

## 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 24 年 6 月 6 日現在

機関番号： 34401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009~2011

課題番号： 21791533

研究課題名（和文） 小胞体ストレス促進を利用した進行性腎癌治療

研究課題名（英文） Therapy for advanced renal cancer via ER stress modulation

研究代表者

稲元 輝生 (Inamoto Teruo)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号： 20330087

研究成果の概要（和文）：さまざまな細胞内外のストレスを検証してきた過程で細胞の増殖シグナルであるEGFRシグナルの装飾や細胞内での転写因子などの分子に注目した。細胞増殖シグナルをブロックするストレス；EGFRは尿路上皮癌の治療において有用なターゲットであることは論を待たない。しかしながら臨床の場での有効性は少数の患者に限られる。我々はEGFRに対する特異抗体C225の効果を規定するマーカーを検索することとした。11の膀胱癌細胞株をC225で処理し [3H]チミジン取り込みアッセイでその効果を判定した。またEGFRの発現状況をタンパク質レベルではウエスタンブロットで、遺伝子のコピー数を判定する目的でFISH法を用いた。さらに各々の細胞株のmRNAを用いてマウクロアレイを行ない、C225の感受性を予測する因子を検索した。その結果HER4、Eカドヘリン、Hカテニンの発現上昇、PDGFRの発現低下がC225の効果を予測する因子であることが判明した。更に、EカドヘリンのノックダウンをC225抵抗性細胞で行なうとC225感受性が開腹する現象が観察された。これらの結果はEカドヘリン、HカテニンなどのEMTマーカーがC225の感受性を制御する事実を示唆している。転写機能調節を介したストレス；Bacillus Calmette-Guérin (BCG)は免疫反応を通して表在性の膀胱癌に対する抗腫瘍効果を来すとされている。マウスのT-リンパ球、helper T-細胞、natural killer T-細胞を欠損させるとBCGを介した抗腫瘍効果が減弱することが知られている。Peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)は脂肪代謝、細胞増殖などを支配する転写因子である。PPARが膀胱癌の患者サンプル中に高発現している上、variant PPAR alleleがBCG治療にナイーブな患者集団の腫瘍の再発に影響することが認められる。更にPPARのアゴニストはnatural killer T-細胞を活性化する。従ってBCGによる治療レジメンにPPARのアゴニストを加えることで潜在的な抗腫瘍効果を促進させる可能性がある。これらの細胞内外のストレス応答を介したシグナル調節によって進行性泌尿器癌の治療応用が可能となるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Modulation of growth factor signaling; The epidermal growth factor receptor is expressed in a variety of human malignancies, including head and neck, breast, colorectal, lung, prostate, kidney, ovary, brain, pancreas, and bladder cancers. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a potential target for the treatment of urologic malignancies but a clinical response is expected in a small proportion. To come up with potential markers of response to EGFR targeted therapy in cell lines, cell lines were investigated for anti-growth response to EGFR-therapy. E-cadherin was silenced by small interfering RNA in two sensitive cell lines, and the effect on the response to drugs was tested. Expression of intact ErbB4, E-cadherin, and b-catenin and loss of expression of platelet-derived growth factor receptor were associated with response to drug sensitivity. E-cadherin seems to play a central role in modulation of EGFR response.

Nuclear receptor signaling; The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) is a group of transcription factors that regulates cell growth, fatty acid regulation, and immune surveillance. Evidence is certainly accumulating for presence of PPAR in bladder cancer tissues. It is reported that PPAR agonist specifically increases natural killer T- lymphocytes specific markers. In addition to the close association between immune system and PPAR activation, PPAR agonists such as rosiglitazone to BCG regimens may have potent antitumor effects since bladder cancer cell lines demonstrates dose dependent inhibition of cancer cell growth in the presence of the PPAR agonist. Given these findings, along with previous findings, translational usage of molecular targets in clinical settings is awaited.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,100,000	930,000	4,290,000

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：sunitinib、IL-2

1. 研究開始当初の背景

進行性腎癌は治療難治性であり、手術的に根治できない場合は予後不良となる。進行性腎癌の治療にこれまで使用されてきたインターフェロンやインターロイキン2は、いずれも奏効率が10～15%で、満足な効果が得られているとは言いがたい。

2. 研究の目的

既存の免疫療法を上回る治療効果を期待されている分子標的薬の奏効率はPartial Response(PR)が10%～15%にとどまり、全ての進行性腎癌患者がその恩恵をあずかるわけではないことは明らかである。申請者らは進行性腎癌の分子標的薬の殺細胞効果において小胞体ストレスが役割を担う点に着目した。

3. 研究の方法

細胞増殖アッセイ；(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (Seikagaku)を使用して96穴プレート内に置いた、薬剤処理後の腎癌細胞の生細胞数を吸光度測定する。アポトーシス誘導；細胞死の起こった割合はannexin V-fluorescein isothiocyanateとpropidium iodide (PI)によって評価する。フローサイトメーターと細胞周期解析；FACSCalibur (Becton Dickinson)とCellQuest software (Becton Dickinson)を使用して、各種癌化細胞株のストレス関連分子の発現を確認する。実際の作業としては濃度をさまざまに振った薬剤で処理

した細胞株を70%Ethanolで処理し、細胞膜をpermealizeした後にanti-phosphoPERK mAb、anti-phosphoEIF2 $\alpha$  mAbなどで標識された細胞の割合をDMSOコントロールと比較し、半定量的にストレスの誘導を評価する。細胞周期解析は濃度をさまざまに振った薬剤で処理した腎癌細胞株をPI染色し、同じくフローサイトメーターでデータを取得後、ModFit program (Becton Dickinson)で解析することでG0/G1期-S期-G2/M期の細胞の割合をDMSOコントロールと比較することで細胞周期の停止効果の有無を判定する。

4. 研究成果

さまざまな細胞内外のストレスを検証してきた。Neuron growth factor (NGF) 1 $\beta$ /nuclear receptor related (Nurr) 1などの細胞内での転写制御、ErbB4/Her4などの増殖シグナルのブロック、そしてクルクミンを用いたこれらのシグナルを上流でコントロールする試みを癌抑制に利用し、Nurr1は癌において発現が増加しており、また、悪性度が高いほど発現の増加が認められた。そこで、in vivo実験としてNurr1に特異的な核内レセプター刺激物質を癌細胞に添加しMTTアッセイを行ったところ、刺激物質の濃度依存的に癌細胞の増殖が抑制された。マウスの実験でも、Nurr1刺激物質を腹腔内投与後に摘出した癌組織では、コントロール群に比べ癌が縮小しており、増殖細胞核関連抗原の減少、アポトーシスの増加も認められた。ゲフィ

チニブのターゲット分子である ErbB 4 /Her 4 については、細胞内型と細胞外型の分子があり、ゲフィチニブに感受性がある膀胱癌細胞株は細胞外型であることが報告されている。癌細胞株を ErbB 4 のリガンドである neruregulin で処理したところ、細胞外型の ErbB 4 がなくなり、細胞内型が増加し、濃度依存性の細胞抑制作用が消失した。すなわち、細胞外の ErbB 4 がゲフィチニブの感受性促進に重要であることが確認された。クルクミンに関して、最近では癌抑制効果が注目されている。われわれは、*in vitro* 実験でゲムシタピンに見られた癌細胞の成長抑制がクルクミン併用により相乗効果を示すことを認め、*in vivo* 実験でも確認した。こうしたこれまでの研究から、クルクミンは発癌シグナル伝達経路の上流に位置することがわかった。

#### 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 5 件)

- ① Inamoto T, Czerniak BA, Dinney CP, Kamat AM. Cytoplasmic mislocalization of the orphan nuclear receptor Nurrl is a prognostic factor in bladder cancer. *Cancer*. 2010 Jan 15;116(2):340-346.  
DOI: 10.1002/cncr.24737
- ② Tharakan ST, Inamoto T, Sung B, Aggarwal BB, Kamat AM. Curcumin potentiates the antitumor effects of gemcitabine in an orthotopic model of human bladder cancer through suppression of proliferative and angiogenic biomarkers. *Biochem Pharmacol*. 2009 Aug 12.  
doi: 10.1016/j.bcp.2009.08.007
- ③ Takahara K, Azuma H, Sakamoto T, Kiyama S, Inamoto T, Ibuki N, Nishida T, Nomi H, Ubai T, Segawa N, Katsuoka Y. Conversion of prostate cancer from hormone independency to dependency due to AMACR inhibition: involvement of increased AR expression and decreased IGF1 expression. *Anticancer Res*. 2009 Jul;29(7):2497-505.  
<http://ar.iijournals.org/content/29/7/2497.long>

- ④ Inamoto T, Azuma H, Katsuoka Y. Gemcitabine resistance and mesenchymal phenotype. *Ann Surg Oncol*. 2009 May;16(5):1435-1436.

DOI: 10.1245/s10434-008-0309-0

- ⑤ Inamoto T, Shah JB, Kamat AM. Friend or foe? Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human bladder cancer. *Urol Oncol*. 2009 Nov-Dec;27(6):585-691.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2011.03.031>

[学会発表] (計 6 件)

- ① Inamoto T, Azuma H, Kotake Y, Ubai T, Watanabe M, Katsuoka Y. Cytoplasmic mislocalization of the orphan nuclear receptor is a prognostic factor in bladder cancer. *Société Internationale d'Urologie*, Shanghai, China, Nov 4th 2009. シャンハイ (中国)
- ② Inamoto T, Dinney CP, Czerniak B, Kamat AM. Gamma-aminobutyric acid modulates invasive property in renal cancer. *Société Internationale d'Urologie*, Shanghai, China, Nov 3rd 2009. シャンハイ (中国)
- ③ Inamoto T, Ibuki N, Koyama K, Komura K, Fujisue Y, Kotake Y, Ubai T, Azuma H, and Katsuoka Y. Transforming Growth Factor-beta Regulates Neuroendocrine Like Transdifferentiation of Human Prostate 5th Congress of Asia Pacific Society for the Study of Aging Male, Osaka, Japan, Oct 16th 2009. (大阪)
- ④ Black P, Inamoto T, Fisher M, Hegarty P, Arora A, Bar-Eli M, Dinney C, and McConkey D. Inhibition of ErbB4/HER4 cleavage potentiates gefitinib sensitivity in urothelial carcinoma. *Can Urol Assoc*, June 2009 サンディエゴ (USA)
- ⑤ Black P, Brown G, McConkey D, Kassouf W, Inamoto T, Arora A, Gallagher D, Munsell M, Bar-Eli M, Dinney C, and Adam L. Receptor heterodimerization: a new mechanism for platelet-derived growth factor-induced resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in bladder cancer. *Can Urol Assoc*, June 2009 サンディエゴ (USA)

- ⑥ Azuma, H. Nomi, H., Ubai, T., Inamoto, T., Ibuki, N., Koyama, K., Isaka, Y., Takahara, S., Katsuoka, Y. Donor-specific tolerance induced by treatment with Superagonistic CD28 antibody in rat renal allografts. The American Urological Association (AUA)'s Annual Meeting, April 2009 シカゴ (USA)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

稲元 輝生 (Inamoto Teruo)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 20330087