

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591624

研究課題名(和文) 複数の癌特異的遺伝子を標的にした分子標的治療の開発

研究課題名(英文) The development of the novel treatment that targeted plural cancer specific genes

研究代表者

國料 俊男 (KOKURYO TOSHIO)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：60378023

研究成果の概要(和文)：

癌の病態は単一遺伝子によるものではなく、異なる複数の遺伝子の同時発現により複雑な病態として作り出されている。効果的な癌分子標的治療法の開発には単一遺伝子ではなく、機能の異なる複数の癌特異的遺伝子を遺伝子群として標的にすることが重要である。本研究では癌特異的遺伝子Nek2(NIMA related kinase 2)、FAK(Focal adhesion kinase)、TLK1(Tousled like kinase 1)を標的とした癌分子標的治療法に関する研究と抗癌剤の併用に関する研究を行った。Nek2とFAK、Nek2とTLK1のsiRNAによる同時抑制では、各遺伝子の抑制に相加効果を認め、増殖抑制能、アポトーシス誘導能に関しても相加効果を認めた。

Nek2 siRNAとCDDP併用投与は、Nek2 siRNAまたはCDDP単独投与と比較して、有意な増殖抑制効果を認めた。Nek2 siRNAとCDDP併用投与群の遺伝子解析によりBCL2L1、APAF-1(apoptotic protease activating factor 1)の亢進、FOSとJUNの減弱を認めた。TLK1 siRNAとCDDPの併用投与は、TLK1 siRNAまたはCDDP単独投与と比較してアポトーシス誘導能の増強を認めた。担癌動物モデルにおいてもNek2 siRNAとCDDP併用投与群は単独投与群より有意な増殖抑制効果を認め、siRNAと抗癌剤の併用は相加作用ではあったが、有効であった。

本研究により癌特異的遺伝子を標的にした siRNA と抗癌剤の併用による新規治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The cancer progression is dependent on complicated conditions of cancer specific genes. It is important to target the plural genes for the development of an effective molecule targeted therapy. We performed analysis about cancer specific genes, such as Nek2 (NIMA related kinase 2), FAK (Focal adhesion kinase) and TLK1 (Tousled like kinase 1). The simultaneous suppression of Nek2 and FAK inhibited proliferation and induced apoptosis, compared with single suppression of Nek2 or FAK. The double restraint of Nek2 and TLK1 also inhibited the proliferation and induced apoptosis. The combination treatment of Nek2 siRNA and CDDP increased inhibitory effect in proliferation and cell survival in cancer cell. We identified the over expression of BCL2L1 and APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1), the suppression of FOS and JUN in combination treatment. The concomitant usage of TLK1 siRNA and CDDP enhanced apoptosis in comparison with TLK1 siRNA or CDDP treatment.

Our data indicated the combination of siRNA and the anticancer agent may be a novel cancer targeted therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：Nek2、TLK1、FAK

### 1. 研究開始当初の背景

われわれは、これまで胆管癌、膵癌をはじめとする様々な癌に対して網羅的遺伝子解析にて同定した癌特異的遺伝子を標的にした siRNA を用いた分子標的治療を開発してきた。これまでの癌に対して分子標的治療をおこなう上での問題として単一遺伝子しか標的にできないという点がある。癌の病態例えば増殖、浸潤に関しては増殖関連遺伝子、浸潤関連遺伝子が個別に発現しているのではなく同時に発現して複雑な癌の病態を作り出していると考えられる。単一遺伝子を標的にするのではなく、それぞれ機能の異なる複数の癌特異的遺伝子を遺伝子群として標的にすることが必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では複数の癌特異的遺伝子の発現の抑制による効果的な癌治療法を開発し、その実用化として臨床応用を目指すものである。最終目的は、複数遺伝子の抑制による効果的な癌治療法の開発による治療成績の向上である

### 3. 研究の方法

【癌特異的遺伝子：Nek2, FAK, TLK を標的にした siRNA の開発】

胆管癌の網羅的遺伝子解析にて同定した癌特異的遺伝子 Nek2 (NIMA related kinase 2) を標的にした Nek2 siRNA、FAK (Focal adhesion kinase) を標的にした FAK siRNA、TLK1 (Tousled like kinase 1) を標的にした TLK1 siRNA を作成した。

#### 【癌細胞株を用いた siRNA の機能解析】

胆管癌細胞株、乳癌細胞株、膵癌細胞株、大腸癌細胞株へ Nek2 siRNA、FAK siRNA、TLK1 siRNA を導入し、ウェスタンブロッティング法により Nek2、FAK、TLK1 のタンパク発現を検討した。また Nek2 siRNA と FAK siRNA の同時導入、Nek2 siRNA、TLK1 siRNA の同時導入による Nek2、FAK、TLK1 のタンパク発現をウェスタンブロッティング法により検討した。

【癌特異的遺伝子：Nek2、FAK、TLK の基礎的研究】

胆管癌細胞株、膵癌細胞株への Nek2 siRNA、TLK siRNA の単独導入および同時導入後、DNA アレイ法による網羅的遺伝子解析をおこない、シグナル伝達系を含めた作用機序について検討した。

【siRNA と抗癌剤の併用投与の有効性に関する検討】

siRNA と抗癌剤の併用療法の可能性について Nek2 siRNA と 5FU または CDDP の癌細胞株への併用投与による増殖能、アポトーシス誘導能への影響、TLK1 siRNA と CDDP の癌細胞株への併用投与による増殖能、アポトーシス誘導能への影響について検討した。

【担癌動物モデルを用いた siRNA の有効性および副作用の検討】

大腸癌皮下発癌モデルへの Nek2 siRNA と抗癌剤の併用投与により経時的な腫瘍体積の変化を観察し、その有効性、副作用について検討した。膵癌肝転移モデルに Nek2 siRNA を導入し肝転移巣数および大きさの変化を観察し、その有効性、副作用について検討した。

### 4. 研究成果

【癌特異的遺伝子：Nek2, FAK, TLK を標的にした siRNA の開発】

胆管癌の網羅的遺伝子解析にて同定した癌特異的遺伝子 Nek2 (NIMA related kinase 2) を標的にした Nek2 siRNA を 4 種類、FAK (Focal adhesion kinase) を標的にした FAK siRNA を 4 種類、TLK1 (Tousled like kinase 1) を標的にした TLK1 siRNA を 4 種類作成した。

【癌細胞株を用いた siRNA の機能解析】

胆管癌細胞株 HuCCT1、乳癌細胞株 MCF7、Hs578T、MDA-MB231、膵癌細胞株 KLM1、Mia Paca2、大腸癌細胞株 DLD1 へそれぞれ作製した 4 種類の Nek2 siRNA、FAK siRNA、TLK1 siRNA を導入した。それぞれの siRNA による Nek2、FAK、TLK1 のタンパク発現の抑制は可能であり、その抑制効果は 50 から 80% で siRNA 毎に異なっていた。

胆管癌細胞株 HuCCT1、乳癌細胞株 Hs578T に Nek2 siRNA と FAK siRNA の同時導入を行った。Nek2 と FAK の両方のタンパク発現の抑制が可能であったが、Nek2 の抑制による FAK

タンパク発現の増強および減弱効果は認めなかった。また FAK の抑制による Nek2 タンパク発現の増強および減弱効果も認めなかった。

大腸癌細胞株 DLD1、膵癌細胞株 KLM1 に対して Nek2 siRNA と TLK1 siRNA の同時導入を行った。Nek2 と TLK1 の両方のタンパク発現の抑制が可能であったが、Nek2 の抑制による TLK1 発現の増強および減弱効果は認めず、TLK1 の抑制による Nek2 タンパク発現の増強および減弱効果も認めなかった。Nek2、FAK、TLK1 の同時抑制による相乗効果は認めなかった。

【癌特異的遺伝子：Nek2、FAK、TLK の基礎的研究】

胆管癌細胞株 HuCCT1、膵癌細胞株 KLM1 への Nek2 siRNA、TLK siRNA の単独導入および同時導入後、DNA アレイ法による網羅的遺伝子解析をおこなった。Nek2 siRNA の単独導入での遺伝子発現と Nek2 siRNA と TLK siRNA の併用導入による遺伝子発現は異なっており、シグナル伝達系を含めた作用機序について現在解析中である。

【siRNA と抗癌剤の併用投与の有効性に関する検討】

胆管癌細胞株 HuCCT1 に対する Nek2 siRNA と 5FU の併用投与は Nek2 siRNA、5FU 単独投与と比較して、増殖の抑制とアポトーシスを亢進した。しかし、この作用は相加効果であり相乗効果ではなかった。また胆管癌細胞株 HuCCT1 への Nek2 siRNA と 5FU 併用投与 48 時間後に、DNA アレイ法による網羅的遺伝子解析を行った。Nek2 siRNA と 5FU 併用投与群では Nek2 siRNA 単独投与、5FU 単独投与群とは異なる遺伝子群の発現を認めており、現在解析中である。

次に大腸癌細胞株 DLD1 に関して Nek2 siRNA、CDDP 単独投与と Nek2 siRNA と CDDP 併用投与では、併用投与群において増殖抑制とアポトーシスの亢進を認め、この作用は相加効果であり相乗効果ではなかった。また大腸癌細胞株 DLD1 に関して Nek2 siRNA、CDDP 単独投与と Nek2 siRNA と CDDP 併用投与 48 時間後の遺伝子発現について PCR アレイによる遺伝子解析を行った。この結果アポトーシス関連遺伝子である BCL2L1 およびカスパーシス関連遺伝子である APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1) の亢進を認め、増殖に関連する遺伝子である FOS と JUN

の減弱を認めた。

さらに胆管癌細胞株において TLK1 siRNA と CDDP の併用投与は、TLK1 siRNA と CDDP 単独投与と比較して増殖能には関与していなかったが、アポトーシス誘導能を増強した。

【担癌動物モデルを用いた siRNA の有効性及び副作用の検討】

大腸癌皮下発癌モデルに対して Nek2 siRNA と 5FU 製剤である TS1 併用投与群では Nek2 siRNA の単独投与群、TS1 単独投与群と比較して、腫瘍増殖抑制に関して有意差は認めなかった。しかし Nek2 siRNA と CDDP 併用投与群においては単独投与群と比較して増殖抑制効果を認め、この効果は併用による相加効果であった。

膵癌細胞株 KP4 を用いたヌードラット肝転移モデルに脾静脈に留置したアクセスポートを用いて Nek2 siRNA を経門脈的に投与した。この結果、肝転移巣数の減少および各肝転移巣の腫瘍径の縮小を認め、アクセスポートを用いた門脈内への siRNA の薬剤投与方法が肝転移に対して有効であることを明らかにした。

## 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 4 件)

- ①Takayama Y, Kokuryo T, Senga T. (他6名)  
Silencing of Tousled-like kinase 1 sensitizes cholangiocarcinoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 296(1):27-34. 2010 査読有
- ②Suzuki K, Kokuryo T, Hamaguchi M. (他5名)  
Novel combination treatment for colorectal cancer using Nek2 siRNA and cisplatin. *Cancer Sci.* 101(5):1163-9. 2010 査読有
- ③Kawai K, Kokuryo T, Nagino M. (他 5 名)  
Inchinkoto, an herbal medicine, exerts beneficial effects in the rat liver under stress with hepatic ischemia-reperfusion and subsequent hepatectomy. *Ann Surg.* 251(4):692-700. 2010 査読有  
*Ann Surg.* 249(2):296-302. 2009 査読有
- ④Tsunoda N, Kokuryo T, Nagino M. (他 4 名)  
Nek2 as a novel molecular target for the

treatment of breast carcinoma. Cancer  
Sci.100(1):111-6.2009 査読有

[学会発表] (計 4 件)

① Kokuryo T, Senga T, Yokoyama Y, Nagino M,  
Hamaguchi M.

Nek2 as an effective molecular target for cancer  
treatment

AACR 101<sup>st</sup> annual meeting, Apr 17-21 2010,  
Washington DC, USA

② 國料俊男、横山幸浩、榑野正人

siRNA を用いた癌分子標的治療のトランス  
レーショナルリサーチ

JDDW 2010, 2010. 10. 13-16, 横浜

[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

國料 俊男 (KOKURYO TOSHIO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助  
教

研究者番号 : 60378023

### (2) 研究分担者

榑野 正人 (NGINO MASATO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 20237564

横山 幸浩 (YOKOYAMA YUKIHIRO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講  
座講師

研究者番号 : 80378091

上原 圭介 (UEHARA KEISUKE)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教  
研究者番号 : 50467320

(3) 連携研究者 なし

研究者番号 :

