

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592031

研究課題名（和文） 膀胱癌に対する癌抑制性機能ペプチドによる膀胱注入療法の開発

研究課題名（英文） New strategy of intravesical instillation using anti-cancer peptide for bladder tumor

研究代表者

島居 徹 (SHIMAZUI TORU)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80235613

研究成果の概要（和文）：膀胱癌は p16 の異常が発癌や進展に関係するとされ、臨床的にも 70% の癌にその異常が認められると報告されている。本研究では、p16 とその制御系の異常を有する膀胱癌に対して、新しい導入用ペプチド Wr-T を用いた p16 機能性ペプチド導入療法の癌抑制効果を基礎的に検討した。細胞株の検討では、ヒトおよびマウス膀胱癌細胞において、p16 の異常とその制御分子 Rb のリン酸化を伴う癌において p16 ペプチド導入は癌の増殖を抑制した。またマウスの移植腫瘍モデルでは、マウスおよびヒト膀胱癌細胞株の皮下移植腫瘍に対し、p16 機能性ペプチドと Wr-T の局所および全身投与により腫瘍の成長抑制が認められた。P16 ペプチド投与例では、腫瘍内のリン酸化 Rb の発現は低下し、アポトーシスが誘導されていることが示唆された。今後、膀胱内への移植腫瘍モデルの確立が必要であるが、膀注による治療効果が期待できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：P16, which is a key molecule of bladder tumor (BT) development, inhibits the tumor growth through maintaining the retinoblastoma protein (Rb) in its hypophosphorylated state. In clinical samples, it is reported that abnormal p16 was observed in approximately 70% of human BT. In this study, we investigated whether or not new peptide transporter system using Wr-T with minimum inhibitory sequence peptide of p16 (p16-MIS) could inhibit growth of BT. *In vitro*, peptide transfer with p16-MIS successfully inhibit the human and mouse bladder tumor cell line with absent p16 and phosphorylated Rb. In the *in vivo* study, both local and systemic administration of p16-MIS using Wr-T system inhibited the growth of subcutaneous BT graft in mice. In histological examination, p16-MIS transfer decreased the Rb phosphorylation and induced the apoptosis. Although animal model for intravesical transplantation of BT should be established, peptide transporter with p16-MIS and Wr-T might become a possible new treatment strategy by intravesical instillation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌はその分子機構について比較的よく研究されている癌あり、RAS 癌遺伝子、p53 遺伝子、Retinoblastoma(Rb)遺伝子などの癌抑制遺伝子やその制御分子、p15、p16、p21、p27、p19 の異常が発癌、進展に関わることが報告されている。染色体レベルの異常では、9 番、13 番、17 番の異常が頻繁に報告され、表在性膀胱癌から浸潤癌の解析で、染色体 9 番の異常は比較的早期の事象と考えられている。膀胱癌においては、p16(9 番染色体)は初期の遺伝子変化として報告(Cancer Res 1994;54:784)され、表在性膀胱癌では p16 の発現異常が約 70%に認められるという報告がある(Eur Urol 2005;47:463)。また p53(17 番染色体)は浸潤癌における遺伝子変化として報告(Cancer Res 1994;54:784)され、上皮内癌でも高率に変異が認められている。

表在性膀胱癌の治療は、経尿道的切除とその後の高頻度にみられる膀胱内再発、10%程度に認められる浸潤癌への進展の防止であるが、膀胱内再発の予防方法としては、抗がん剤あるいは BCG の膀胱注入が確立された治療法であるが、その両者に抵抗性の再発や、副作用(特に BCG)により治療を完遂できず、管理に苦慮する症例があり、新たな治療戦略の開発が必要と考えられる。

我々はこれまで、泌尿器癌の網羅的遺伝子解析(マイクロアレイ、SNP アレイ解析など)、臨床病理学的解析により、膀胱癌、腎癌等の遺伝子発現解析を行い、発癌進展に伴う遺伝子変化とそれらの指標となる遺伝子異常、遺伝子発現の異常、ペプチド導入による増殖抑制について解析してきた。その結果、膀胱癌で発癌初期の異常として頻度の高い p16 の異常(Cancer Res 1994;54:784)を *in vitro* の系や動物発癌モデルにて解析し、その p16 分子の機能性ペプチド(r9-p16 Minimal Inhibitory sequence (MIS) (Oncogene 1998;16:587))導入が膀胱癌の増殖を抑制していることを見いだした。そこで、今回この p16 と共に p21、p53 分子の機能性ペプチドを過去の報告あるいは新規にデザイン(Oncogene 1998;16:587, PNAS 2003;100:13303, Current Biol 1996;7:71, Mol Cell Biol 1996;16:4673)し、膀胱癌の新規治療方法を開発するためこれらの機能性ペプチドの膀胱発癌モデルにおける発癌抑制効果、治療効果

の基礎的検討を計画した。

なお、このペプチド導入はトランスポーターペプチド(Wr-T)システム(Mol Cancer Ther 2004;3:1623)を使用する。これは、ペプチド・蛋白分子の結合に機能するアミノ酸領域と PTD(protein transduction domain)を連結した計 30 個のアミノ酸より成る新しいペプチド導入システムで、導入効率が良く、ペプチドの種類に依存しないことなどから応用性の高い方法である。

2. 研究の目的

ヒト膀胱癌細胞株における p16、p21 の発現異常、変異などを明らかにした上で、*in vitro*での p16 ペプチド導入による導入効率、導入前後の Rb リン酸化など各分子の発現の変化、細胞増殖への抑制効果、細胞死への誘導の有無を検討し、ペプチド導入による効果の機序も検討する。これをさらにヌードマウスの皮下移植腫瘍、同所移植腫瘍モデルに対して局所投与、全身投与、膀胱内注入投与による *in vivo*での効果を検討する。

3. 研究の方法

細胞培養:ヒト膀胱癌細胞株 10 株、マウス膀胱癌細胞株(MBT-2)を 10%FCS 加 RPMI1640 培地にて培養した。各種のペプチド導入後の増殖能は WST-8 アッセイ(DOJINDO)にて評価した。

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) (Mol Cancer Ther 2004;3:1623)、FITC 標識 r9-p16 MIS ペプチドは BioGate(株) (山形)にて合成し、r9-p16 MIS はヒト型、マウス型は各々 FLDTLVVLHR、FLDTLVVLHG (Fahraeus, et al. Oncogene 1998)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。*In vitro*では最終濃度 Wr-T 5 μ M、p16 を 8 μ M とし、*in vivo*実験では各々 50nM、80nM とした。*in vitro*では直接培地に添加し、*in vivo*では、マウス皮下移植腫瘍が 3mm 径になった時点で心注あるいは局注にて投与した。

MBT-2 に対する機能性ペプチドの導入とその効率、増殖抑制効果は、Wr-T (2 μ M) の

存在化にマウス p16-FITC 標識ペプチド（濃度 2~8 μ M）を導入し、倒立蛍光顕微鏡下に導入の濃度依存性と効率、導入後の細胞増殖抑制率を WST-8 アッセイにて解析する。また p16 ペプチド導入後のリン酸化 Rb 発現の変化を western blot にて検討する。

RT-PCR : total RNA を各細胞から TRIzol 法 (Life technologie) で抽出し、cDNA を合成、PCR を施行した。PCR プライマーは CDK4、CDK6、cyclin D に対するものとした。

ウェスタンブロット : 細胞は SDS バッファーに融解し、蛋白を抽出した。電気泳動後、背ボンド P 膜に転写し、各抗体 (抗 p16 抗体、抗 p21 抗体、抗 p27 抗体、抗 Rb 抗体、抗リン酸化 Rb 抗体) にてウェスタンブロットを施行した。

マウス腫瘍モデル :

- 1) マウス膀胱腫瘍皮下移植モデル : ①局所投与 : 4 週齢の Balb/c スードマウス 22 匹に対して、 2×10^6 個/0.1mL PBS の MBT-2 マウス膀胱癌細胞株を臀部皮下に移植した。腫瘍径 3mm の時点で、対照群 (PBS) (n=14)、Wr-T 単独群 (n=4)、p16+Wr-T 群 (n=4) に分類し、皮下腫瘍周囲への局所投与を行った。腫瘍の成長を観察し、16 日目に屠殺により腫瘍を摘出した。②全身投与 : 4 週齢の雌性 KSN スードマウス 50 匹にたいして、 2×10^6 個/0.1mL PBS の MBT-2 マウス膀胱癌細胞株を臀部皮下に移植した。マウスは対照群 (PBS)、Wr-T 単独群、p16 単独投与群、p16+Wr-T 単回投与群、p16+Wr-T 3 回投与群とした (各群 n=10)。腫瘍径が 3mm になった時点で、各群の投与を心注による全身投与で行った。全身投与は麻酔下に 23G 針で心注をおこなった。腫瘍の成長を群間で比較検討した。治療開始 28 日目に安楽死にて屠殺し、腫瘍を摘出し腫瘍における組織学的解析、各分子の発現の変化、細胞周期の変化、アポトーシス等について、免疫染色、TUNEL 染色等にて解析した。
- 2) ヒト膀胱腫瘍皮下移植モデル : 4 週齢の雌性 NOD-SCID マウスに前処置として抗アシアロ GM1 抗体 0.1mg を 2 回投与し、RT112 株ヒト膀胱癌細胞株 10×10^7 個/0.1mL PBS を臀部皮下に移植した。
- 3) マウス膀胱癌細胞株同所移植モデル : 8 週齢 C3H マウスに対し、 10^6 個/0.1mL の MBT-2 マウス膀胱癌細胞株を全身麻

酔下に膀胱注し、2 時間外尿道口を結紮し膀胱腫瘍の発生を観察する。前処置なし群、カテーテルによる膀胱粘膜損傷群、各々に Wr-T+マウス p16 ペプチド同時膀胱注群を設け、3 週間後の膀胱を安楽死の上、膀胱摘出し観察する。

免疫組織化学染色と TUNEL 染色 : 動物実験における腫瘍あるいは臓器組織を 10% 中性緩衝ホルマリンに O/N で固定、通常のパラフィン包埋の上、4mm 厚で薄切し、組織学的観察は HE 染色で行った。免疫染色は、各抗体を一次抗体とし、SAB 法について DAB で発色、各染色はヘマトキシリンで行った。各染色のスコア化は強拡大で 200 核計測を 5 視野で行った。またペプチド導入 48 時間後のアポトーシスを TUNEL 染色 (CHEMICON) で行った。

4. 研究成果

(1) ヒト膀胱癌細胞株における p16、リン酸化 Rb、および関連分子の発現

ヒト膀胱癌細胞株 10 株中、7 株において mRNA および蛋白レベルで p16 の欠損と Rb 蛋白のリン酸化が認められた (図 1)。P53 の下流分子である p21 と p27 は p16 欠損株のほとんどで発現しており、p16 が制御する

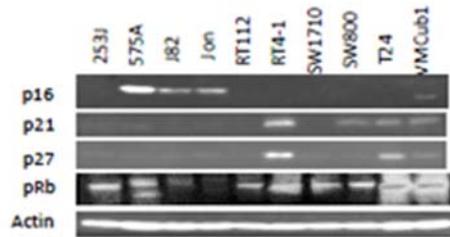


図1 ヒト膀胱癌細胞株のp16と細胞周期関連分子の発現

CDK4 と CDK6 の mRNA も全 10 株で発現が認

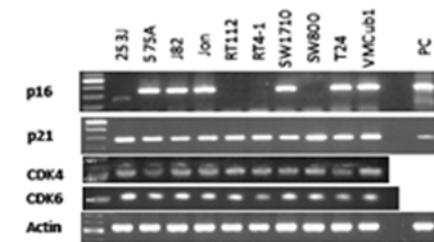


図2 ヒト膀胱癌細胞株のp16とその制御分子の発現

められた (図 2)。

(2) P16 機能性ペプチド (r9-p16-MIS) の導入による膀胱癌細胞株の増殖抑制

Wr-T トランスポーターペプチドにより p16 機能性ペプチドを細胞株に導入 (最終濃度: Wr-T

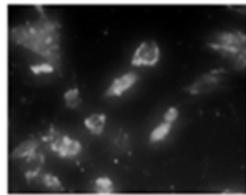


図3 ヒト膀胱癌細胞株のp16機能性ペプチドの導入

5 μ M, r9-p16-MIS 2-8 μ M)し、WST-8 アッセイにより増殖抑制を評価した(図 3)。10 株中 7 株で増殖抑制がみられ、4 株(253J、575A、RT4、SW1710)では 50%以上の抑制が認められた(図 4)。これらの細胞株では、p16 機能性ペプチド導入後、リン酸化 Rb の発現にも変化が認められた(図 5)。

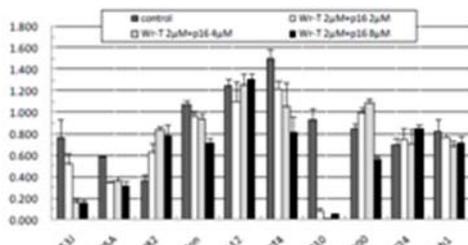


図4 ヒト膀胱癌細胞株のp16機能性ペプチド導入による増殖抑制

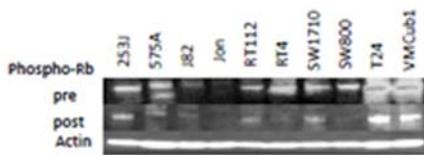


図5 ヒト膀胱癌細胞株へのp16機能性ペプチド導入とリン酸化Rb発現の変化

(3)Wr-T と p16 機能性ペプチドによる *in vivo* での膀胱癌細胞の抑制

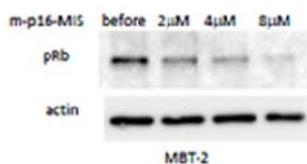
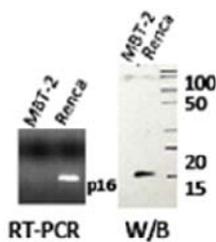


図6 マウス膀胱癌細胞株MBT-2のp16発現とp16機能性ペプチド導入によるRbリン酸化の変化

マウス膀胱癌細胞株 MBT-2 移植腫瘍に対するペプチド導入治療を行った。MBT-2 細胞株は

p16 を欠損し、マウス p16 機能性ペプチドの導入により Rb リン酸化は抑制された(図 6)。Balb/c ノードマウスの MBT-2 皮下移植腫瘍に対して、局所投与により治療実験を行ったところ、p16+Wr-T 治療群は対照群に対して腫瘍



対照(PBS) 治療群(p16+Wr-T)

図7 MBT-2皮下移植腫瘍に対する局所投与治療

増殖が抑制されており(図 7)、経時の変化においても、p16+Wr-T 単回および3 回治療群は PBS 対照群に比較し、有意に腫瘍の増殖を抑制した(図 8)。

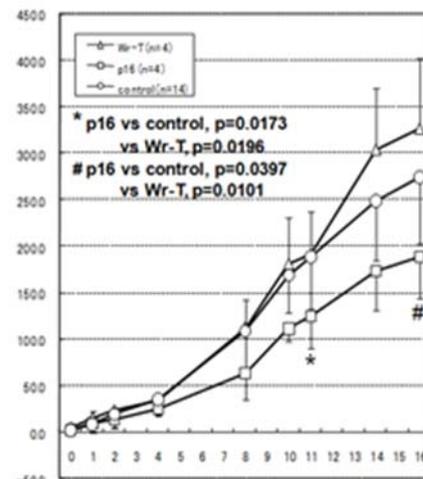


図8 MBT-2皮下移植腫瘍に対する局所投与治療による腫瘍の増殖

一方、KSN ノードマウスの皮下移植腫瘍に対して全身投与による治療実験を施行した。マウスの皮下に移植した MBT-2 腫瘍が径 3mm になった時点で、Wr-T とマウス p16 機能性ペプチドの混合液を心注により投与したところ、有意な腫瘍サイズの減少が認められた(図 9、10)。

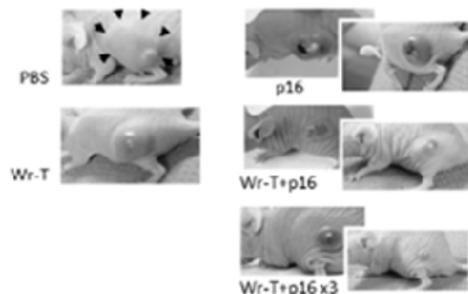


図9 MBT-2皮下移植腫瘍に対する全身投与治療

投与 72 時間後の腫瘍のリン酸化 Rb の発現を免疫組織化学染色で検討したところ、減少がみられた(図 11)。また TUNEL 染色ではアポトーシスの増加が認められた(図 11)。

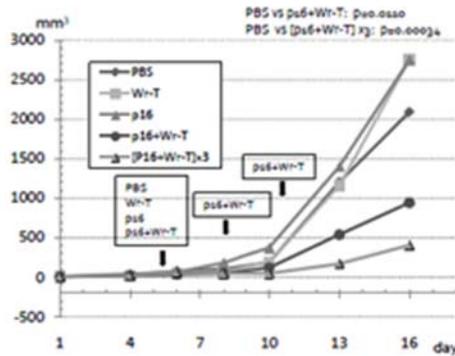


図 10 MBT-2 皮下移植腫瘍に対する全身投与と治療による腫瘍の増殖

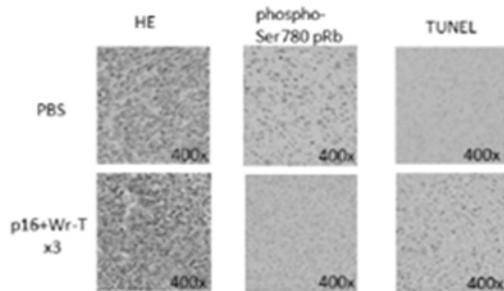


図 11 MBT-2 皮下移植腫瘍に対する全身治療後の HE、リン酸化 Rb の発現と TUNEL 染色

(4) ヒト膀胱癌細胞株 RT112 のマウス移植腫瘍に対する p16 機能性ペプチド導入

p16 欠損ヒト膀胱癌株 RT112 10^7 個($100\mu\text{L}$ 中)を高アシアロ GM1 抗体(0.1mg)で 2 回接種で前処置した 4 週齢の雌性 NOD-SCID マウス 30 匹の臀部皮下に接種し、ヒト膀胱癌移植腫瘍を作成した。治療は各群 10 匹とし、①PBS 対照群、②ヒト p16 ペプチド単独群、③ヒト p16 ペプチド+トランスポーターペプチド Wr-T 群において腫瘍径が 3mm になった時点で局所治療を行った。経時的に径を計測し、ペプチド投与 4 週間目に安楽死の上、腫瘍を摘出した。

治療群の腫瘍の増殖は対照群に比較して有意に抑制され、21 日目の時点で対照群 611mm^3 に対し、②群で 338mm^3 ($p=0.0009$)、③群で 237mm^3 ($p<0.0001$)であった。以上、ヒト p16 ペプチドはヒト膀胱癌移植腫瘍に対しても増殖抑制効果を示し、トランスポーターペプチド併用は治療効果を増強させることが示唆された(図 12)。

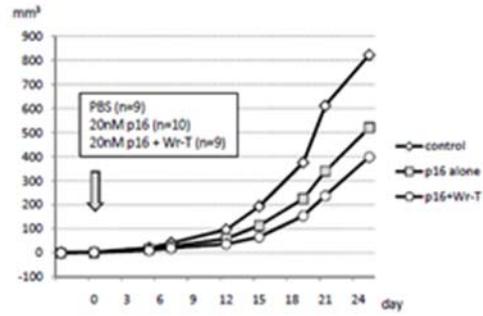


図 12 ヒト膀胱癌細胞株のマウス皮下移植腫瘍に対する局所投与と治療による腫瘍の増殖

(5) p16 ペプチドの膀胱内移植腫瘍における膀胱注入による移植抑制効果の基礎検討

次に p16 ペプチドの膀胱内移植腫瘍における膀胱注入による移植抑制効果の基礎検討と治療を行った。マウス膀胱内移植腫瘍モデルとして、マウス膀胱癌細胞株 MBT-2 10^6 個/ $100\mu\text{L}$ を 40 匹の 7 週齢雌性 C3H マウスの膀胱に全身麻酔下に 24G 静脈留置針外套を用いて膀胱注射検討した。1 群 10 匹とし、A 対照群：前処理なし、B 群：膀胱に針による損傷を加え膀胱注、C・D 群：A・B 各群にマウス p16+Wr-T ペプチド同時注入群とした。3 週間後に安楽死の上、膀胱を摘出、観察した。

A 群・C 群・D 群には移植腫瘍はみられず、B 群の 3 匹に腫瘍形成がみられた。P16+Wr-T 投与群には膀胱腫瘍発生は認められなかったが、対照群の移植率が低いため移植抑制効果を言及することは難しい結果であった。

今後、対照群の移植率を向上させる膀胱移植モデルとして、膀胱粘膜の電気メス焼灼による移植前処置(Horiguchi Y, et al. Human Cell 2008;21:57)が 100% の移植率とされ有用な方法と考えられた。

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 6 件) (全て査読有)

1. Zennami K, Shimazui T, et al. A new molecular targeted therapeutic approach for renal cell carcinoma with a p16 functional peptide using a novel transporter system. Oncol Rep 2011; 26:327-333.

2. Miyazaki J, Shimazui T, et al. The liposome-incorporating cell wall skeleton of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin can directly enhance the susceptibility of cancer cells to

lymphokine-activated killer cells through up-regulation of natural-killer group 2, member D ligands. BJU int 2011; 108:1520-1526.

3. Takaoka E, Shimazui T, et al. Pattern of intravesical recurrence after surgical treatment for urothelial cancer of the upper urinary tract: a single institutional retrospective long-term follow-up study. Int J Urol 2010; 17:623-628.

4. Kojima T, Shimazui T, et al. FOXO1 and TCF7L2 genes involved in metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. Genes Chromosomes Cancer 2010; 49:379-389.

5. Shimazui T, et al. Low expression of microphthalmia-associated transcription factor, a potential molecular target for interferon-alpha susceptibility, is associated with metastasis in renal cell carcinoma. Cancer Sci 2009; 100:1714-1718.

6. Iida K, Shimazui T, et al. Suppression of AhR signaling pathway is associated with the down-regulation of UDP-glucuronosyltransferases during BBN-induced urinary bladder carcinogenesis in mice. J Biochem 2009; 147:379-389.

[学会発表] (計 4 件)

1. Shimazui T, et al. Systemic transduction of p16^{INK4A} anti-tumor peptide inhibits growth of MBT-2 bladder tumor cell line graft in mice. Annual Meeting of American Urological Association 2011, 2011 年 5 月 16 日 Washington DC

2. Shimazui T, et al. Systemic transduction of p16^{INK4A} anti-tumor peptide inhibits growth of MBT-2 bladder tumor cell line graft in mice. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 24 日京都

3. 全並賢二、島居 徹、他. 機能性ペプチド導入による腎細胞癌に対する新しい分子標的治療. 第 98 回日本泌尿器科学会総会 2010 年 4 月 28 日盛岡

4. Zennami K, Shimazui T, et al. New approach for the treatment of renal cancers

using p16 anti-tumor peptide. 第 68 回日本癌学会総会 2009 年 10 月 2 日 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島居 徹 (SHIMAZUI TORU)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：80235613

(2) 研究分担者

内田 和彦 (UCHIDA KAZUHIKO)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：90211078

(3) 連携研究者

吉川 和宏 (YOSHIKAWA KAZUHIRO)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60109759