

平成 21 年 月 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791102
 研究課題名（和文） ヒートショックプロテイン90阻害剤による泌尿器癌の癌治療耐性克服
 研究課題名（英文） Overcoming therapeutic resistance of genitourinary cancer using heat shock protein 90 inhibitors
 研究代表者
 古賀 文隆（KOGA FUMITAKA）
 東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：10285851

研究成果の概要：ヒートショックプロテイン 90 (Hsp90) は癌の治療耐性を規定する様々な蛋白の発現と機能を担保する。細胞毒性を示さない低用量の Hsp90 阻害剤は、これら治療耐性関連蛋白の発現と機能を抑制し、膀胱癌細胞の化学放射線療法治療耐性克服を可能とした。Hsp90 阻害剤は、正常尿路上皮細胞に対しては、癌細胞にみられた強い治療増感効果を示さなかったことから、その増感作用は癌細胞選択的であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

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：膀胱癌，治療耐性，化学療法，放射線療法，ヒートショックプロテイン 90 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

癌の治療耐性は、克服すべき臨床的重要課題のひとつである。癌の抗癌剤や放射線に対する感受性の増大は、治療耐性を克服し担癌患者の生命予後を改善するのみならず、抗癌剤使用量や放射線照射量の減量による副作用の軽減をも可能にする。

2. 研究の目的

分子シャペロンである heat shock protein 90 (Hsp90) は、癌細胞の生存・増殖・浸潤・転移に関わる数多くの変異蛋白や過剰発現したシグナル蛋白の構造安定化と機能を保証する。これら Hsp90 に安定化と活性を依存している蛋白 (Hsp90 クライアント蛋白) と

して、変異型 p53, Akt, ErbB2, 低酸素応答因子 HIF-1 α , survivin などの anti-apoptotic な生存シグナル伝達に関わる多様な癌原蛋白が知られている。Hsp90 阻害剤は Hsp90 と特異的に結合してそのシャペロン機能を抑制し、Hsp90 クライアント蛋白の失活と分解を引き起こす。Hsp90 阻害剤は、単一分子を標的としながら癌の生存・増殖・浸潤・転移に関わる多様な癌原蛋白を同時に、しかも癌細胞特異的に (Kamal et al. *Nature* 2003) 阻害できる点が、他の分子標的治療薬と異なる特徴であり、様々な preclinical model で抗腫瘍効果が示されている。Hsp90 阻害剤の 1 つである 17-AAG (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin) は欧米で第 2 相臨床試験が進行中であり、人体に対する安全性も確認されている。

Hsp90 阻害剤は単独でも抗癌作用を発揮するが、anti-apoptotic シグナルに関わるクライアント癌原蛋白群の阻害作用により、従来癌治療との併用で更なる抗癌作用を発揮すると予想される。しかし、これまで詳細な検討は数少ない。

申請者はこれまでに、細胞毒性を示さない低濃度 (100nM) の Hsp90 阻害剤が、増殖因子や低酸素などの外的刺激により促進される膀胱尿路上皮癌細胞の浸潤・血管新生能を効果的に抑制すること、そして、その機序として Hsp90 阻害剤による Akt と HIF-1 α の機能阻害が重要であることを示した (*Clin Cancer Res* 2005)。100nM という Hsp90 阻害剤の濃度は、第 1 相臨床試験で安全性が確認されている血中濃度の範囲内であり、低用量 Hsp90 阻害剤持続投与による癌の進行阻止療法が臨床で応用可能であることが示唆された。

以上をふまえ、本研究では泌尿器癌培養細胞株で発現する anti-apoptotic シグナル蛋白群 (特に Akt, 変異型 p53, survivin, および HIF-1 α) を有効に阻害する Hsp90 阻害剤の最低濃度を見出し、低用量 Hsp90 阻害剤併用による癌細胞の従来癌治療に対する増感効果 (および耐性克服) を *in vitro* で解析する。

3. 研究の方法

- (1) 浸潤性膀胱癌に対する化学放射線療法治療耐性に関連する蛋白の解析：臨床サンプルの免疫組織学的蛋白発現解析
- (2) 低用量 Hsp90 阻害剤の膀胱癌細胞株の化学放射線療法耐性克服 (*in vitro*)：クロノジェニックアッセイ、細胞増殖アッセイ、アポトーシスアッセイ、ウェスタンブロット
- (3) 低用量 Hsp90 阻害剤の癌細胞選択性の解析：クロノジェニックアッセイ、ウェスタンブロット
- (4) 低用量 Hsp90 阻害剤の膀胱癌細胞株の化学放射線療法耐性克服 (*in vivo*)：マウス膀胱癌細胞皮下移植モデル

4. 研究成果

(1) 化学放射線療法後に根治的切除術を施行された 35 例の化学放射線療法前の腫瘍組織の p53, survivin, erbB2, NFkB の発現解析を行い、各蛋白発現と化学放射線療法治療効果との関連をロジスティック回帰分析で解析した結果、erbB2 と NFkB の発現が治療耐性と有意に関連することを見出した。すなわち、これら蛋白が浸潤性膀胱癌に対する化学放射線療法治療耐性を規定する因子である可能性が示唆された。

(2) 2 種類の膀胱癌細胞株を用いた。5637 細胞は化学放射線療法感受性が高く、T24 細胞は治療抵抗性である。

Hsp90 阻害剤は 17-DMAG を用いた。

両細胞株で、17-DMAG による Hsp90 クライエント蛋白である erbB2, IKKB (NFkB 活性化に関わる蛋白), phospho-Akt の発現抑制を調べると、5637 細胞では 50 nM, T24 細胞では 100 nM の濃度で有効に抑制しうることが判明した。これらの濃度は、細胞増殖アッセイで膀胱癌細胞に細胞毒性を示さない濃度であった。

治療感受性である 5637 細胞は、50 nM の 17-DMAG 前治療で化学放射線療法に対する感受性がさらに増大するものの、元々 4Gy + シスプラチン 0.4 ug/mL で 90%以上の増殖抑制が得られていたので、17-DMAG 前治療による増感効果に大きなインパクトはなかった。

一方、治療抵抗性の T24 細胞は同用量の化学放射線療法に対し、60~70%程度の増殖抑制効果しか得られていなかったが、100 nM 17-DMAG 前治療により 95%の抑制効果を得ることができた。

このように、細胞毒性を示さない低用量の 17-DMAG 前治療は、治療耐性膀胱癌細胞の治

療感受性を、治療高感受性癌細胞と同程度まで増感しうることが判明した。治療感受性増大の背景には、化学放射線療法によるアポトーシスの誘導があることも判明した。

(3) 膀胱粘膜を構成する細胞は尿路上皮細胞である。次に、17-DMAG 併用化学放射線療法が正常尿路上皮細胞に及ぼす影響を上記と同様の方法で解析した。正常尿路上皮細胞は、腎腫瘍患者の腎摘除標本の正常尿管粘膜からの初代培養株を用いた。

興味深いことに、正常尿路上皮細胞は T24 細胞よりも化学放射線療法に対し強い抵抗性を示しており、100 nM 17-DMAG 前治療によっても、4Gy + シスプラチン 0.4 ug/mL による増殖抑制が 90%を越えることはなく、アポトーシス誘導酵素である caspase 3 の活性化も認められなかった。100 nM 17-DMAG 前治療は、正常尿路上皮細胞の IKKB および phospho-Akt の発現を抑制したことから、正常尿路上皮細胞の化学放射線療法治療耐性は、Hsp90 クライエント蛋白の機能に依存しないことが示唆された。

(4) 現在、マウス膀胱癌細胞皮下移植モデルで Hsp90 阻害剤による化学放射線療法治療耐性克服の解析を行っているところである。

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4件)

- ① Koga F, Kihara K, Fujii Y, Yoshida S, Saito K, Masuda H, Kageyama Y, Kawakami S. Favourable outcomes of clinical stage T3N0M0 bladder cancer patients treated with induction low-dose chemoradiotherapy plus partial or radical cystectomy versus immediate radical cystectomy: a single-institutional retrospective comparative study. BJU Int (in press), 査読有
- ② Koga F, Kihara K, Neckers L. Inhibition of cancer invasion and metastasis by targeting the molecular chaperone heat shock protein 90. Anticancer Res 29, 797-808, 2009, 査読有
- ③ Koga F, Yoshida S, Kawakami S, Kageyama Y, Yokoyama M, Saito K, Fujii Y, Kobayashi T, Kihara K. Low-dose chemoradiotherapy followed by partial or radical cystectomy against muscle-invasive bladder cancer: an intention-to-treat survival analysis. Urology 72, 384-388, 2008, 査読有
- ④ 古賀文隆, 木原和徳, 増田 均, 川上 理. 浸潤性膀胱癌に対する低侵襲根治的膀胱温存療法: 低用量化学放射線療法とミニマム創内視鏡下膀胱部分切除. 泌尿器外科 20, 871-874, 2007, 査読無

[学会発表] (計5件)

- ① 古賀文隆, 木原和徳. ビデオシンポジウム: 浸潤性膀胱癌に対する低侵襲根治的膀胱温存療法. 第33回日本外科系連合学会, 2008年6月13日, 東京
- ② Koga F, Kawakami S, Yoshida S, Saito K, Fujii Y, Kihara K. Favorable outcomes of T3N0M0 bladder cancer patients treated with induction low-dose chemoradiotherapy plus partial or radical cystectomy compared to immediate radical cystectomy. 23rd annual EAU congress, Mar 26, 2008, Milan, Italy
- ③ 古賀文隆, 木原和徳, Neckers Len. 特別講演: Hsp90 阻害剤による癌の浸潤・転移抑制. 第11回バイオ治療法研究会学術集会, 2007年12月1日, 東京
- ④ 古賀文隆, 吉田宗一郎, 影山幸雄, 田所学, 酒井康之, 齋藤一隆, 増田 均, 小林 剛, 川上 理, 木原和徳. 浸潤性膀胱

癌に対する低侵襲根治的膀胱温存療法. 第45回日本癌治療学会総会, 2007年10月26日, 京都

- ⑤ Koga F, Yoshida S, Kageyama Y, Kawakami S, Fujii Y, Saito K, Masuda H, Kobayashi T, Kihara K. Induction low-dose chemoradiotherapy against muscle-invasive bladder cancer: possible improvement of survival and favorable local control for bladder-preserved patients. 29th Congress of the SIU, Sept 4, 2007, Paris, France

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 文隆 (KOGA FUMITAKA)

東京医科歯科大学・医学部付属病院・助教
研究者番号: 10285851

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: