

機関番号：16201
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591858
 研究課題名（和文） 泌尿生殖器癌に対する抗TRAIL受容体抗体併用抗癌化学療法の開発：動物モデル展開
 研究課題名（英文） Development of anti-TRAIL receptor antibody in combination with chemotherapeutic therapy against advanced genitourinary cancers : expansion of animal model

研究代表者
 呉 秀賢 (WU XIU-XIAN)
 香川大学・医学部・助教
 研究者番号：10346645

研究成果の概要（和文）：難治性・進行性腎癌、膀胱癌、前立腺癌に対する抗TRAIL受容体抗体併用抗癌化学療法の開発研究を行った。その結果、(1)抗TRAILデスレセプター2に対するモノクローナル抗体であるLexatumumabと臨床的投与可能な低濃度のアドリアマイシン、シスプラチン、エピルビシン、テラルビシンなどとの併用抗癌化学療法による相乗効果を発見した。(2)カスパーゼを阻害することにより相乗効果が抑制されることからカスパーゼカスケード、特にカスパーゼ8の活性化がこの相乗効果に重要であることを証明した。(3)PCR array解析で26個のアポトーシス関連遺伝子の発現変化を発見するなどの成果を得た。

研究成果の概要（英文）：Development of anti-TRAIL receptor antibody in combination with chemotherapeutic therapy against advanced genitourinary cancers was performed. We found: (1) anti-TRAIL death receptor 2 antibody lexatumumab in combination with clinically achievable concentrations of adriamycin, cisplatin, epirubicin, or pirarubicin had a synergistic cytotoxic effect; (2) the synergistic cytotoxicity was significantly inhibited by caspase inhibitors demonstrating caspase cascade, especially caspase-8 plays an important role in the synergy; (3) PCR array analysis identified 26 genes related with apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：TRAIL-R2、Lexatumumab、アドリアマイシン、腎癌細胞、カスパーゼ、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

遠隔転移を有する進行性腎癌、ホルモン療法抵抗性前立腺癌、進行性膀胱癌に対しては未だ効果的な治療法が確立されておら

ず難治癌と言える。進行性腎癌に対してはインターフェロン α 、インターロイキン γ 等の免疫療法やSorafenib, Sunitinib, Bevacizumab, Temsirolimus等の分子標的治

療が行われているが、その有効率は短期的で長期治療においては満足すべきものではない。アンドロゲン不応性前立腺癌に対する有効な化学療法はない。進行性膀胱癌に対してはM-VACなどの多剤化学療法により一定の奏効率が得られるが生存期間の延長につながっているといいがたい。

腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL) は腫瘍壊死因子ファミリーに属し、主に Death receptor 4 (DR4/TRAIL-R1) 及び DR 5 (TRAIL-R2) を介して癌細胞のみに対してアポトーシスを誘導し正常細胞には影響がないと報告されている (Lawrence et al., Nat Med, 7: 383-5, 2001)。TRAIL が DR4 または DR5 に結合すると、外因性及び内因性カスパーゼ カスケードを介して標的細胞に対してアポトーシスを誘導する。

最近我々は DR4 及び DR5 に対するモノクローナル抗体 Mapatumumab (HGS-ETR1) 及び Lexatumumab (HGS-ETR2) を米国 Human Genome Science, Inc. より提供され、これら 2 種の抗 TRAIL 受容体抗体が腎癌細胞に対して agonistic に作用し、TRAIL の単独療法より強力にアポトーシスを誘導することを見出した (Zeng et al., Int J Oncol, 28: 421-30, 2006)。SCID マウス及びヌードマウス腎癌移植モデルにおける in vivo での抗腫瘍効果も確認した。腎癌細胞以外でも膀胱癌及び前立腺癌細胞において in vitro での抗腫瘍効果を確認した (Shimada et al., Urology, 69: 395-401, 2007)。また、低濃度のアドリアマイシンによる腎癌細胞における DR4 を介したアポトーシス及び細胞障害活性の増強を報告した (Jin et al, J Urol, 177: 1894-1899, 2007)。さらに、低濃度のアドリアマイシンは腎癌細胞のみならず、前立腺癌、膀胱癌、肺癌等の固形癌細胞に対しても DR5 発現誘導を介してアポトーシス誘導増強を発見した (Wu et al., Cancer Science 98: 1969-1976, 2007)。しかしな

がら、抗 TRAIL 受容体抗体と低濃度の抗癌剤併用によるアポトーシス誘導機構については不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに我々が蓄積してきた成果を基盤として、主として難治性・進行性泌尿生殖器癌に対する新たな抗癌薬物療法の開発を目的とした。さらに抗 TRAIL 受容体抗体併用抗癌化学療法の分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) Lexatumumab と臨床的投与可能な低濃度のアドリアマイシン、シスプラチン、エピルビシン、テラルビシン等の抗癌剤との併用による抗腫瘍作用は MTT アッセイやトリバンブルーなどで測定し、併用効果は Isobolography で解析した。

(2) アポトーシスは Apoptosis Ladder Detection Kit と Cell Death Detection ELISA Kit で測定し、カスパーゼ活性は定量的な colorimetric アッセイで測定した。

(3) Super Array や Real time RT-PCR 等を用いて低濃度の抗癌剤による DR4, DR5 を介したアポトーシス誘導増強の分子機構を解析した。

4. 研究成果

(1) 腎癌細胞を Lexatumumab と低濃度のアドリアマイシン、5-fluorouracil、vinblastine または paclitaxel とで 24 時間併用処理したところ、アドリアマイシンとの組み合わせのみが相乗効果を示した。また、前立腺癌、膀胱癌、肺癌細胞に対しても同様な相乗効果が認められた。処理順序の影響を検討したところ、先にアドリアマイシンで処理した後 Lexatumumab で処理した方が逆の順序処理より腎癌細胞に対する細胞障害活性が有意に強かった。また、Lexatumumab は CDDP との併用で

も同様な相乗効果が確認された。さらに、アドリアマイシンより心臓への毒性が少ないとされるエピルビシン、テラルビシンも Lexatumumab との併用で腎癌細胞に対して相乗効果を示した。

(2) 低濃度アドリアマイシンは腎癌細胞におけるDR5のmRNAと蛋白発現量を明らかに増加させた。また、アドリアマイシンと Lexatumumab 併用処理によるカスパーゼ8、9、6、3の活性増強が観察された。興味深いことに、Lexatumumab と CDDP との併用によるカスパーゼ8活性増強はカスパーゼ8特異的阻害剤により抑制されるのみならずカスパーゼ9、6、3特異的阻害剤とVADによりも抑制された。以上の結果から、カスパーゼ8の活性化は上流のDR5由来のシグナルのみならず下流のカスパーゼ9、6、3による正のフィードバックによる影響も強く受けることが示唆された。

(3) アドリアマイシンより心臓への毒性が少ないとされるエピルビシン、テラルビシンも Lexatumumab との併用で腎癌細胞に対して相乗効果を示した。

(4) Super Array 解析により、Lexatumumab と低濃度抗癌剤に併用処理により、腎癌細胞における26個のアポトーシス関連遺伝子の発現変化が認められた。この内、PYCARD と CIDEA の遺伝子発現増加に関してはさらに定量的な Real time RT-PCR で確認された。

以上の結果より、Lexatumumab と低濃度抗癌剤による併用療法は、近い将来、実用化の可能性が高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Sugimoto M, Oka M, Tsunemori H, Yamashita M, Takehi Y. Effect of a phytotherapeutic agent, Eviprost®, on prostatic and urinary

cytokines/chemokines in a rat model of nonbacterial prostatitis. Prostate 71: 438-444, 2011 査読有

- ② Yanagawa H, Irahara M, Houchi H, Takehi Y, Moritoyo T, Nomoto M, Miyamura M, Shuin T. View and present status of personnel involved in clinical trials: a survey of participants from the First Symposium of the Shikoku Collaborative Group for Promotion of Clinical Trials. J Med Invest 58: 81-85, 2011 査読有
- ③ Takehi Y, Hirao Y, Kim WJ, Ozono S, Masumori N, Miyanaga N, Nasu Y, Yokomizo A. Bladder Cancer Working Group report. Jpn J Clin Oncol 40: 157-164, 2010 査読有
- ④ Kikuchi F, Imachi H, Murao K, Ohyama T, Miyai Y, Kushida Y, Haba R, Takehi Y, Ishida T. Positron emission tomography with 18F-fluorodeoxyglucose is a useful tool for the diagnosis of pheochromocytomas without distant metastasis, where malignancy is suspected on the basis of histopathologic analysis. Am J Med Sci 340: 160-163, 2010 査読有
- ⑤ 箕 善行. 転移性腎細胞癌に対する薬物療法の新たな展開. 臨床腫瘍プラクティス. 6, 342-352, 2010 査読無
- ⑥ 箕 善行, 呉 秀賢. II. 膀胱癌 基礎研究 総論 膀胱癌基礎研究の歴史と現状—将来展望も含めて—. 腎・泌尿器癌—基礎・臨床研究のアップデート— 68: 197-202, 2010 日本臨床 査読無
- ⑦ Wu X-X, Takehi Y, Jin X-H, Inui M, Sugimoto M. Induction of Apoptosis in Human Renal Cell Carcinoma Cells by Vitamin E Succinate in A Caspase-Independent Manner. Urology 73: 193-199, 2009 査読有

- ⑧ Niu YC, Liu JC, Zhao XM, WU X-X. A low molecular weight polysaccharide isolated from *Agaricus blazei* suppresses tumor growth and angiogenesis *in vivo*. *Oncol Rep* 21: 145-152, 2009 査読有
- ⑨ Li Y, Li X, Dai H, Sun X, Li J, Yang F, Gu H, Yong Y, Jin Z, Chu Y, Jin X, Takehi Y, Wu X-X. Thymidylate synthase was associated with patient prognosis and the response to adjuvant therapy in bladder cancer. *BJU International* 103: 547-552, 2009 査読有
- ⑩ Zhang C, Lv F, Zhou L, Li X, Wu XX, Hoffman RM. Effect of verapamil on the expression of EGFR and nm23 in lung cancer cells. *Anticancer Research* 29: 27-32, 2009 査読有
- ⑪ Wu X-X, Takehi Y. Enhancement of Lexatumumab-induced Apoptosis in Human Solid Cancer Cells by Cisplatin. *Clin Cancer Res*, 15: 2039-2047, 2009 査読有
- ⑫ Nough MA, Wu X-X, Okazoe H, Tsunemori H, Ahmed MA, Abou-Zeid AM, Inui M, Sugimoto M, Takehi Y. Expression of lysophospholipase D (autotaxin) and acylglycerol kinase enzymes in prostate cancer with relevance to clinicopathological parameters. *Cancer Sci* 100: 1631-1638, 2009 査読有
- ⑬ 杉元 幹史. 分子標的薬を用いた腎細胞がん著効例. *臨床腫瘍プラクティス* 5: 414-417, 2009 査読無
- ⑭ 呉 秀賢, 箕 善行. Agonistic antibodies to tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand death receptors and cancer therapy. *中華外科雑誌* 47(2), 2009 査読有
- ⑮ 箕 善行, 呉 秀賢. 【抗体を用いたが

ん治療の現状と問題点】腎癌 (Bevacizumab). *腫瘍内科* 3: 56-61, 2009 査読無

- ⑯ 箕 善行. 腎臓がんの分子標的治療—現状と問題点— *腫瘍内科* 4: 155-161, 2009 査読無

[学会発表] (計6件)

- ① 常森 寛行, 杉元 幹史, 末永 武寛, 矢野 敏史, 加藤 琢磨, 平間 裕美, 山下 資樹, 乾 政志, 箕 善行, 「ラット非細菌性前立腺炎モデルにおける前立腺および尿中サイトカイン・ケモカイン濃度の解析—エビプロスタット®投与の影響—」 第3回排尿障害モデル動物研究会 2010. 11. 26 静岡市
- ② 杉元 幹史, 常森 寛行, 箕 善行. 早期前立腺がんに対するPSA監視療法:患者選択と経過観察方法の標準化を目指して. 第48回日本癌治療学会 2010. 10. 30 京都市
- ③ 杉元 幹史, 常森 寛行, 神波 大己, 賀本 敏行, 白石 泰三, 小川 修, 箕 善行, StageT1c 前立腺癌に対するPSA監視療法 厚生省研究班(11-10)における全摘症例の検討. 第48回日本癌治療学会 2010. 10. 29 京都市
- ④ Wu X-X, Kato T, Hirama H, Tsunemori H, Zhang X, Yamashita M, Inui M, Sugimoto M, Takehi Y. Synergistic apoptosis of lexatumumab and cisplatin against human renal cell carcinoma cells in a caspase-dependent manner. 4st Chinese-Japanese Urological Association Meeting. October 20, 2010, Xian, China
- ⑤ 呉 秀賢, 常森 寛行, 乾 政志, 杉元 幹史, 箕 善行, ヒト固形癌細胞におけるシスプラチンによるCaspase依存症のLexatumumab誘導アポトーシスの増強.

第 69 回日本癌学会学術総会 2010. 9. 24
大阪市

- ⑥ Wu X-X, Inui M, Sugimoto M, Takehi Y. Synergistic induction of apoptosis in human solid cancer cells by Lexatumumab and cisplatin in a caspase-dependent manner. The 101th Annual Meeting for AACR. April 17-21, 2010, Washington, USA)
- ⑦ 呉 秀賢, 常森 寛行, 植月 祐次, 山下 資樹, 平間 裕美, 乾 政志, 杉元 幹史, 笥 善行. ヒト固形癌細胞におけるシスプラチンによるカスパーゼ依存性の Lexatumumab 誘導アポトーシスの増強. 第 19 回泌尿器科分子・細胞研究会 2010. 2. 13 神戸市
- ⑧ 笥 善行. 腎細胞癌に対する分子標的治療・現状と課題. 第 59 回日本泌尿器科学会中部総会 2009. 10. 31 金沢市
- ⑨ Noh MA, Wu X-X, Okazoe H, Tsunemori H, Abou-Zeid AM, Saleem MD, Inui M, Sugimoto M, Junken Aoki, Takehi Y. Expression of Lysophospholipase D (Autotaxin) and Acylglycerol kinase enzymes in Prostate Cancer cells with relevance to Clinicopathological parameters American Urological Association 2009 Annual Meeting. April 25-30, 2009, Chicago, USA
- ⑩ 呉 秀賢, アハメド ハメド, 常森 寛行, 乾 政志, 杉元 幹史, 影山 進, 吉貴 達寛, 笥 善行. 腎癌の新規分子マーカーとしての U7 メッセンジャーRNA. 第 97 回日本泌尿器科学会総会 2009. 4. 17 岡山市
- ⑪ 呉 秀賢, 常森 寛行, 植月 祐次, 山下 資樹, 上田 修史, 乾 政志, 杉元 幹史, 笥 善行. 固形癌細胞に対する低濃度アドリアマイシンと抗 DR5 モノクロナル抗体 Lexatumumab によるアポトーシ

ス増強効果. 第 18 回泌尿器科分子・細胞研究会 2009. 2. 13 鹿児島市

- ⑫ Noh MA, Wu X-X, Okazoe H, Tsunemori H, Abou-Zeid AM, Saleem MD, Inui M, Sugimoto M, Aoki J, Takehi Y. Expression of Lysophospholipase D (Autotaxin) and Acylglycerol kinase enzymes in Prostate Cancer cells with relevance to Clinicopathological parameters. 第 18 回泌尿器科分子・細胞研究会 2009. 2. 13 鹿児島市

[その他]

ホームページ等

<http://www.kms.ac.jp/~uro/links.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

呉 秀賢 (WU XIU-XIAN)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：10346645

(2) 研究分担者

常森 寛行 (TSUNEMORI HIROYUKI)
香川大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20380173

杉元 幹史 (SUGIMOTO MIKIO)
香川大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10243768

乾 政志 (INUI MASASHI)
香川大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40314918

笥 善行 (KAKEHI YOSHIYUKI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：20214273