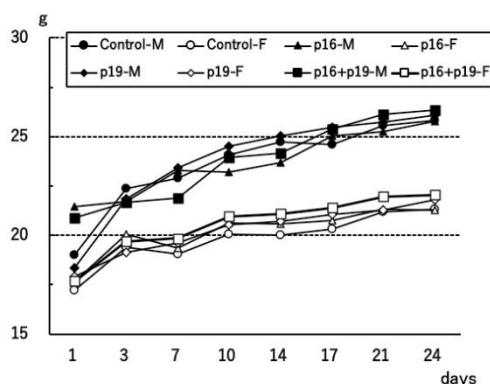


Fig. 4 Change in body weight after systemic peptide transduction

Table 2 Change in blood analyses after systemic administration of various peptides

	group	Alb	ALT	AST	Cre	WBC	RBC	Hb	plt
		g/dL	U/L	U/L	mg/dL	/ μ L	$10^4/\mu$ L	g/dL	$10^4/\mu$ L
Male	Cont	3.3	58.5	188	0.10	5,400	870	12.2	59.9
		0.0	33.2	55	0.1	420	40	0.78	19.7
	P16	3.1	27.0	81	0.10	9,400	992	14.2	92.9
	0.0	1.0	20	0.01	1470	14	0.15	12.0	
P19	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
	P16+p19	3.1	29.3	94.5	0.11	10,130	989	14.13	81.5
		0.26	11.6	40	0.01	910	26	0.53	11.4
		Female	Cont	3.35	27.5	126	0.12	4,200	921
0.07	4.9			5.7	0.01	1,130	52	0.85	0.0
P16	3.20		24.7	103	0.11	6,000	587	9.56	n.e.
0.26	4.2		25	0.01	1,680	58	0.78		
P19	3.3	20.0	110	0.11	3,800	956	13.7	68.2	
0.0	0.0	39	0.01	280	45	0.92	0.0		
P16+p19	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
p-value		N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Cont: control, Alb: albumin, Cre: creatinine, WBC: white blood cell count, RBC: red blood cell count, Hb: hemoglobin, plt: platelet, n.e.: not evaluated, N.S.: not significant

引用文献 :

Fahraeus R, Lain S, Ball KL and Lane DP: Characterization of the cyclindependent kinase inhibitory domain of the INK4 family as a model for a synthetic tumour suppressor molecule. *Oncogene* 1998; 16: 587–596.

Kondo E, Seto M, Yoshikawa K and Yoshino T: Highly efficient delivery of p16 antitumor peptide into aggressive leukemia/lymphoma cells using a novel transporter system. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 1623-1630.

Kondo E, Tanaka T, Miyake T, Ichikawa T, Hirai M, Adachi M, Yoshikawa K, Ichimura K, Ohara N, Moriwaki A, Date I, Ueda R and Yoshino T: Potent synergy of dual antitumor peptides for growth suppression of human glioblastoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1461-1471.

Le Frère-Belda MA, Gil Diez de Medina S, Daher A, Martin N, Albaud B, Heudes D, Abbou CC, Thiery JP, Zafrani ES, Radvanyi F and Chopin D: Profiles of the 2 INK4a gene products, p16 and p14ARF, in human reference urothelium and bladder carcinomas, according to pRb and p53 protein status. *Hum Pathol* 2004; 35:817-824.

Shaw NJ, Georgopoulos NT, Southgate J, Trejdosiewicz LK: Effects of loss of p53 and p16 function on life span and survival of human urothelial cells. *Int J Cancer* 2005; 116:634-639.

Shimazui T, Yoshikawa K, Kojima T, Nishiyama H, et al.: Systemic transduction of p16^{INK4A} antitumor peptide inhibits the growth of MBT-2 mouse bladder tumor cell line grafts. *Int J Oncol* 2013; 42:543-548.

Shimazui T, Yoshikawa K, Kojima T, Nishiyama H, et al.: Systemic transduction of p16^{INK4a} antitumor peptide inhibited lung metastases of MBT-2 bladder tumor cell line in mice. *Oncol Let* 2019; 17:1203-1210.

Wu Q, Possati L, Montesi M, Gualandi F, Rimessi P, Morelli C, TrabANELLI C and Barbanti-Brodano G: Growth arrest and suppression of tumorigenicity of bladder-carcinoma cell lines induced by the P16/CDKN2 (p16INK4A, MTS1) gene and other loci on human chromosome 9. *Int J Cancer* 1996; 65:840-846.

図の説明 :

Fig. 1: Cell proliferation of MB49 after peptide transduction is inhibited according to peptide concentration. Inhibition of p16 peptide seems stronger than p19 peptide, even than mixture of p16 with p19 peptide.

Fig. 2: Histological findings of the bladder shows that various epithelial changes were observed such as tumor (A), papillary epithelium (B), and normal urothelium (C) after intravesical instillation of peptide in bladder tumor implantation model in mice. Ki-67 immunohistochemistry revealed that cells in growth phase are very few in papillary (E), and normal epithelium (F) as compared with tumors (D). Bar in F: 50µm

Fig. 3: Ki-67 labelling index revealed that bladder tumors are frequently observed in control group, whereas not in peptide instillation groups. In peptide groups, papillary epithelium is frequent with low Ki-67 labelling. Note that no abnormal epithelial change is remarkable in p19 peptide group.

Fig. 4: Body weight of mice increase independently of peptide administration even compared with control group. M: male, F: female

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西山 博之 (Nishiyama Hiroyuki) (20324642)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究分担者	小島 崇宏 (Kojima Takahiro) (40626892)	愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍制御学分野・研究員 (83901)	
研究分担者	吉川 和宏 (Yoshikawa Kazuhiro) (60109759)	愛知医科大学・公私立大学の部局等・特務教授 (33920)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関