

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462431

研究課題名(和文)尿路上皮癌における生理活性酸化脂質の新規役割の究明

研究課題名(英文)Role of bioactive oxidized lipid in urothelial carcinoma

研究代表者

近藤 幸尋 (Kondo, Yukihiro)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：80215467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：尿路上皮癌の治療に関しては、手術療法以外には放射線治療とシスプラチンを中心とした化学療法以外に現在選択肢がない。そこで新たな治療を開発するか既存の治療の効果を拡大することが重要である。本研究は、シスプラチンの治療効果を増大するために脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素であるホスホリパーゼ2に着目した。そのうちのカルシウム非依存性のホスホリパーゼ2が、膀胱癌細胞の増殖抑制に関与することを見いだした。そこでカルシウム非依存性のホスホリパーゼ2の阻害剤とシスプラチンを併用しより高い効果を得ることを見いだした。現在臨床応用に向けて検討中である。

研究成果の概要(英文)：Regarding the treatment of urothelial carcinoma, besides surgical therapy, besides radiotherapy and cisplatin-based chemotherapy, there is currently no choice. Therefore, it is important to develop new treatments or to expand the effect of existing treatments. This study focused on phospholipase 2, an enzyme that liberates fatty acids and lysophospholipids to increase the therapeutic effect of cisplatin. Among them, calcium-independent phospholipase 2 was found to be involved in the suppression of proliferation of bladder cancer cells. Therefore, we discovered that the inhibitor of calcium-independent phospholipase 2 and cisplatin are used in combination to obtain a higher effect. We are currently studying for clinical application.

研究分野：泌尿器科

キーワード：尿路上皮癌 生理活性酸化脂質 シスプラチン ホスホリパーゼ2

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

膀胱癌の筋層非浸潤癌における再発要因および筋層浸潤癌への進行に関してはいまだ不明な点が多く、かつ腎細胞癌および前立腺癌に比べてその基礎的検討も遅れている。また癌細胞における低酸素応答因子とPG等の生理活性酸化脂質産生を関連付けた報告もない。そこで本研究は膀胱癌の再発および進行に関する新たな要因を発見し、新規治療へ結び付けるものである。

応募者のこれまでの研究成果を踏まえて着想に至った経緯

癌細胞は異常増殖した腫瘍中心部では、血流量の低下が起こり、その結果として酸素が十分に行き渡らない低酸素状態が生じる。低酸素に曝された癌細胞はこの環境下で生存しさらに成育するために様々な遺伝子発現のスイッチをオンとし、低酸素からの脱出あるいは低酸素への適応を試みようとする。申請者はこれまで生理活性酸化脂質の1つ PGE₂ が腫瘍の進展や増悪化に関わることを明らかにしてきたが、この PGE₂ 産生を担うシクロオキシゲナーゼ (COX)-2 や膜結合型 PGE 合成酵素 (mPGES)-1 の発現も低酸素環境下で誘導されることが最近報告された。しかし一方で、PGE₂ の前駆体 PGH₂ の生合成においては COX によるアラキドン酸への酸素分子の添加が不可欠であり、酸素濃度の低下は産生酵素の発現誘導とは逆に PGE₂ などの PG 類の産生を逆に低下させる可能性も考えられる。PG 類だけでなく同様に腫瘍の進展や増悪化に関わることを示唆されているロイコトリエン(LT)類においてもその産生にはリポキシゲナーゼ(LOX)による酸素添加が不可欠である。しかし、これまで PG や LT といった等生理活性酸化脂質の低酸素環境下における産生に注目し解析した報告はない。そこで本研究では、**腫瘍内低酸素領域における生理活性酸化脂質の産**

生、さらに産生された生理活性脂質と発癌および進展との関連

について解析することとした。従来の研究は発癌や浸潤転移における COX-2 や低酸素応答因子などを検討したものが散見されるが、本研究は両者を組み合わせて検討を行う上に、ノックアウトマウスを使用して発癌および進展の過程での変化を一元的に検討できることにある。また腫瘍組織と腫瘍血管内皮細胞の両者で検討を行い、最終的には腫瘍血管の増殖コントロールを目的とした研究である。つまり本研究の先には、腫瘍血管内皮細胞をコントロールする創薬に結びつく可能性があるのでないかという着想に至った。

2. 研究の目的

また前立腺癌のアンドロゲン受容体に関しても低酸素応答因子が cross-talk することにより、前立腺癌の進展に関与することを見いだした。その治療としてヒートショックプロテイン 90(hsp90)をコントロールすることにより治療に結びつくことも報告している。(J. Urol 173, 1762-1766, 2005 Mol Cancer Res. 5(4):383-91, 2007 Biol Pharm Bull. Jul;32(7):1166-72, 2009 Int J Urol.17(3):281-5, 2010)近年血管新生を標的として分子標的薬が使われ始めて来ているものの当初の期待通りの結果が得られていないのが実情である。

一方、平成 14 年より**尿路性器癌、特に腎細胞癌と膀胱癌における COX-2 とその悪性度および予後に関する研究**を始めている。その結果、腎細胞癌および膀胱癌において悪性度が進むほど腫瘍内の COX-2 が高くなり腫瘍の進展にも関連することを見いだした。この基礎研究が現在臨床における COX-2 阻害剤とシメチジンの投与による腎癌の進展予防治療に結びついている。しかしながら本療法は臨床において転移浸潤癌を小さくするほどの効果は得られ

ていないのが現在までの研究結果で明らかになっている、

以上の結果が平成 22 年までの間に得られたが、今後の臨床応用を実現すべく平成 23 年より COX-2 の下流に存在する PGE₂ に着目し研究を開始している。その結果 **PGE₂ のコントロールにより使用の進展の予防が可能である結果を見いだしている。**

(論文投稿中)そこで私たちは低酸素状態における PGE₂ 周辺の PG や LT といった等生理活性酸化脂質が重要であり、特に低酸素状態で変化する新規生理活性酸化脂質を同定し治療に結びつけることができれば、新たな治療ターゲットとなる可能性があるのではないかという着想に至った。

3. 研究の方法

ヒト膀胱癌細胞やマウス膀胱癌細胞の培養細胞において、低酸素によって誘導される新規生理活性酸化脂質を検索・同定する。マウス移植膀胱癌の成長と同定された新規生理活性酸化脂質の機能解析を行った上で、ノックダウンによる効果を検討する。以上のように新規生理活性酸化脂質の機能解析が進んだ際に、マウスの膀胱癌発癌モデルを用いて発癌および癌の進展時での新規生理活性酸化脂質の変化を確認し、新規生理活性酸化脂質阻害剤を用いてその癌の発癌および進展予防を検討する。調査期間内に可及的に各ステージのヒト膀胱癌サンプルを用いて新規生理活性酸化脂質の発現及び局在を検討する。以上の結果をもとに、膀胱癌の新規生理活性酸化脂質阻害剤を用いた治療の臨床応用を目指すものである。

4. 研究成果

進行性膀胱癌の治療は、手術療法・化学療法・放射線療法があるものの化学療法の存在は欠かすことが出来ない。そのなかで化学療法はシスプラチンを中心としたものが中心で、ここ 30 年変化が見られない。そこでシスプラチンの作用増強は化学療法に於いて効果増大に結びつく重要な要素である。近年、膜グリセロリン脂質の sn-2 位のアシ

ル鎖を加水分解し、脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素である PLA2 (ホスホリパーゼ A2) のうち、酵素活性を發揮するのに Ca²⁺ を必要としない iPLA2 (カルシウム非依存性 PLA2) が癌の増殖と関与することが、いくつかの癌種で報告されている。ヒト膀胱癌の網羅的解析に於いても iPLA2 の発現は強く、臨床検体の病理標本でも膀胱癌で強く発現されていた。培養膀胱癌細胞で (EJ 細胞) で iPLA2 阻害剤である bromoenol lactone (BEL) を投与後 CPPD を投与し、細胞増殖を MTT Assay にてシスプラチン単独と比較した。次にフローサイトメトリーにて、BEL + CDDP 投与後のアポトーシスについて CDDP 単独と比較した。最後に siRNA により iPLA2 をノックダウンし、同様の結果が得られるかを確認した。MTT Assay では BEL 3μM、10μM を前投与後に CDDP 8μM 投与したときに CDDP 単独と比較し有意に細胞増殖が抑制された。フローサイトメトリーでも同様に CDDP 単独と比較し BEL + CDDP でアポトーシスが増加していた。さらに siRNA において MTT Assay、フローサイトメトリーともに同様の結果が確認された。以上の結果より CDDP 効果増強剤として BEL の臨床応用に取り組んでいる。

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 3 件)

著者名: Sasaki Y, Ochiai T, Takamura M, Kondo Y, Yokoyama C, Hara S.

論文表題: Role of prostacyclin synthase in carcinogenesis

雑誌名: Prostaglandins and Other Lipid Mediator. 2017 May 12. S1098-8823(17)30024-2.

査読: 有

著者名: Suzuki Y, Toyama Y, Nakayama S, Nomura S, Minowa T, Tanabe K, Kondo Y.

論文表題: Treatment Results of Transurethral Resection of the Board-Certified Urologists for Benign Prostate Hyperplasia: Analysis by

Resection Volume. Prostate by
Non-Japanese

雑誌名 : J Nippon Med Sch.

2017;84(2):73-78.

査読 : 有

著者名 : Ukawa S, Nakamura K, Okada
E, Hirata M, Nagai A, Yamagata Z,
Muto K, Matsuda K, Ninomiya T,
Kiyohara Y, Kamatani Y, Kubo M,
Nakamura Y; BioBank Japan
Cooperative Hospital Group,
Tamakoshi A.

論文表題 : Clinical and
histopathological characteristics of
patients with prostate cancer in the
BioBank Japan project.

雑誌名 : J Epidemiol. 2017

Mar;27(3S):S65-S70

査読 : 有

〔学会発表〕(計 1 件)

学会発表

発表者名 : 中山聡子、鈴木康友、原俊太郎、
近藤幸尋

発表表題 : 膀胱癌に対するシスプラチン
(CDDP)の癌増殖抑制とiPLA2 (カル
シウム非依存性 PLA2)の関与について

学会等名 : 日本泌尿器科学会総会

発表年月日 : 2017年4月

発表場所 : 鹿児島

〔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

近藤幸尋 (Yukihiro Kondo)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 80215467

(2) 研究分担者

鈴木康友 (Yasutomo Suzuki)

日本医科大学医学部・准教授

研究者番号 : 90297911

戸山友香 (Yuka Toyama)

日本医科大学医学部・助教

研究者番号 : 60350063