

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25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23800042

研究課題名（和文） 小胞体ストレスを標的とする前立腺がん治療戦略の構築

研究課題名（英文） Then mechanism of ER stress on the therapeutic strategy against Prostate cancer

研究代表者

谷本 竜太 (TANIMOTO RYUTA)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：60613164

研究成果の概要（和文）：

小胞体ストレス応答を惹起し、癌特異的アポトーシスを誘導しうるREIC遺伝子治療のさらなる臨床応用を見据え、既存のいくつかのBip/GRP78抑制化合物を用いて、*in vitro*におけるREIC遺伝子治療との相乗効果を検証し、REIC遺伝子治療の併用療法の意義を基礎的に解析することを目的とした。Bip/GRP78抑制化合物のなかでGRP78 inhibitorであるEpigallocatechin gallate, HSP90 inhibitorである17-AAGによるBip/GRP抑制効果とその至適濃度を検討したが、そのみで細胞がアポトーシスし、Ad-REICとの併用実験において、相乗効果を得る至適条件を見いだすことはできなかった。より特異的なBip抑制法を確立し、検討する必要があると思われた。

Ad-REICと小胞体ストレスにおけるメカニズムを解明する上で、Ad-REICに耐性である膀胱がん細胞株（T24, J82, TccSup）を用いて浮遊系培養条件におけるAd-REICの効果を検討したところ100MOIで有意なアポトーシスを認め、さらに1000MOIまで濃度依存的効果を認めた。また、多剤耐性膀胱がん耐性株（KK47/ADM）を用いて、アドリアマイシンとの相乗効果を検討したところ、Ad-REICはKK47/ADMにおいて低濃度アドリアマイシンに対する感受性を増強した。

ERストレス応答において、そのストレスセンサーとして考えられているIRE1 α 細胞質シグナル伝達ドメイン発現プラスミドを独自に作成し、それを前立腺がん細胞（PC3）にトランスフェクションすると、アポトーシスが誘導された。ERストレス関連分子を制御することにより、REIC遺伝子治療のさらなる治療効果を期待できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the synergistic effect of Bip/GRP78 inhibitors on the Ad-REIC treatment against prostate cancer. The optimal condition for the synergistic effect of Epigallocatechin gallate and 17-AAG to induce prostate cancer cells apoptosis under Ad-REIC treatment was not found, because these inhibitors induced apoptotic cell death by themselves. The new method to get more specific inhibition of Bip/GRP78 was needed.

On the other hand, we investigated the new strategy to overcome the resistance of Ad-REIC or chemotherapeutic drugs. Significant cell growth inhibition was observed when the resistant bladder cancer cells, T24 and J82, were treated with Ad-REIC in a condition of floating cells. The adriamycin-resistant KK47 bladder cancer cell line (KK47/ADM), which also presents multiple drug resistance, showed induction of apoptosis with Ad-REIC at 100 MOI. The Ad-REIC treatment also induced down-regulation of P-glycoprotein in KK47/ADM and restored the sensitivity to Adriamycin.

We originally constructed the plasmid vector that overexpressed the intracellular active

domain of IRE1, which was regarded as one of ER stress sensors. Transfection with these vectors into prostate cancer cell line PC3 induced apoptotic cell death. These results suggested manipulation of ER stress would enhance the Ad-REIC treatment against prostate cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：遺伝子治療、REIC

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は米国男性において最も罹患頻度の高い癌であり、癌関連死としては2番目に位置する疾病である。前立腺癌の治療法には、根治的前立腺摘出術、内分泌療法、放射線療法などがあり、比較的良好な治療成績が得られている。しかしながら、内分泌療法や化学療法耐性の前立腺がんでは予後不良な転機をたどり、これら治療抵抗性前立腺癌に対する新しい治療法の開発は臨床の場において喫緊の課題となっている。

最近の分子標的抗がん剤の開発研究において、がん特有の微小環境を治療の標的とした試みが活発に行われるようになってきている。固形がんの微小環境では、低酸素や低グルコースにより小胞体ストレス応答が誘導されることが知られており、がん細胞の増殖や薬剤耐性に及ぼす影響や、微小環境に対する適応応答の分子メカニズムが解明されてきている。特に、小胞体ストレス応答を標的とした抗がん剤は、腫瘍の抗がん剤耐性の改善を目指した効果的な治療薬として開発が期待される。

2. 研究の目的

岡山大学では以前より癌抑制遺伝子の研究においてアデノウイルスを用いて強制発現させるとアポトーシスが誘導されること(Cancer Res, 65:9617, 2005)より、新規の癌抑制遺伝子として報告した。また、REIC/Dkk-3の強制発現は局所の直接効果だけでなく、周囲の線維芽細胞を介して腫瘍増殖を抑え(J Biol Chem, 284:14236, 2009)、また、REIC/Dkk-3タンパクは全身における腫瘍免疫を増強することも確認した。(Int J Oncol, 34:657, 2009)さらに、REIC遺伝子発現アデノウイルス(Ad-REIC)によるがん選択的細胞死も、そのメカニズムは小胞体ストレスを標的としたものであると考えられる。(Int J Cancer, 126:1562, 2010)

本研究では、小胞体ストレス応答を惹起し、癌特異的アポトーシスを誘導しうるREIC遺伝子治療のさらなる臨床応用を見据え、既存のいくつかのBip/GRP78抑制化合物を用いて、*in vitro*、*in vivo*におけるREIC遺伝子治療との相乗効果を検証し、REIC遺伝子治療の併用療法の意義を基礎的に解析し、臨床応用を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

- 1 Bip/GRP78抑制化合物のスクリーニング
現在まで、Bip/GRP78を抑制する化合物はいくつか研究されている。具体的にはBip/GRP78を直接抑制するものとHSP90を抑制することにより間接的にBip/GRP78を抑制するものがある。
 - GRP78 inhibitor
(Versipelostatin, Epigallocatechin gallate, EGF-SubA)
 - HSP90 inhibitor (17-AAG, Alveospimycin, Retaspimycin, PU-H71, SNX-2112)
- 2 *In vitro* での腫瘍細胞の抑制効果
上記のBip/GRP78化合物の適正使用量を検討した上で、*in vitro*での抗腫瘍効果とREIC遺伝子治療との併用でのがん細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導効果を比較検討し、より相乗効果が期待できる化合物をスクリーニングする。
- 3 浮遊細胞におけるAd-REICの抑制効果
Ad-REICに耐性である膀胱がん細胞株 (T24, J82, TccSup) を用いて、接着系、浮遊系培養条件でAd-REICを感染させ、そのアポトーシス誘導効果をHoechst染色により比較検討する。また、濃度依存的増殖抑制効果をMTS assayで評価する。
- 4 Ad-REICのERストレスシグナルにおけるP糖タンパク質の関与
多抗がん剤耐性膀胱がん耐性株 (KK47/ADM) を用いてAd-REICの濃度依存的増殖抑制効果とその親株と比較検討するとともに、P糖タンパクの発現パターンをウエスタンブロットで評価する。

- 5 ERストレスセンサータンパクIRE1によるアポトーシス誘導効果

ERストレス応答において、そのストレスセンサーとして考えられているIRE1 α 細胞質キナーゼドメイン発現プラスミドを作成し、それを前立腺がん細胞 (PC3) にトランスフェクションし、アポトーシス誘導効果を検討する。

4. 研究成果

- 1 Bip/GRP78抑制化合物のスクリーニング
GRP78 inhibitor (Epigallocatechin gallate), HSP90 inhibitor (17-AAG)は入手可能であったが、その他の薬剤 (EGF-SubA, Versipelostatin, Alveospimycin, Retaspimycin, PU-H71, SNX-2112) については入手不可であった。
- 2 *In vitro* での腫瘍細胞の抑制効果
Epigallocatechin, 17-AAGともBip/GRP78を抑制する至適濃度では、そのみで細胞がアポトーシスし、Ad-REICとの併用実験において、相乗効果を得る至適条件を見いだすことはできなかった。いずれの薬剤もsiRNAのようなBiPに特異的な抑制化合物ではないため、間接的にアポトーシスを誘導している可能性がしきされる。併用実験を進めるためには、REICのベクターにBiPの抑制コンストラクトを組み込んだものを作成し、より特異的にBiPを抑制する必要があると思われた。
- 3 浮遊細胞におけるAd-REICの抑制効果
Ad-REICに耐性である膀胱がん細胞株 (T24, J82, TccSup) は接着系培養条件では、100MOIの濃度においても有意なアポトーシスを誘導しなかったが、浮遊系培養条件では100MOIで有意なアポトーシ

スを認め、さらに1000MOIまで濃度依存的効果を認めた。浮遊系培養条件においてBiP/GRP78の発現、またERストレス関連分子の発現パターンをさらに解析していく必要があるとおもわれる。

4 Ad-REICのERストレスシグナルにおけるP糖タンパク質の関与

多剤耐性膀胱がん耐性株

(KK47/ADM)にAd-REICを100MOIで感染させると親株と同様にアポトーシスを誘導した。また、アドリアマイシンとの併用実験においてAd-REICはKK47/ADMにおいて低濃度アドリアマイシンに対する感受性を増強した。ウエスタンブロットで確認したところ、Ad-REICがP糖タンパクの発現を抑制し、JNK抑制剤によりその発現を認めた。Ad-REICによるIRE1、JNKシグナルの活性化によりP糖タンパクを抑制することにより、多剤耐性株の抗がん剤感受性を回復することが明らかとなった。BiP/GRP78はIRE1と結合することによりその活性化を阻害しているが、BiPを特異的に抑制することにより抗がん剤の感受性を高める可能性が示唆された。現在、さらなるERストレス機序を解明中であり、今後、前立腺がん細胞においても応用する予定である。

5 ERストレスセンサータンパクIRE1によるアポトーシス誘導効果

ERストレス応答において、そのストレスセンサーとして考えられているIRE1 α 細胞質シグナル伝達ドメイン発現プラスミドを独自に作成した。それを前立腺がん細胞(PC3)にトランスフェクションすると、アポトーシスが誘導された。

IRE1は変性タンパクの存在下においてBiP/GRP78と乖離することによりポリマ

ーを形成し、活性化すると考えられているが、BiPに独立してIRE1を直接的に活性化することによりアポトーシス誘導することを明らかにした。

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2件)

- ① 谷本 竜太, BiP/GRP78の抑制によるREIC/Dkk-3 遺伝子治療抵抗性前立腺がんの感受性化、西日本泌尿器科、査読有、74巻10号、2012
- ② Takeshi Hirata, Masami Watanabe, Haruki Kaku, Yasuyuki Kobayashi, Hiroshi Yamada, Masakiyo Sakaguchi, Koji Takei, Nam-ho Huh, Yasutomo Nasu, Hiromi Kumon, REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer, International Journal of Oncology, 41: 559-564, 2012, 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① Hirata T., Watanabe M., Kaku H., Ebara S., Watanabe T., Nasu Y., Kumon H. REIC/Dkk-3 encoding adenoviral vector as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer, 第64回日本泌尿器科学会西日本総会、20121108~20121110, 徳島市, あわぎんホール
- ② Tanimoto R., Kobayashi Y., Sasaki K., Araki M., Ebara S., Uehara S., Watanabe T., Nasu Y., Kumon H. Predictors of early urinary continence after laparoscopic prostatectomy, 11th Asian Congress of Urology, 20120822 ~ 20120826, Pattaya, Thailand

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 竜太 (TANIMOTO RYUTA)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号: 60613164

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし