

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592375

研究課題名(和文) 泌尿器癌の転移抑制における p16 機能性ペプチド全身投与の効果と毒性の検討

研究課題名(英文) Efficacy and toxicity of systemic transduction of p16 antitumor peptide in inhibition of metastases of urological tumors

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：p16の機能異常は膀胱癌の進展に重要である。今回、マウス肺転移モデルにおいてp16ペプチド導入の転移抑制と毒性について検討した。6週齢の雌マウスにマウス膀胱癌細胞MBT-2を100,000個/100mL尾静注してマウス肺転移を作成し、P16ペプチドの単回、3回投与による肺転移抑制と毒性を検討した。肺転移は、対照群12/12例、単回群5/12例、3回群3/10例で、数、大きさともにペプチド群で有意に減少した。毒性は高容量ペプチド群で白血球増加が認められたが有意ではなく、他の血液異常、臓器の組織学的変化は認めなかった。以上、p16ペプチド全身投与は明かな毒性なくマウス膀胱癌の肺転移を抑制した。

研究成果の概要(英文)：P16 is a key molecule of bladder tumor (BT) development. Here, we evaluate the efficacy and toxicity of p16 peptide administration on mouse lung metastasis model for BT. Mouse lung metastases were developed by tail vein injection of MBT-2 cell line and single or triple times of p16 peptide were also injected (10 to 12 mice in each group). The toxicity was also evaluated after p16 peptide administration by blood test and histological examination. The lung metastases were observed in 100% (12/12), 41.7% (5/12), and 30% (3/10) in above three groups, respectively. Size and number of lung metastatic tumor were significantly different between control and treatment groups. In high dose peptide group, leukocytosis was observed but not statistically significant. No remarkable change was also observed histologically in bone marrow of treatment groups. In conclusion, Systemic p16 delivery could prevent lung tumor development on mouse BT metastatic model without severe adverse events.

研究分野：腫瘍学

キーワード：膀胱癌 p16 レチノブラストーマ ペプチド 細胞周期 分子標的 肺転移 毒性

1. 研究開始当初の背景

(1) 泌尿器癌は固形癌としては抗癌剤治療の有効例が多い癌であるが、転移を有する膀胱癌の根治は困難で、また腎細胞癌(以下腎癌)も主に血管新生を標的とした分子標的治療が有効なものの完全奏効は非常に少ないことがわかってきた。従って術後補助治療を考慮する時は、有害事象が強いため、施行できない、あるいは中止を余儀なくされることも少なくない。

(2) 基礎的にはこれらの癌の分子機構は比較的良好に研究されており、膀胱癌、腎癌ともに 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、たとえば膀胱癌では約 70% に p16 の発現異常が認められるという報告がある (Eur Urol 2005;47:463)。

(3) 本研究では我々が基礎的に研究を行ってきた p16 機能性ペプチドの転移抑制効果や全身投与時の有害事象の評価を目的に研究計画を展開してきた。癌抑制遺伝子とそのシグナル経路として、p53 遺伝子、Retinoblastoma (Rb) 遺伝子がほとんどの癌に関わるとされるが、p16 は cyclin dependent kinase 4, 6, cyclin D を制御することで Rb 蛋白のリン酸化を抑えている。我々はこれまでに、p16 分子の機能性ペプチド (r9-p16 Minimal Inhibitory sequence (MIS) (Oncogene 1998;16:587)) (以下、p16 (機能性) ペプチド) とトランスポーターペプチド (Wr-T : Mol Cancer Ther 2004;3:1623) を用いた p16 ペプチド導入システムの膀胱癌、腎癌に対する腫瘍抑制効果を *in vitro*、*in vivo* の系で検討してきた。その成果として、両者とも p16 の発現低下、欠損例、Rb のリン酸化亢進例が 80~100% あり、p16 ペプチドの導入により Rb リン酸化を抑制し、腫瘍増殖の抑制効果を確認した。また、動物の皮下移植腫瘍モデルを用いた検討では、膀胱癌、腎癌とも局所投与により p16 ペプチド+Wr-T 群で腫瘍の増殖抑制を認めた。さらにこの腫瘍抑制効果は血中への全身投与によっても著明に認められ、治療群の腫瘍では組織学的に Rb リン酸化の抑制、アポトーシスの亢進がみられ、全身投与による腫瘍抑制に妥当性があると考えられた。

2. 研究の目的

(1) p16 機能性ペプチドの導入システムは泌尿器癌の少なくとも膀胱癌、腎癌において全身投与で抗腫瘍効果を発揮することが期待でき、今回、転移モデルに対しての全身治療による転移抑制に関する有効性、臨床応用を視野にいれた場合の毒性の検討を動物モデルにて計画した。

(2) 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 (Int J Cancer 116:643, 2005)。P16 は 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 (Hum Pathol 35:817, 2004)。Wu, 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 (Int J Cancer 65:840, 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 (Mol Cancer Ther 3:1623, 2004) をふまえて、前述の Wr-T ペプチド導入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を報告した (Int J Oncol 42:543, 2013)。

(3) 膀胱癌の進行期の治療を行うことを視野に、マウス膀胱癌の肺転移モデルを用いて、肺転移に対する p16 ペプチドの効果、中期治療後の毒性について検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 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。

(2) マウス肺転移モデル：6 週齢の雌 C3H/He マウスに対し、 10^5 個/100mL PBS の MBT-2 細胞株を尾静注し、その 2 週間後に安楽死の上、屠殺し、肺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) (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。

(3) 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。肺転移抑制実験では、各々 50nmol、80nmol とし、尾静注を行った。また毒性試験では低用量として各々 5nmol、20nmol を、高用量として 25nmol、100nmol を投与した。

(3) 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 over night 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。またアポトーシスを TUNEL 染色 (CHEMICON) で行った。

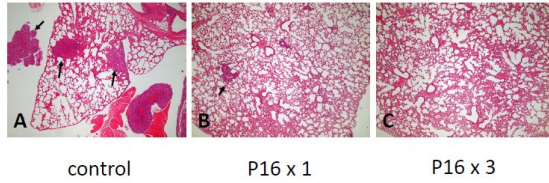
(4) P16 ペプチド投与後の効果と毒性：5 週齢の雌雄のマウスを使用し、P16 ペプチドを異

なる用量で単回、あるいは複数回投与し、短期・中期(12週目の特性)の毒性を血液検査と各臓器の顕微鏡システムが発見された。

4. 研究成果

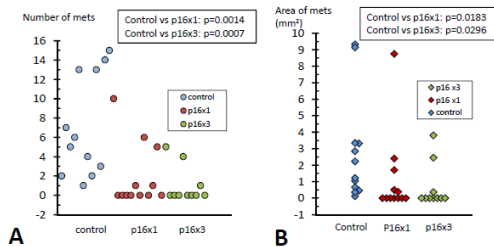
(1)P16 ペプチド全身投与による肺転移：HE染色切片では対照群では明かな肺転移巣が観察されたが、p16 ペプチド投与群では数の減少がみられ、大きさも一部のマウスを除き小さくなっていった(Fig. 1A-C)。

Fig. 1 Status of lung metastases at 14th day after MBT-2 administration



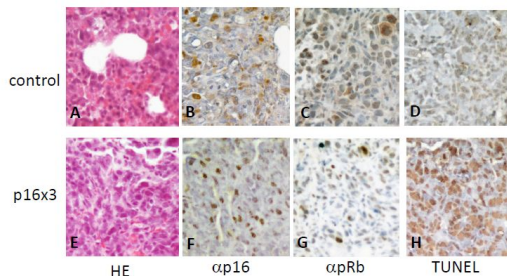
(2)また HE 染色切片において両側の肺の転移の数、大きさの和(面積)を計測、定量的に評価した。肺転移の数、大きさともに p16 ペプチド投与群で有意に減少した(数:単回 p16 vs 対照: p=0.0014; 3p16 vs 対照: p=0.0007) (Fig. 2A (大きさ:単回 p16 vs 対照: p=0.0183; 3回 p16 vs 対照: p=0.0296) (Fig. 2B)。一方、P16 ペプチドの投与回数による統計学的有意差は見られなかった。

Fig. 2 Difference in number and size of lung metastases in control and p16 peptide transfer groups



(3)転移巣の免疫染色による p16、リン酸化 Rb の発現、TUNEL 染色：3回ペプチド投与群の p16 発現は対照群に比較して明かな差がなく、リン酸化 Rb の発現は低下していた。TUNEL 染色では、3回ペプチド投与群はアポトーシスの亢進が示唆された(Fig. 3)。

Fig. 3 Alteration of p16/pRb, and TUNEL staining of the lung metastatic tumor according to p16 peptide transfer



(4)毒性の検討：血算、生化学検査の結果、早期毒性については性別、用量による差はなく、いずれも対照群と有意差を認めなかった (Table 1)。一方、晚期毒性においては、高用量反復投与群で、白血球数が増加する傾向が見られたが、有意差はなかった (Table 2、Fig.4)。また、主要臓器の組織学的検討では用量、投与回数にかかわらず明かな変化は認められず、骨髄の組織学的所見も差を認めなかった (Fig.5)。

Table 1
Change in blood analyses of single p16 peptide administration

m/f	treat	Alb	ALT	AST	Cre	WBC	RBC	Hb	plt
		g/dL	U/L	U/L	mg/dL	/uL	10 ⁹ /uL	g/dL	10 ⁹ /uL
male	control	3.3 (0.06)	86 (23)	30 (11.5)	0.01 (0.02)	5,430 (1,036)	748 (34.8)	12.4 (0.62)	37.8 (7.0)
	25 nmol	3.5 (0.27)	74 (17)	19 (3.1)	0.02 (0.02)	5,207 (1,952)	741 (127.7)	11.7 (2.1)	35.5 (16.5)
	100 nmol	3.2 (0.15)	60 (8.7)	16 (1.7)	0.05 (0.01)	6,160 (1,384)	805 (30.6)	13.0 (0.1)	60.2 (15.0)
female	control	3.5 (0.28)	81 (5.0)	22 (5.6)	0.07 (0.01)	6,360 (2,786)	783 (7.07)	13.0 (0.0)	54.0 (1.78)
	25 nmol	3.7 (0.36)	91 (3.0)	19 (2.3)	0.1 (0.03)	3,430 (1,488)	873 (55.9)	14.4 (1.3)	52.2 (15.0)
	100 nmol	3.6 (0.17)	82 (1.0)	26 (5.6)	0.08 (0.02)	5,763 (1,762)	816 (27.7)	13.9 (0.06)	50.3 (8.5)
P-value		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Table 2
Change in blood analyses of multiple p16 peptide administration

m/f	treat	Alb	ALT	AST	Cre	WBC	RBC	Hb	plt
		g/dL	U/L	U/L	mg/dL	/uL	10 ⁹ /uL	g/dL	10 ⁹ /uL
male	control	3.4 (0.15)	97 (23)	23 (1.0)	0.09 (0.03)	3,843 (1,846)	882 (51.4)	13.6 (0.78)	51.9 (19.7)
	100 nmol	3.5 (0.10)	69 (19.7)	18 (2.8)	0.08 (0.03)	5,953 (1,638)	863 (28.5)	13.3 (0.43)	46.6 (13.9)
female	control	3.5 (0.15)	77 (18.2)	18 (4.5)	0.10 (0.02)	3,173 (867)	845 (32.2)	13.4 (0.06)	40.4 (2.2)
	100 nmol	3.4 (0.26)	72 (35.7)	20 (4.0)	0.10 (0.04)	4,230 (1,142)	861 (8.96)	13.3 (0.35)	42.7 (8.2)
P-value		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Fig. 4 Change in WBC after high dose repeated p16 peptide administration

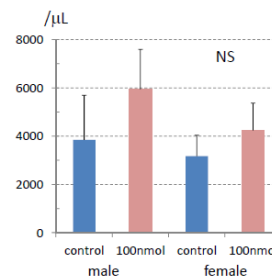
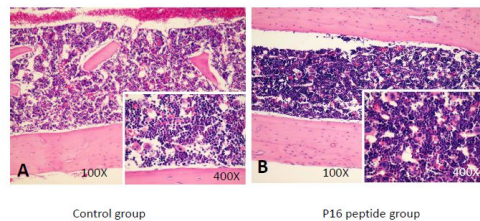


Fig. 5 histology of bone marrow in control and p16 high dose multiple p16 peptide group at 12th week experimental day



(5)考察：膀胱癌の進展には p16-Rb リン酸化は重要な機序であるが、p53 の機能異常も特に進行癌では重要である。P16 ペプチド投与

群の肺転移抑制は有意差を認めたが、奏効率はさらに改善が望ましい。この点で、p53のシグナルを制御し、p53機能を回復させるとされるp14ペプチドが報告されており、次の戦略としてp16/p14ペプチドの同時導入(Mol Cancer Ther 7: 1461, 2008)が期待される。

<引用文献>

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

Higa M, Katagiri C, Shimizu-Okabe C, Tsumuraya T, Sunagawa M, Nakamura M, Ishiuchi S, Takayama C, Kondo E, Matsushita M: Identification of a novel cell-penetrating peptide targeting human glioblastoma cell lines as a cancer-homing transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 206-212, 2014.

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* 3: 1623-1630, 2004.

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* 7: 1461-1471, 2008.

Krüger S, Mahnken A, Kausch I, Feller AC: P16 immunoreactivity is an independent predictor of tumor progression in minimally invasive urothelial bladder carcinoma. *Eur Urol* 47:463-467, 2005.

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* 35:817-824, 2004.

Saito K, Takigawa N, Ohtani N, Iioka H, Tomita Y, Ueda R, Fukuoka J, Kuwahara K, Ichihara E, Kiura K, Kond E: Antitumor

impact of p14ARF on gefitinib-resistant non-small cell lung cancers. *Mol Cancer Ther* 12:1616-1628, 2013.

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

Shimazui T, Yoshikawa K, Miyazaki J, Kojima T, Inai H, Ando S, Uemura H, Uchida K, Nishiyama H: Systemic transduction of p16INK4A antitumor peptide inhibits the growth of MBT-2 mouse bladder tumor cell line grafts. *Int J Oncol* 42:543-548, 2013

Spruck CH 3rd, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M, Esrig D, Miyao N, Tsai YC, Lerner SP, Schütte C, Yang AS, Cote R, et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 54:784-788, 1994.

von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Bodrogi I, Albers P, Knuth A, Lippert CM, Kerbrat P, Sanchez Rovira P, Wersall P, Cleall SP, Roychowdhury DF, Tomlin I, Visseren-Grul CM and Conte PF: Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol* 18: 3068-3077, 2000.

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* 65:840-846, 1996.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Onozawa M, Shimazui T, et al. Analysis of intravesical recurrence after bladder-preserving therapy for muscle-invasive bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2012;42:825-30.

Kimura T, Shimazui T, et al. [Spindle cell sarcoma of the penis: a case report].

Hinyokika Kiyō. 2012;58:299-305.
Japanese.

Shimazui T, Yoshikawa K, Miyazaki J, Uchida K, 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;42:543-8.

Ochiai A, Shimazui T, et al. Clinical utility of the prostate cancer gene 3 (PCA3) urine assay in Japanese men undergoing prostate biopsy. BJU Int. 2013; 111: 928-933.

〔学会発表〕(計3件)

Shimazui T, Yoshikawa K, Miyazaki J, Uchida K, Nishiyama H, et al. Systemic transduction of p16INK4a antitumor peptide inhibits lung metastasis of MBT-2 bladder tumor cell line in mice. 第73回日本癌学会総会 2014年9月25日 横浜

島居 徹、吉川和宏、宮崎 淳、内田和彦、西山博之、他. MBT-2 マウス膀胱癌細胞株の肺転移モデルに対する p16INK4a 機能性ペプチド全身投与による転移抑制と毒性の検討. 第102回日本泌尿器科学会総会 2015年4月18日、金沢

Shimazui T, Yoshikawa K, Miyazaki J, Uchida K, Nishiyama H, et al. Systemic transduction of p16INK4a antitumor peptide inhibits lung metastasis of MBT-2 bladder tumor cell line in mice. Annual meeting of American Urological Association 2015, 2015年5月17日 New Orleans

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

宮崎 淳 (MIYAZAKI JUN)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：10550246

西山博之 (NISHIYAMA HIROYUKI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：20324642

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

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