

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20791109
研究課題名 (和文) Aurora-A を介する腎細胞癌及び前立腺癌の進展機構の解明および新規治療の開発
研究課題名 (英文) The significance of Aurora-A expression in prostate and renal cancer.

研究代表者
熊野 晶文 (KUMANO MASAFUMI)
神戸大学・医学部附属病院・医学研究員
研究者番号：30457105

研究成果の概要 (和文)：Aurora-A の発現抑制により、前立腺癌細胞および腎癌細胞の増殖能の有意な抑制が認められることを示した。また、Aurora-A の発現抑制により、抗癌剤感受性が亢進することを証明した。

研究成果の概要 (英文)：The suppression of Aurora-A remarkably inhibited cell growth in prostate and renal cancer cells, and enhanced the sensitivity of anticancer agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎泌尿器科学、泌尿器科

キーワード：前立腺癌、腎癌、Aurora-A、抗癌剤感受性、siRNA

1. 研究開始当初の背景

分裂期キナーゼの一つである Aurora キナーゼは生物種を超えて高度に保存された構造および機能を有し、細胞分裂期のさまざまなイベントを制御する中心的なキナーゼである。ヒトおよびマウスでは現在、Aurora-A、Aurora-B、Aurora-C の 3 種類の Aurora キナ

ーゼが同定されている。なかでも、主に Aurora-A、Aurora-B について癌との関連性が報告されており、癌細胞における両キナーゼの発現の意義が解析されつつある。

2. 研究の目的

Aurora-A は中心体の成熟・分離、双極性紡錘体の形成、G2 期から M 期への進入、染色体の赤道面への整列など、細胞分裂期に発現し、分裂期の中心体機能に関与するものであり、近年、癌との関連性も報告されており、癌細胞における Aurora-A 発現の意義が解析されつつある。そこで、本研究は上述の知見を踏まえて、ヒト前立腺癌細胞および腎癌細胞での Aurora-A 発現が癌細胞の悪性形質に与える影響を解析し、Aurora-A 発現を抑制することによる治療的意義を検討することにより、Aurora-A を標的とした新たな治療法を開発するため本研究を計画した次第である。

3. 研究の方法

I. in vitro での検討

1. 腎癌及び前立腺癌細胞株へのAurora-Aを標的にしたsiRNA発現プラスミドの導入

既知のAurora-Aに対するsiRNA

(Aurora-A/siRNA) を含むプラスミドを大腸菌にトランスフォーメーションし、そこから Aurora-A/siRNA プラスミド DNA を大量に抽出する。また同時に対照としてスクランブル配列を有する siRNA (Scramble/siRNA) を含むプラスミドもトランスフォーメーションを行い、Scramble/siRNA プラスミド DNA を抽出する。次に、抽出したプラスミド DNA をヒト腎癌 (Caki-2) 及び前立腺癌細胞株 (PC3) にリポフェクトアミン法にてトランスフェクションを行い、それぞれについて Aurora-A/siRNA プラスミド導入細胞株と Scramble/siRNA プラスミド導入細胞株を樹立する。プラスミド導入の有無は細胞より RNA 及び蛋白を抽出し、real time RT-PCR 法と Western Blotting にて、Aurora-A 発現レベルを評価することにより確認する。2. Aurora-A 発現阻害が腎癌及び前立腺癌細胞

株の悪性形質に与える影響

樹立された Aurora-A/siRNA 及び

Scramble/siRNA プラスミド導入細胞株を同条件下で培養し、経時的な細胞増殖能を MTT assay により比較検討する。また、寒天培地でのコロニー形成能を評価し、各細胞株間での足場非依存性増殖能に関しても評価する。次いで、トランスウェルチャンバーシステムを用いて、上記細胞株における細胞運動能を比較検討する。更に、細胞外基質をコートしたトランスウェルチャンバーシステムを用いて、細胞浸潤能を併せて評価する。

3. 腎癌及び前立腺癌細胞株における

Aurora-A 発現阻害と各種治療刺激に対する感受性との関係

各種治療刺激に対する Aurora-A/siRNA 及び Scramble/siRNA プラスミド導入細胞株の感受性の違いを評価する。用いる治療刺激としては各種抗癌剤 (Cisplatin、Docetaxel、Doxrubicin)、放射線、p53 発現アデノウイルス (Ad5CMV-p53)、各種アンチセンスオリゴ (clusterin、bcl-2、heat shock protein27、insulin-like growth factor binding protein-2 および insulin-like growth factor binding protein-5 を標的としたアンチセンスオリゴ) 等を予定している。また、感受性を評価するための手段としては、殺細胞効果、細胞周期および細胞死誘導に対する影響を、MTT assay、フローサイトメトリー、DNA ladder 検出等にて解析する。また、細胞周期およびアポトーシス誘導関連のシグナル伝達経路における Aurora-A 発現阻害の意義を検索するために、細胞周期およびアポトーシス関連蛋白の発現変化を Western blotting にて検討する。また、併用する治療刺激の種類により上述の各種効果に違いが生じるのか、あるいは治療の種類とは無関係にアポトーシス誘導刺激に対して普遍的に

認められる効果であるのかを併せて評価する。

II. in vivo での検討

1. 腫瘍増殖能および転移能の検討

ヌードマウスに腎癌及び前立腺癌細胞株の Aurora-A/siRNA プラスミド導入細胞と Scramble/siRNA プラスミド導入細胞を皮下接種し、経時的に腫瘍径を計測することにより腫瘍増殖能を評価する。また、我々の予備実験により Caki-2 及び PC3 は、マウス腎被膜下および前立腺に同所移植することにより、それぞれ肺およびリンパ節に転移巣を形成することが確認されている。よって、同様に Aurora-A/siRNA プラスミド導入細胞と Scramble/siRNA プラスミド導入細胞を同所移植することにより、Aurora-A 発現阻害が転移能へ及ぼす影響を評価する。

2. 各種治療の腫瘍増殖および転移抑制効果

先に検討した in vitro における各種治療刺激の感受性評価において、Aurora-A 発現阻害に伴い感受性が亢進した治療の in vivo における効果を検討する。例えば、in vitro において Cisplatin の感受性が亢進したとすると、腎癌及び前立腺癌細胞株の Aurora-A/siRNA プラスミド導入細胞と Scramble/siRNA プラスミド導入細胞を皮下および同所に移植し、Cisplatin および Vehicle 投与を行い、皮下腫瘍の増殖および同所移植後の転移巣形成の違いを比較検討する。また、腫瘍組織を採取し、免疫組織化学染色用にホルマリン固定後、パラフィンブロックを作製し、TUNEL 染色に供して、in vivo の腫瘍組織におけるアポトーシスの誘導率を併せて評価する。

4. 研究成果

Aurora-A を標的とした siRNA 発現プラスミドベクターをヒト前立腺癌細胞株である PC3

および腎癌細胞株である Caki-2 に導入し、Aurora-A siRNA 導入株 (PC3 or Caki-2/si) を樹立し、また、対照としてコントロールベクターのみを導入した細胞株 (PC3/co) を樹立した。Aurora-A 発現レベルの変化は siRNA 導入株における Aurora-A 発現が RNA レベルおよび蛋白レベルでコントロール株に比し抑制されていることを確認した。次いで、in vitro にて細胞増殖能を評価し、siRNA 導入株の増殖能がコントロールに比し有意に抑制されていることを確認した。また、siRNA 導入株の Cisplatin、Docetaxel、Doxrubicin に対する抗癌剤感受性を評価し。そのうち前立腺癌細胞株では Cisplatin および Docetaxel において抗癌剤感受性の亢進が認められ、なかでも Docetaxel に対してはより強い感受性亢進が認められた。腎癌細胞株では、何れの抗癌剤においても抗癌剤感受性の亢進が認められ、なかでも Docetaxel に対して同様により強い感受性亢進が認められた。次に in vivo にてヌードマウスに対し、siRNA 導入株およびコントロール株の皮下接種を行い、各々の腫瘍増殖能を評価したところ、siRNA 導入株の腫瘍増殖能がコントロール株に比し有意に抑制されていることを確認した。また、Docetaxel をそれぞれ siRNA 導入株およびコントロール株を接種したヌードマウスに投与したところコントロール株接種群に比し siRNA 導入株接種群で有意な抗腫瘍効果が認められた。以上のことから、前立腺癌細胞および腎癌細胞の Aurora-A 発現抑制により、細胞の増殖能は低下し、さらに Docetaxel を併用することで、より効果的に前立腺癌細胞および腎癌細胞の増殖が抑制される可能性が示唆された。

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1件)

- ① Kumano M, Miyake H, Terakawa T, Furukawa J, Fujisawa M. Suppressed tumour growth and enhanced chemosensitivity by RNA interference targeting Aurora-A in the PC3 human prostate cancer model. BJU Int. 2009 Nov 12. [Epub ahead of print], 査読有

〔学会発表〕(計3件)

- ① Masafumi Kumano, Hideaki Miyake, Atsushi Takenaka, Sadao Kamidono, Masato Fujisawa. Groth inhibition and enhanced chemosensitivity both in vitro and in vivo by downregulation of Aurora-A in human prostate cancer PC3 cells using small interfering RNA. American Urological Association Annual Meeting, 2009年5月, Chicago, USA
- ② 熊野晶文, 寺川智章, 古川順也, 村蒔基次, 倉橋俊史, 三宅秀明, 田中一志, 武中 篤, 藤澤正人. Aurora kinase Aを標的としたSmall interfering RNAによるヒト前立腺癌細胞株PC3 の進展抑制および抗癌剤感受性の亢進. 第67回日本癌学会学術総会, 2008年10月, 名古屋
- ③ 熊野晶文, 寺川智章, 倉橋俊史, 村蒔基次, 曾我秀雄, 三宅秀明, 田中一志, 武中 篤, 藤澤正人. ヒト前立腺癌細胞株PC3 におけるSmall interfering RNA (siRNA) 発現ベクターを用いたAurora-A 発現抑制の意義. 第96回日本泌尿器科学会総会, 2008年4月, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊野 晶文 (KUMANO MASAFUMI)

神戸大学・医学部附属病院・医学研究員

研究者番号: 30457105