

機関番号：31201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791120

研究課題名 (和文) 進行性腎細胞癌に対する活性型ビタミン D3 による抗腫瘍効果の解明と個別化医療の提供

研究課題名 (英文) Elucidation of the antitumor effect with active form vitamin D3 and the individualized medicine for the progressive renal cell carcinoma

研究代表者

小原 航 (OBARA WATARU)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：90337155

研究成果の概要 (和文)：外因性ビタミン D 製剤が正常腎細胞に与える影響はなく、腎癌細胞にビタミン D3 の投与を行うと CYP24 の活性が上昇したことより代謝経路の賦活化を認めた。ビタミン D3 には腎癌細胞増殖の抑制効果を認め、その作用機序はアポトーシスの誘導および細胞周期の停止が関与していた。また、分子標的薬とビタミン D3 の併用により CYP24 の活性が上昇し、細胞増殖抑制効果の増強を認めた。

研究成果の概要 (英文)： The exogenous vitamin D had no effect for normal kidney cell and showed the activation of the vitamin D metabolic pathway with activity of CYP24. Vitamin D3 had the suppression of the renal carcinoma cell proliferation and the mechanism of action was caused by induction of apoptosis and the cell cycle arrest. Activity of CYP24 also increased by combination of molecular target medicine and vitamin D3 and showed augmentation of the cytostatic effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：進行性腎細胞癌、活性型ビタミン D3、抗腫瘍効果、個別化医療

## 1. 研究開始当初の背景

体内に吸収されたビタミン D3 は腎臓で水酸化をうけ 1,25(OH)2D3 (活性型 vitamin D3) となり、その後 24-OHase (CYP24A1) により 1,24,25(OH)3D3 (不活性化) へと代謝される。活性型 vitamin D3 は分化誘導、抗腫瘍効果、血管新生阻害など多彩な生理作用を有する。

抗腫瘍効果は vitamin D receptor (VDR) を介した経路と epidermal growth factor receptor (EGFR) や insulin-like growth factor receptor 1 (IGFR1) などの経路を介して発揮される。VDR は核内受容体スーパーファミリーに属する転写調節因子として同定され、同じく核内受容体ファミリーの 1 つで

ある retinoid X receptor (RXR) とヘテロ二量体を形成し、vitamin D receptor element (VDRE) をプロモーター領域に有する標的遺伝子 (p21, hTERT など) と結合しその発現を正または負に調節すると考えられている。疫学的研究により vitamin D の暴露 (紫外線照射量) と癌 (前立腺癌、乳癌、大腸癌等) の発生率には逆相関があるという報告や in vitro および in vivo 系で活性型ビタミン D3 が細胞周期の抑制 (G1 arrest) やアポトーシスを介した抗腫瘍効果を誘導することなどが報告され、前立腺癌、乳癌、大腸癌の発生や抗腫瘍効果には活性型 vitamin D3 が関与することが明らかとなってきた。しかし腎細胞癌における活性型 vitamin D3 の抗腫瘍効果についての研究はほとんど行われていないのが現状である。

本研究では抗腫瘍効果の発現機序を明確にするとともに、抗腫瘍効果をより効率よく発揮させるための腫瘍側・宿主側因子を解明し、活性型 vitamin D3 による腎細胞癌の発生予防や治療の確立へと発展させることを目的とする。

## 2. 研究の目的

腎細胞癌において活性型 vitamin D3 がどのような機序で抗腫瘍効果を示すかは明らかとなっていない。そこで、臨床検体およびヒト腎癌培養株、マウス腎癌モデルを用いて in vitro, in vivo 両面から、活性型 vitamin D3 の腎細胞癌に対する抗腫瘍効果の作用機序を明らかにする。同様に正常腎細胞における活性型 vitamin D3 の影響やビタミン D 代謝酵素 (CYP27A1、CYP27B1、CYP24) の発現変化を観察する。臨床的には、進行腎癌症例に対して既存の interferon  $\alpha$  や interleukin-2 などの免疫療法や分子標的治療薬と活性型 vitamin D3 併用療法も含め、患者個々の遺伝子発現情報に基づいた治療体系の基盤構築を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト腎癌細胞株を用いたビタミン D 代謝酵素の発現検討：腎癌培養株 (Caki-1, Caki-2, ACHN) に 1, 25(OH)2D3 ( $10^{-7}$ ~ $10^{-9}$  M) 投与後、ビタミン D 代謝酵素 (CYP27A1、CYP27B1、CYP24) 遺伝子の発現検討を行う。24 時間、48 時間、72 時間で total RNA を回収し、cDNA に変換後に各代謝酵素遺伝子の発現を RT-PCR および real-time quantitative PCR により確認する。

(2) 活性型ビタミン D3 製剤による正常腎細胞株の変化：腎細胞癌の発生母地とされるヒト近位尿細管由来細胞株 (RPTEC) に活性型 vitamin D3 (1 $\alpha$ , 25(OH)2D3) を投与し、細胞の形態変化ならびに遺伝子群の変化を確認する。また、ビタミン D 代謝酵素 (CYP27A1、CYP27B1、CYP24) の遺伝子発現変化を real-time PCR 法および western blotting で検討する。

(3) 臨床における活性型 vitamin D3 の抗腫瘍効果の検討：転移性進行腎癌 70 症例に対して interferon- $\alpha$  (300 万単位 $\times$ 3/週) および vitamin D3 製剤 (1g/日内服) 併用療法の多施設共同前向き研究を行い、奏効率、予後因子等を明確にする。

(4) 活性型ビタミン D3 製剤と sunitinib 併用の抗腫瘍効果に関する検討：抗腫瘍効果の増強を目的として、腎癌培養株 (Caki-1, Caki-2, ACHN) に活性型ビタミン D3 (1 $\alpha$ , 25(OH)2D3) および sunitinib を添加し腫瘍増殖抑制効果を MTT assay 法で検討する。また、ビタミン D 代謝酵素に関して RT-PCR, western blotting で検討する。

(5) 活性型ビタミン D3 製剤によるマウス腎癌細胞への影響：雌性 BALB/C マウスに腎癌株 (Renca) を皮下移植し、活性型ビタミン D3 投与による腫瘍増殖抑制効果の検討を行った。活性型ビタミン D3 製剤は溶解し

マウスに内服させ、2週間でsacrificeした。作用機序について、Tunnel染色ならびにフローサイトメトリーによりアポトーシスや細胞周期の関与を検討した。さらに、ビタミンD代謝酵素に関してRT-PCR, western blottingで検討する。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト腎癌細胞株を用いたビタミンD代謝酵素の発現検討：腎癌細胞株（Caki-1, Caki-2, ACHN）におけるCYP27A1およびCYP27B1は、1,25(OH)2D3投与によって発現低下傾向にあった。一方、CYP24は1,25(OH)2D3投与により濃度依存性に発現が上昇した。腎癌細胞においてvitaminD3投与によるビタミンD代謝経路の活性化が示唆された。

(2) 活性型ビタミンD3製剤による正常腎細胞株の変化：活性型ビタミンD製剤の濃度( $10^{-7}$ ~ $10^{-9}$ )および時系列(12時間、24時間、36時間、72時間)ごとに、細胞変化を観察したが明らかな増殖抑制や形態変化を認めなかった。また、ビタミンD代謝酵素(CYP27A1、CYP27B1、CYP24)の遺伝子の明らかな発現低下および上昇は認めなかった。この結果、外因性のビタミンD製剤が正常腎細胞に与える影響はほとんどないと考えられた。

(3) 臨床における活性型vitamin D3の抗腫瘍効果の検討：16例の進行性腎癌患者に対して、インターフェロン $\alpha$ と活性型ビタミンD3を投与し抗腫瘍効果を検討した。4例(25%)の患者でPRを呈した。癌特異的平均生存期間は45ヶ月であった。1名のみ高カルシウム血症を認めたが、その他に重篤な有害事象を認めなかった。多変量解析の結果、初診時の有転移と68歳以上は予後不良因子と考えられた。本臨床研究の結果、進行性腎癌に対する活性型ビタミンD3投与は認容性が

あり抗腫瘍効果が期待できる。

(4) 活性型ビタミンD3製剤とsunitinib併用の抗腫瘍効果に関する検討：活性型ビタミンD3製剤単独に比較してsunitinibとの併用で腎癌増殖の抑制効果が増強された。また、ビタミンD代謝酵素(CYP27A1、CYP27B1、CYP24)遺伝子のうち、CYP24は活性型ビタミンD3製剤およびsunitinib併用により発現が上昇し、活性型ビタミンD3の代謝経路の活性化が示唆された。

(5) 活性型ビタミンD3製剤によるマウス腎癌細胞への影響：活性型ビタミンD3投与群の腫瘍体積は非投与群に比較して平均15%小さい傾向にあった。Tunnel染色の結果、腫瘍内にはアポトーシス細胞を有意に認め、フローサイトメトリーの結果、G1 arrestによる細胞周期の抑制を認めた。また、ビタミンD代謝酵素(CYP27A1、CYP27B1、CYP24)遺伝子のうち、CYP24は活性型ビタミンD3投与によりRNAレベルおよび蛋白レベルにおいても発現が上昇しており、in vivoにおいても代謝経路の活性化が示唆された。

#### 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4件)

① Fujioka T, Obara W. Evidence-based clinical practice guidelines for renal cell carcinoma (Summary--JUA 2007 Edition). Int J Urol 16, 339-353, 2009

② Obara W, Mizutani Y, Oyama C, Akaza H, Ishii N, Kohri K, Namiki M, Okuyama A, Shima H, Yokoyama M, Shuin T, Miki T, Watanabe Y, Fujioka T. Prospective study of combined treatment with interferon-alpha and active vitamin D3 for Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma. Int J Urol 15, 794-799, 2008

③Obara W, Konda R, Akasaka S, Nakamura S, Sugawara A, Fujioka T. Prognostic significance of vitamin D receptor and retinoid X receptor expression in renal cell carcinoma. J Urol. 178, 1497-503, 2007

④Obara W, Suzuki Y, Kato K, Tanji S, Konda R, Fujioka T. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with increased risk and progression of renal cell carcinoma in a Japanese population. Int J Urol. 14, 483-7, 2007

[学会発表] (計 0 件)

[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

小原 航 (OBARA WATARU)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 90337155

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :