

機関番号：14501
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791502
 研究課題名 (和文) 膀胱癌進展の分子機構における Aurora-A の役割の解明および新規治療の開発
 研究課題名 (英文) Inhibition of tumor growth and sensitization to chemotherapy by RNA interference targeting Aurora-A in the human bladder cancer KoTCC1 model.
 研究代表者 酒井 伊織 (SAKAI IORI)
 神戸大学・医学部附属病院 医員
 研究者番号：20533772

研究成果の概要 (和文)：Aurora-A は細胞分裂期に発現し、中心体の成熟・分離、双極性紡錘体の形成、G2 期から M 期への進入、染色体の赤道面への整列など、分裂期の中心体機能を司っているキナーゼである。さらに Aurora-A の過剰発現と癌化との関連性が明らかになりつつあり、Aurora-A は癌遺伝子としての機能を有する可能性が強く示唆されてきた。我々が作製した Aurora-A に対する siRNA (Aurora-A/siRNA) を含むプラスミドをヒト膀胱癌細胞株にリポフェクトアミン法にてトランスフェクションを行い、それぞれについて Aurora-A/siRNA プラスミド導入細胞株と control/siRNA プラスミド導入細胞株を樹立した。なお、膀胱癌細胞株としては、我々の予備実験で Aurora-A 高発現株であることが確認された KoTCC-1 を用いた。プラスミド導入の有無は細胞より RNA 及び蛋白を抽出し、real time RT-PCR 法と Western Blotting 法にて確認した。樹立された Aurora-A/siRNA 及び control/siRNA プラスミド導入細胞株を同条件下で培養し、経時的な細胞増殖能を MTT assay により比較検討した結果、いずれの膀胱癌細胞株においても Scramble/siRNA プラスミド導入細胞株に比して Aurora-A/siRNA 導入細胞株で有意に細胞増殖が抑制された。また、各種治療刺激に対する Aurora-A/siRNA 及び control/siRNA プラスミド導入細胞株の感受性の違いを MTT assay を用いて評価したところ、Aurora-A/siRNA 導入細胞株では control/siRNA プラスミド導入細胞株に比して docetaxel および sunitinib に対する感受性が亢進した。siRNA を用いた Aurora-A 発現抑制は膀胱癌に対して有効な治療法となる可能性が示唆された。siRNA の臨床応用においては、現在、生体内での標的細胞へのデリバリーが問題となっているが、膀胱内注入療法が標準的な治療法である表在性膀胱癌においては、比較的容易に標的細胞に導入可能なことが期待され、docetaxel や sunitinib との併用療法の効果も期待される。

研究成果の概要 (英文)： **OBJECTIVES:**To investigate the inhibitory effects of Aurora-A expression in bladder cancer cells on their growth and chemosensitivity. **METHODS:**Aurora-A expression in several human bladder cancer cell lines were evaluated by real time RT-PCR. We then established KoTCC1 cells in which the expression vector containing short-hairpin RNA (shRNA) targeting Aurora-A was introduced (KoTCC1/Aurora). The growth and the sensitivity to several therapeutic agents in KoTCC1/Aurora were compared with those in KoTCC1 transfected with control vector alone (KoTCC1/Co). Expression levels of both Aurora-A mRNA and protein in KoTCC1/Aurora were 20% of those in KoTCC1/Co. *In vitro* growth of KoTCC1/Aurora was significantly worse than that of KoTCC1/Co. The 50% inhibitory concentration of docetaxel and sunitinib in KoTCC1/Aurora decreased compared with that in KoTCC1/Co. **CONCLUSIONS:**The suppression of Aurora-A using shRNA could be a useful therapeutic strategy against bladder cancer, through growth inhibition as well as enhanced chemosensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

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：Aurora-A, siRNA, 膀胱癌, 抗がん剤感受性

1. 研究開始当初の背景

癌は点突然変異、遺伝子増幅などの異常が細胞周期関連遺伝子に起こった結果、細胞増殖を正常に制御できなくなり無秩序に増殖が亢進した状態であると捉えることが出来る。事実、大多数の癌細胞において、染色体数の異常や中心体数の異常な増加が認められており、細胞分裂過程に破綻が生じていることが報告されている(Jallepalli PV et al. *Nat Rev Cancer*. 2001;1: 109-17., Albertson DG et al. *Nat Genet*. 2003;34: 369-76.)。そのため、どのような細胞分裂関連分子の異常が腫瘍細胞内において高頻度に生じているかを解析し、それを標的とした治療を考案することで、新たな分子標的治療の開発に繋がる可能性があるものと考えられる。近年、細胞内でのさまざまな反応が分子レベルで解明されつつあるが、細胞分裂期に観察されるダイナミックな形態変化は、分裂期にその触媒活性がピークをむかえる分裂期キナーゼを中心として遂行されることが明らかになってきた。同定された分裂期キナーゼとして、サイクリン依存性キナーゼ 1, Aurora キナーゼ, Polo キナーゼおよび NIMA キナーゼなどがあるが、なかでも Aurora キナーゼは真核生物において生物種を超えて高度に保存された構造および機能を有し、細胞分裂期のさまざまなイベントを制御し中心的な役割を果たすキナーゼである。ヒトおよびマウスでは現在、Aurora-A, B, C の 3 種類の Aurora キナーゼが同定されており、それらは C-末端に相同性の高いセリン/スレオニンキナーゼ領域と、相同性のほとんどない N-末端部分から構成されている(Kimura M et al. *J Biol Chem*. 1997;272: 13766-71., Kimura M et al. *Cytogenet Cell Genet*. 1998;82: 147-52., Kimura M et al. *J Biol Chem*. 1999;274: 7334-40., Terada Y et al. *EMBO J*. 1998;17: 667-76.)。Aurora-A は細胞分

裂期に発現し、中心体の成熟・分離、双極性紡錘体の形成、G2 期から M 期への進入、染色体の赤道面への整列など、分裂期の中心体機能を司っている(Kimura M et al. *J Biol Chem*. 1997;272: 13766-71., Hirota T et al. *Cell*. 2003;114: 585-98.)。Aurora-B は細胞分裂中期までは動原体、細胞分裂期には中央体に局在することなどから、染色体の赤道面への整列、染色体分離、細胞質分離など、染色体分配と細胞分裂に関与すると考えられている(Terada Y et al. *EMBO J*. 1998;17: 667-76., Hauf S et al. *J Cell Biol*. 2003;161: 281-94.)。Aurora-C は精巣に高発現しているのが特徴的であり、細胞質分裂に関与していると考えられている (Kimura M et al. *J Biol Chem*. 1999;274: 7334-40., Li X et al. *J Biol Chem*. 2004;279: 47201-11.)。これらは、ヒト癌由来の培養細胞に高頻度で過剰発現が観察されており、Aurora-A, Aurora-B については癌との関連性が既に報告されており、癌細胞における両キナーゼの発現の意義が解析されつつあるが、Aurora-C の癌との関連は現在不明である。Aurora-A 遺伝子はヒト染色体 20q13.31 に存在するが、この部位は乳癌、大腸癌、卵巣癌および膵臓癌など種々の癌で遺伝子増幅のみられる領域として知られており、これらの癌における Aurora-A 遺伝子の増幅や mRNA 量および蛋白量の増加が報告されている(Zhou H et al. *Nat Genet*. 1998;20: 189-93., Bischoff JR et al. *EMBO J*. 1998;17: 3052-65., Tanaka M et al. *J Biol Chem*. 2002;277: 10719-26., Gritsko TM et al. *Clin Cancer Res*. 2003;9: 1420-6.)。また、Aurora-A をげっ歯類培養線維芽細胞に過剰発現させると、細胞増殖を起し形質転換により腫瘍を形成する報告や(Bischoff JR et al. *EMBO J*. 1998;17: 3052-65.)、Aurora-A の過剰発現により、中心体数の増加と異

数体形成が引き起こされる報告(Zhou H et al. Nat Genet. 1998;20: 189-93.)、さらにはAurora-Aと癌抑制遺伝子が相互作用を有していること等が報告され(Fu J et al. Mol Cancer Res. 2007;5: 1-10.)、Aurora-Aの過剰発現と癌化との関連性が明らかになりつつある。これらの結果からAurora-Aは癌遺伝子としての機能を有する可能性が強く示唆されてきた。最近ではAurora-A阻害剤であるVX-680を用いた、in vivoでの腫瘍増殖抑制の報告や(Keen N et al. Nat Rev Cancer. 2004;4: 927-36.)、Aurora-Aに対するアンチセンスオリゴ等の核酸医薬技術を用いたヒト癌細胞株での腫瘍増殖抑制の報告などから(Hata T et al. Cancer Res. 2005;65: 2899-905.)、Aurora-A機能の阻害による癌治療の応用への可能性も試みられている。我々の研究室においても、腎細胞癌および前立腺癌の臨床サンプルを用いて、Aurora-Aの発現レベルと各種臨床病理学的パラメーターとの関係を解析した結果、大多数の腎細胞癌および前立腺癌標本においてAurora-Aの発現を認め、いずれの癌種においても、Aurora-Aの発現レベルと癌の生物学的悪性度が密接に相関し、Aurora-Aが腎細胞癌および前立腺癌の進展に重要な役割を果たしている可能性を示唆する所見を報告してきた(Miyake H et al. Urol Oncol. in press, Furukawa J et al. BJU Int. 2007;100:310-4., Kurahashi T et al. Urol Oncol. 2007;25:128-33.)。また、膀胱癌についても同様に臨床サンプルを用いてAurora-A発現が膀胱癌の浸潤および再発に重要な役割を果たしている可能性を示唆する報告がなされている(Comperat E et al. Urology. 2008 ;72: 873-7., Comperat E et al. Virchows Arch. 2007 ;450: 419-24.)。

2. 研究の目的

本研究では、膀胱癌細胞でのAurora-A発現が癌細胞の悪性形質に与える影響を解析し、Aurora-A発現を抑制することによる治療的意義を検討することにより、Aurora-Aを標的とした新たな治療法を

開発することを目的とする。

3. 研究の方法

膀胱癌細胞株へのAurora-Aを標的にしたsiRNA発現プラスミドの導入

ヒト膀胱癌細胞株としては、我々の予備実験でAurora-A高発現株であることが確認されたKoTCC-1を用いた。

我々が作製したAurora-Aに対するsiRNA (Aurora-A/siRNA)を含むプラスミドを大腸菌にトランスフォーメーションし、そこからAurora-A/siRNAプラスミドDNAを大量に抽出する。また同時に対照としてスクランブル配列を有するsiRNA (control/siRNA)を含むプラスミドもトランスフォーメーションを行い、control/siRNAプラスミドDNAを抽出する。次に、抽出したプラスミドDNAをヒト膀胱癌細胞株にリポフェクトアミン法にてトランスフェクションを行い、それぞれについてAurora-A/siRNAプラスミド導入細胞株(KoTCC1/Aurora)とcontrol/siRNAプラスミド導入細胞株(KoTCC1/control)を樹立した。プラスミド導入の有無は培養細胞よりRNA及び蛋白を抽出し、real time RT-PCR法とWestern Blottingにて、Aurora-A発現レベルを評価することにより確認した。

Aurora-A発現阻害が膀胱癌細胞株の悪性形質に与える影響

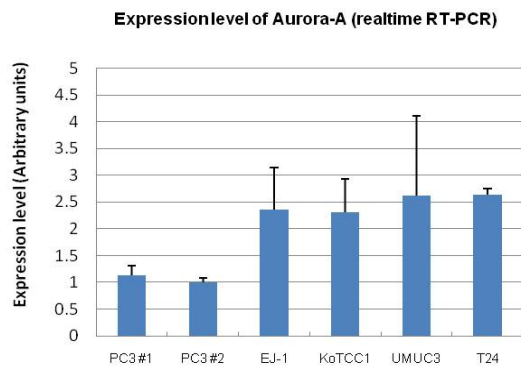
樹立されたAurora-A/siRNA及びcontrol/siRNAプラスミド導入細胞株を同条件下で培養し、経時的な細胞増殖能をMTT assayにより比較検討した。膀胱癌細胞株におけるAurora-A発現阻害と各種治療刺激に対する感受性との関係

各種治療刺激に対するAurora-A/siRNA及びcontrol/siRNAプラスミド導入細胞株の感受性の違いをMTT assayにて評価した。用いる治療刺激としては各種抗癌剤および分子標的治療薬(cisplatin, docetaxel, gemcitabin, sunitinib, everolimus, bortezomib)を選択した。

4. 研究成果

①

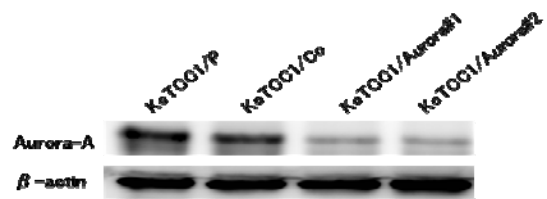
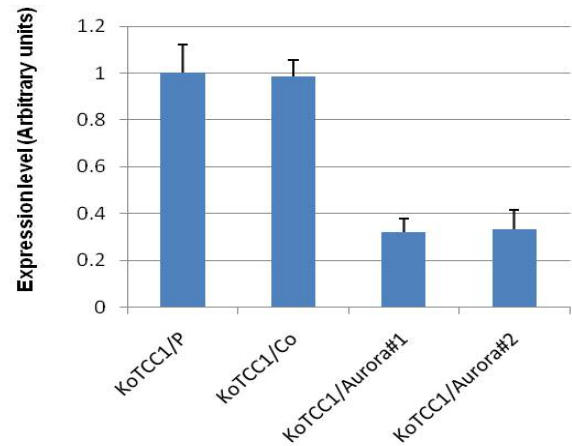
我々が作製した Aurora-A に対する siRNA (Aurora-A/siRNA) を含むプラスミドをヒト膀胱癌細胞株にリポフェクトアミン法にてトランスフェクションを行い、それぞれについて Aurora-A/siRNA プラスミド導入細胞株と control/siRNA プラスミド導入細胞株を樹立した。なお、膀胱癌細胞株としては、我々の予備実験で Aurora-A 高発現株であることが確認された KoTCC-1 を用いた。



②

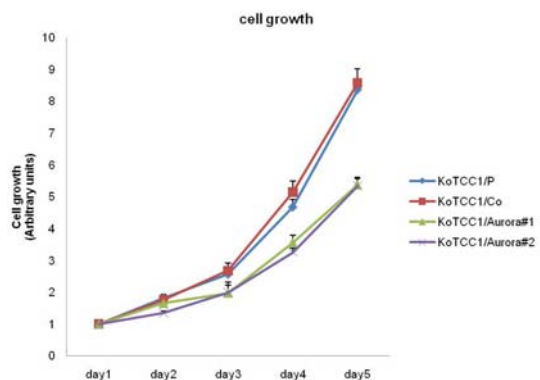
プラスミド導入の有無は細胞より mRNA 及び蛋白を抽出し、real time RT-PCR 法と Western Blotting 法にて確認した。KoTCC1 親株およびコントロールベクター導入株に比し Aurora-A siRNA 導入株 (#1 および #2) では Aurora-A mRNA および蛋白発現が抑制されていることが確認された。

Expression level of Aurora-A (real time RT-PCR)



③

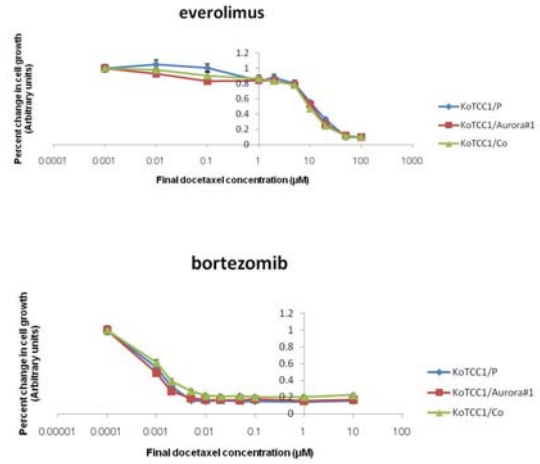
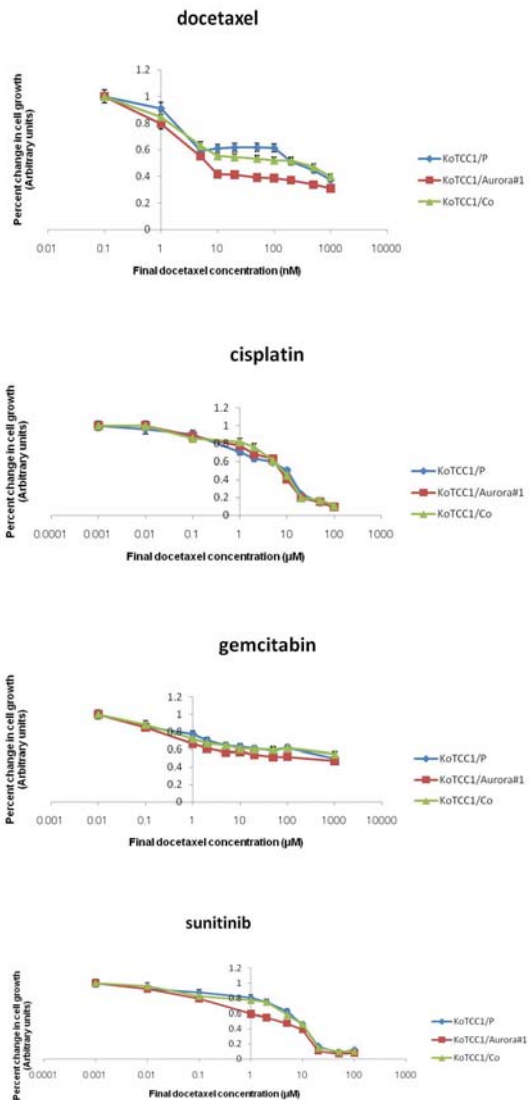
樹立された Aurora-A/siRNA 及び control/siRNA プラスミド導入ヒト膀胱癌細胞株 KoTCC1 を同条件下で培養し、経時的な細胞増殖能を MTT assay により比較検討した結果、親株および control/siRNA プラスミド導入細胞株に比して Aurora-A/siRNA 導入細胞株で有意に細胞増殖が抑制された。



以降の実験においては KoTCC1 親株 (KoTCC1/P)、control vector 導入株 (KoTCC1/Co) および Aurora-A siRNA 導入株 #1 (KoTCC1/Aurora#1) の 3 株を用いてその各種薬剤に対する感受性の比較検討を行った。

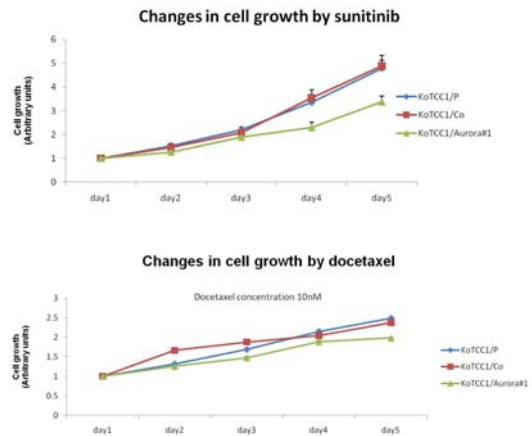
④

各種治療刺激に対する Aurora-A/siRNA 及び control/siRNA プラスミド導入細胞株の感受性の違いを MTT assay を用いて評価したところ、Aurora-A/siRNA 導入細胞株では親株および control/siRNA プラスミド導入細胞株に比して docetaxel および sunitinib に対する感受性が亢進した。一方で cisplatin、gemcitabin、everolimus、bortezomib に対する感受性に変化を認めなかった。



⑤

親株、樹立された Aurora-A/siRNA 及び control/siRNA プラスミド導入ヒト膀胱癌細胞株 KoTCC1 を sunitinib (10 µM) および docetaxel (5nM) を含む培地で培養し、経時的な細胞増殖能を MTT assay により比較検討した。両薬剤の存在下では、親株および control/siRNA プラスミド導入細胞株に比し Aurora-A/siRNA 導入細胞株で有意に細胞増殖が抑制された。



siRNA を用いた Aurora-A 発現抑制は膀胱癌に対して有効な治療法となる可能性が示唆された。siRNA の臨床応用においては、現在、生体内での標的細胞へのデリバリーが問題となっているが、膀胱内注入療法が標準的な治療法である表在性膀胱癌においては、比較的容易に標的細胞に導入可能なことが期待され、docetaxel や sunitinib との併用療法の効果も期待される。

今後 in vivo においても癌細胞の皮下移植モデルのみならず、同所移植モデル(Miyake H et al. Clin Cancer Res. 1999;5:2824-9. Miyake H et al. J Urol. 2004;171:2477-2481., Muramaki M et al. Int J Oncol. 2005;26:623-8.)も含めて解析を行う予定である。更に、Aurora-A に対する分子標的治療の確立を目指す、その手段としては、我々の研究室が豊富な経験を有するアンチセンスオリゴの使用 (Miyake H et al. J Cell Biochem. 2000;77:396-408., Miyake H et al. Neoplasia. 2005;7:171-9.)を想定しており、Aurora-A に対するアンチセンスオリゴ単独療法および前述の各種治療法との併用療法の効果を併せて検討する予定である。

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 4 件)

#1

Inhibition of tumor growth and sensitization to chemotherapy by RNA interference targeting interleukin-6 in the androgen-independent human prostate cancer PC3 model.

Sakai I, Miyake H, Terakawa T, Fujisawa M.
Cancer Sci. 2011 Apr;102(4):769-75.

#2

Assessment of long-term quality of life in patients with orthotopic neobladder followed for more than 5 years.

Takenaka A, Hara I, Soga H, Sakai I, Terakawa T, Muramaki M, Miyake H, Tanaka K, Fujisawa M.

Int Urol Nephrol. 2010 Oct 30

#3

Expression profile of E-cadherin and N-cadherin in non-muscle-invasive bladder cancer as a novel predictor of intravesical recurrence following transurethral resection.

Muramaki M, Miyake H, Terakawa T, Kumano M, Sakai I, Fujisawa M.

Urol Oncol. 2010 May 5.

#4

Analysis of factors predicting intravesical recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder without concomitant carcinoma in situ.

Sakai I, Miyake H, Harada K, Hara I, Inoue TA, Fujisawa M.

Int J Urol. 2006 Nov;13(11):1389-92.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 伊織 (SAKAI IORI)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20533772