

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592390

研究課題名(和文)新規の薬剤膜輸送制御機構の解明に基づく抗癌剤耐性克服治療薬の開発のための基盤研究

研究課題名(英文)A new therapeutic medicine based on the investigation of membrane transporter

研究代表者

江原 伸(Ebara, Shin)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：70379741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：REIC/Dkk-3タンパク質は、癌細胞に過剰に発現させることにより、小胞体における細胞ストレスが誘導され、抗癌剤耐性の解除に關与することが明らかになっている。我々は本研究で、尿路性器癌における抗癌剤耐性を、P-glycoprotein(P-糖蛋白)を含むABCトランスポータースーパーファミリーの制御の観点から解明し、REIC/DKK-3遺伝子治療の新しいタイプの抗癌剤耐性克服治療薬としての有用性を検証した。

研究成果の概要(英文)：Recently, we found that over expression of secreted REIC/DKK-3 protein induced Endoplasmic reticulum stress in cancer cell and reduced the anticancer agent resistance. In this study, we analyzed the anticancer agent resistance in genitourinary cancer, associated with the mechanism of P-glycoprotein including ABC transporter superfamily, and validated the effects of REIC/DKK-3 gene therapy as new therapeutic medication of anticancer agent resistance.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：癌 抗癌剤耐性 P-glycoprotein 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

我々は、岡山大学において分離同定された癌抑制遺伝子である REIC/Dkk-3 についてオリジナリティーの高い研究を行ってきた。その中で、REIC/Dkk-3 タンパク質を癌細胞に過剰に発現させることにより、小胞体における細胞ストレスが誘導され、抗癌剤の耐性が解除されるという研究結果を、抗癌剤多剤耐性乳癌細胞を用いて明らかとした (Cancer Gene Therapy 16(2008). 65-75) (特許申請『抗癌剤耐性癌において抗癌剤増強作用を有するがん細胞死誘導剤』、特願 2007-287373、PCT/JP 2008/070541、WO2009/060982 A1)。この結果は、これまで抗癌剤耐性との関連がほとんど指摘されていなかった小胞体ストレスが、抗癌剤耐性克服に関与している可能性を示したものである。これらの研究背景を踏まえて、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、REIC/DKK-3 遺伝子治療によって、尿路性器癌における抗癌剤耐性が解除され、その抗癌剤耐性解除のメカニズムが、小胞体における細胞ストレスとどのように関わるかということを解明し、新規の抗癌剤耐性克服治療薬の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

尿路性器癌細胞株を用いて、REIC/DKK-3 遺伝子をアデノウイルスベクターにて強制発現させ、小胞体ストレス応答ならびに抗癌剤耐性に関与した ABC トランスポーター発現制御の解析を行った。

1) ヒト尿路性器癌細胞株を用いた研究

これまで明らかになっている薬剤耐性獲得機序に関連した分子の発現を、種々の耐性化尿路性器癌細胞株ならびにその親株を用い、RT-PCR法、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリー法、免疫染色法にて解析を行った。

小胞体ストレスを誘導することが確認されている薬剤について、REIC/DKK-3 遺伝子をアデノウイルスベクターにて強制発現させた癌細胞株に対し、単独または抗癌剤と同時に投与した場合の小胞体ストレス応答の関連した分子動態について、RT-PCR法およびウェスタンブロット法により遺伝子発現、タンパク発現を解析した。

抗癌剤耐性に関与することが確認されている薬剤について、REIC/DKK-3 遺伝子をアデノウ

ルスベクターにて強制発現させた癌細胞株に対し、小胞体ストレスを誘導する薬剤と同時に投与した場合の小胞体ストレスに関連した分子動態について、RT-PCR法、ウェスタンブロット法により遺伝子発現、タンパク発現を解析した。

2) マウスを用いた研究

REIC/DKK-3 遺伝子をアデノウイルスベクターにて強制発現させた癌細胞株を移植した担癌マウスに、抗癌剤および小胞体ストレスを誘導することが確認されている薬剤を投与し、抗癌剤の治療効果ならびに副作用について検証した。

上記にマウスモデルで得られた腫瘍サンプルを用いて、小胞体ストレス関連分子の遺伝子発現変化の有無を RT-PCR法およびウェスタンブロット法で解析し、効果発現の科学的根拠を検証した。

4. 研究成果

本研究では、抗癌剤であるアドリアマイシン耐性の膀胱癌細胞株において、REIC/DKK-3 遺伝子をアデノウイルスベクターで強制発現させることにより、アポトーシスが誘導されることが確認された。また REIC/DKK-3 遺伝子治療後にアドリアマイシン系抗癌剤であるドキソルビシンを投与し、殺細胞効果の増強、抗癌剤耐性に関与した P-糖蛋白の発現抑制を確認した。さらに小胞体ストレス応答に関与した JNK (c-jun N-terminal kinase) を抑制することにより、P-糖蛋白発現の回復を認めた。ヌードマウスを用いた動物実験でも同様にドキソルビシンによる抗腫瘍効果が得られ、小胞体ストレス応答が薬剤耐性に関与している可能性が示唆されたが、分子シグナルの解析に関し、今後さらに研究していく次第である。

5. 主な論文発表等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者は下線)

[雑誌論文] (計 8件)

Ad-REIC Gene Therapy: Promising Results in a Patients with Metastatic CRPC Following Chemotherapy. Kumon H, Sasaki K, Ariyoshi Y, Sadahira T, Ebara S, Hiraki T, Kanazawa S, Yanai H, Watanabe M, Nasu Y. Clin Med Insights

Oncol.9:31-38.2015. 査読有.
DOI:10.4137/CMO.S23252.

A novel gene expression system strongly enhances the anticancer effects of a REIC/DKK-3-encoding adenoviral vector. Watanabe M, Sakaguchi M, Kinoshita R, Kaku H, Ariyoshi Y, Ueki H, Tanimoto R, Ebara S, Ochiai K, Futami J, Li SA, Huang P, Nasu Y, Huh NH, Kumon H. Oncology Reports.31(3):1089-95.2014. 査読有.
DOI:10.3892/or.2013.2958

Integrin antagonist augments the therapeutic effect of adenovirus-mediated REIC/DKK-3 gene therapy for malignant glioma. Shimazu Y, Kurozumi K, Ichikawa T, Fujii K, Onishi M, Ishida J, Oka T, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Date I. Gene Ther.22:146-154.2014. 査読有.
DOI:10.1038/gt.2014.100.

Potential of adenovirus-mediated REIC/DKK-3 gene therapy for use in the treatment of pancreatic cancer. Uchida D, Shiraha H, Kato H, Nagahara T, Iwamuro M, Kataoka J, Horiguchi S, Watanabe M, Takaki A, Nouse K, Nasu Y, Tagi T, Kumon H, Yamamoto K. J Gastroenterol Hepatol.29:973-983.2014. 査読有.
DOI:10.1111/jgh.12501.

Adenovirus-mediated REIC/DKK-3 gene therapy: Development of an autologous cancer vaccination therapy. Watanabe M, Nasu Y, Kumon H. Oncol Lett.7:595-601.2014. 査読有.
DOI:10.3892/ol.2013.1777.

Predictive factors for acute and late urinary toxicity after permanent interstitial brachytherapy in Japanese patients. Ryuta Tanimoto, Kensuke Bekku, Norihisa Katayama, Yasuyuki Kobayashi, Shin Ebara, Motoo Araki, Mitsuhiro Takemoto, Hiroyuki Yanai, Yasutomo Nasu and Hiromi Kumon. Int J Urol.20(8):812-817.2013. 査読無.
DOI:10.1111/iju.12050

A novel gene expression system for detecting viable bladder cancer cells. Ueki H, Watanabe M, Kaku H, Huang P, Li SA, Ochiai K, Hirata T, Noguchi H, Yamada H, Takei K, Nasu Y, Kashiwakura Y, Kumon H. Int J Oncol.41:135-140.2012. 査読有.
DOI:10.3892/ijo.2012.1417

Primary gleason grade 4 impact on biochemical recurrence after permanent interstitial brachytherapy in Japanese patients with low- or intermediate- risk prostate cancer. Uesugi T, Saika T, Edamura K, Nose H, kobuke M, Ebara S, Abarzua F, Katayama N, Yanai H, Nasu Y, Kumon H. Int J Radiation Oncology Biol Phys.82(2) e219-223.2012. 査読有.
DOI:10.1016/j.ijrobp.2011.04.018

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]
出願状況 (計 1件)

名称: REIC遺伝子を発現する制限増殖型アデノウイルス

発明者: 公文裕巳、那須保友、渡部昌実、ユンチェオク

権利者: 岡山大学

種類: 特願

番号: 特願2014-110672

出願年月日: 2014.5.28

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0件)

[その他]
特になし

6. 研究組織

1) 研究代表者

江原 伸 (EBARA SHIN)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号: 70379741

2) 研究分担者
渡部 昌実 (WATANABE MASAMI)
岡山大学・岡山大学病院・准教授
研究者番号 : 70444677

3) 連携研究者
なし