

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 9 日現在

機関番号：14501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011 年度～2012 年度
 課題番号：23791755
 研究課題名（和文） 腎細胞癌における 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） Clarification the role of Aurora-A in renal cell carcinoma and development of novel treatment for it
 研究代表者 寺川智章（TERAKAWA TOMOAKI）
 神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
 研究者番号：50533759

研究成果の概要（和文）：

腎癌細胞の Aurora-A 発現抑制により、細胞の増殖能は低下し、さらに微小管重合阻害剤の一つである Docetaxel を併用することで、より効果的に腎癌細胞の増殖が抑制される可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The suppression of Aurora-A expression using shRNA is a useful therapeutic strategy against RCC 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
交付決定額	2,500,000	750,000	3,910,000

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：腎癌、Aurora-A

1. 研究開始当初の背景

近年の研究において、細胞分裂期に観察される形態の変化は、分裂期にその触媒活性がピークを迎える分裂期キナーゼを中心に遂行されていることが解明された。

そのなかでも Aurora キナーゼは、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、細胞分裂におけるさまざまなステップに関与する中心的なキナーゼである。

Aurora キナーゼは、現在まで Aurora-A、B、C の 3 種類の Aurora キナーゼが同定されている。3 種の中で、特に、Aurora-A は癌との関連性が報告されており、癌細胞における発現の意義が解析されつつある。

Aurora-A の遺伝子増幅が乳癌、大腸癌、卵巣癌、膀胱癌など種々の悪性腫瘍において検出されており、また、Aurora-A の mRNA とタンパク質の過剰発現も種々の癌で報告されている。

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引き起こし、形質転換により腫瘍を形成する報告や、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. 198;20: 189-93.)、さらには、Aurora-A と癌抑制遺伝子が相互作用している可能性が報告され (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されつつある。

最近では、Aurora-A の阻害薬である VX-680 を用いた、in vitro での腫瘍抑制効果の報告 (Guan Z et al. Cancer Res. 2007;67: 10436-44., Wan X et al. Carcinogenesis 2008;29: 1930-37.)、in vivo での腫瘍増殖抑制の報告 (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 et al. Cancer Res. 2007;5:1420-6.)、Aurora-A を阻害することでの癌治療が試みられている。

我々は、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相関を解析したところ、両癌腫において Aurora-A の発現レベルは癌の悪性度と有意に相関し、Aurora-A が両癌腫で癌の進展に重要な役割を果たしている可能性を報告してきた (Furukawa J et al. BJU Int. 2007;100:310-4., Kurahashi T et al. Urol Oncol. 2007;25: 128-33)。

さらには、ヒト前立腺癌細胞株である PC3 細胞に対して、short interference RNA (siRNA) を用いて Aurora-A の発現を抑制することで、腫瘍の増殖能の低下および抗癌剤感受性が増すことを確認した (Kumano et al. BJU 2010;106:121-7.)。

今日まで Aurora-A と癌の進展について解明を試みる研究は比較的多数行われているが腎細胞癌を対象とした研究、特に治療標的としての可能性を検討した研究は行われていない。

腎細胞癌は外科的切除を除く既存の治療が無効である一方、進行症例に

対しては、従来はサイトカインを中心とした免疫療法が汎用されてきた。また、最近では、進行性の腎細胞癌に対して種々の新規分子標的薬の有効性が確認され、本邦でも汎用されるに至っている。

しかしながら、それらの治療で長期にわたり完解を得ることは困難であるのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト腎癌細胞での 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での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の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腎癌細胞株への Aurora-A を標的にした siRNA 発現プラスミドの導入

ヒト腎細胞癌株の中で AURORA-A を強発現する Caki-2 細胞を選択し、これに抽出した Aurora-A/siRNA プラスミド DNA をトランスフェクションし、AURORA-A/si-RNA 導入株

(Caki-2/si-A) を樹立した。またスクランブル配列を有する siRNA を導入したコントロール株である Scramble/siRNA プラスミド導入株 (Caki-2/Co) を樹立した。

(2) Aurora-A 発現阻害が腎癌細胞株の悪性形質に与える影響の解析

両細胞株の細胞周期をサイトメトリ一法で確認を行い、また、樹立された両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。さらに発現蛋白を Western Blotting にて検討した。

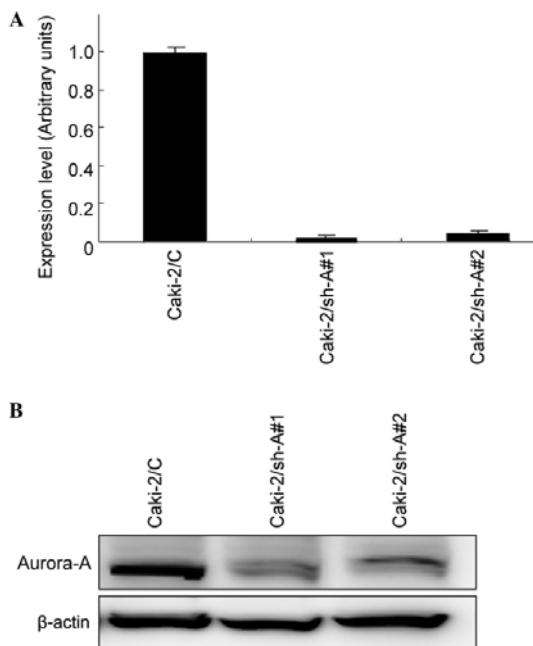
(3) 腎癌細胞株における Aurora-A 発現阻害と各種治療刺激に対する感受性との関係

各種治療刺激に対する両株の感受性の違いを評価するために、また、樹立された両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。さらに発現蛋白をWestern Blottingにて検討した。

4. 研究成果

(1) 腎癌細胞株へのAurora-Aを標的にしたsiRNA発現プラスミドの導入

ヒト腎細胞癌株の中でAURORA-Aを強発現してCaki-2細胞を選択し、これに抽出したAurora-A/siRNAプラスミドDNAをトランスフェクションし、AURORA-A/si-RNA導入株(Caki-2/si-A)を樹立した。また同時に対象としてスクランブル配列を有するsiRNAを導入したコントロール株であるScramble/siRNAプラスミド導入株(Caki-2/Co)を樹立した。これをReal time RT-PCR法およびWestern Blottingにて確認した。(図1)



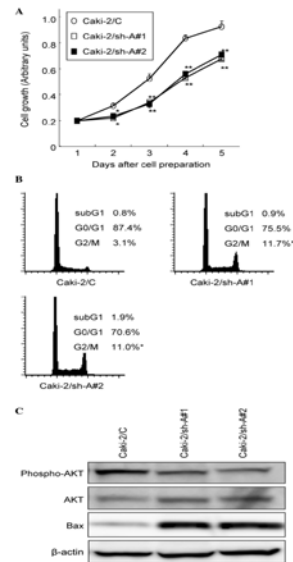
(図1)

(2) Aurora-A発現阻害が腎癌細胞株の悪性形質に与える影響の解析 (図2)

両細胞株の細胞周期をサイトメトリ

ー法で確認するとCaki-2/si-AはAURORA-A抑制によりG2/Marrestが生じていることが確認できた。

両細胞株の増殖能を比較検討したところ、Caki-2/si-AはCaki-2/Coに比しin vitroにおいて顕著に増殖能は抑制された。蛋白レベルでは、Western BlottingによりCaki-2/si-AはCaki-2/Coに比しAktのリン酸化が抑制され、癌抑制遺伝子であるBaxの発現が更新していた。



(図2)

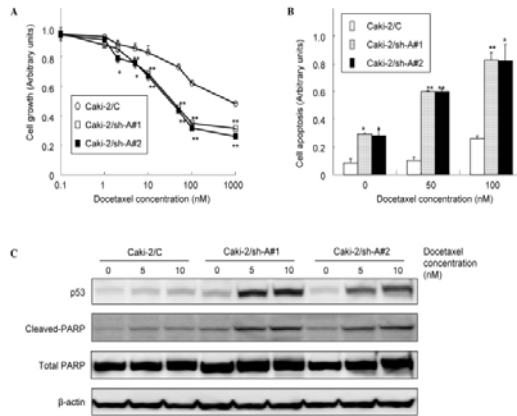
(3) 腎癌細胞株におけるAurora-A発現阻害と各種治療刺激に対する感受性との関係

各種抗癌剤による両株の感受性の違いを評価すると、Docetaxelはcisplatinやdoxorubicinを含む他の抗癌剤と比し最もCaki-2/si-Aの増殖を阻害し、Caki-2/si-AにおけるDocetaxelのIC50は、Caki-2/Coに比し96%低下した。Docetaxelによる増殖抑制は、濃度依存性に、また、経時的にCaki-2/si-AはCaki-2/Coに比し増殖が抑制された。

また、腎癌に対する新規分子標的治療薬であるsunitinib, sorafenibも投与したが両細胞株間で差を認めなかった。

Docetaxel投与後、Caki-2/si-Aでは、p53やcleaved PARPの発現が亢進していた。

(図3)



(図 3)

以上の結果から、腎癌細胞の Aurora-A 発現抑制により、細胞の増殖能は低下し、さらに微小管重合阻害剤の一つである Docetaxel を併用することで、より効果的に腎癌細胞の増殖が抑制される可能性が示唆された。

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 1 件)

Growth inhibition and enhanced chemosensitivity induced by down-regulation of Aurora-A in human renal cell carcinoma Caki-2 cells using short hairpin RNA. Terakawa T, Miyake H, Kumano M, Fujisawa M. *Oncology Letters*. 査読有 2011 Jul;2(4):713-717. Epub 2011 Apr 28.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺川智章 (TERAKAWA TOMOAKI)
 神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
 研究者番号：50533759