

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791466

研究課題名（和文）アポトーシス抑制因子サバイピンをターゲットとした新規分子標的癌治療の研究

研究課題名（英文） The study of the new molecular cancer treatment targeting for apoptosis inhibitor survivin.

研究代表者

小池 秀和 (KOIKE HIDEKAZU)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90420091

研究成果の概要（和文）：

前立腺癌において、survivin が細胞増殖に関与していること、および、シンバスタチンの抗腫瘍効果、細胞増殖抑制増感効果に重要な役割を果たしていることを示唆した。また、 $1\alpha, 25(OH)2D3$ の前立腺癌細胞に対する増殖抑制機序、および細胞増殖抑制増感効果に survivin が関与している可能性を示した。

腎癌においては、simvastatin の腎癌細胞抑制効果に、IGF1 シグナル、survivin が関与している可能性を示し、simvastatin 耐性機序に survivin が関わることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

We suggested that survivin have significant associations with prostate cancer cell proliferation, plays an essential role in simvastatin induced cell growth inhibition, and plays an essential role in active D3 induced cell growth inhibition in prostate cancer. The elimination of Survivin would be also a potential candidate for a novel approach to treat prostate cancer.

In renal cell cancer, simvastatin has anticancer effect being associated with IGF-1r. Survivin is associated with simvastatin resistance of renal cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：分子生物学

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：サバイピン、前立腺癌、腎癌

1. 研究開始当初の背景

泌尿器科疾患において前立腺癌をはじめとした悪性腫瘍の頻度は著しく増加してお

り、その新しい治療法の確立は急務である。近年、「分子標的」の概念が確立され、そのメカニズムに直接働く分子から新しい薬剤の開発も可能となった。われわれは、腫瘍細

胞で発現しているアポトーシス抑制タンパクの一つである Survivin (サバイビン) にターゲットを絞り、前立腺癌および腎癌における Survivin の役割とくに、細胞増殖における効果と、Survivin の抑制による抗腫瘍効果のメカニズムを検討してきた。

2. 研究の目的

(1) in vivo での siRNA 導入、特に経静脈内投与の試みなど実際の臨床に還元可能な条件の設定。

(2) Survivin に関連したセカンドメッセンジャー遺伝子の同定。

(3) 実際臨床で使用されているもしくは今後使用される新規の抗腫瘍薬や、現時点では抗高脂血症など抗腫瘍目的以外に用いられる薬、食材と Survivin 抑制との併用による抗腫瘍効果増感の確認。

(4) Survivin に影響をおよぼす薬剤の同定。

等を検討する。

3. 研究の方法

ヌードマウス皮下移植モデル

ヌードマウスに前立腺癌細胞 LNCaP, PC-3, DU145, 腎癌細胞 Caki1, KMRC1 を移植する腫瘍モデルを用いた in vivo の検討を行う。Survivin の siRNA (Qiagen) をトランスフェクト試薬 HiPerfect Transfection Reagent (Qiagen) とともに直接腫瘍内に投与し、腫瘍増殖への影響を確認する。siRNA 20 μ g を day0, 7, 14 に腫瘍内投与を基準とし、腫瘍抑制効率の良い条件を模索する。

臨床応用を目指し、経静脈的な siRNA 投与の条件設定を行い検討する。siRNA のデリバリー方法にはハイドロダイナミックス導入法、ウイルスベクター、リポソームを用いた方法も報告があるが、コラーゲンを用いた方法も報告されており、まずこれを試みる。AteroSiLence 社の AteroGene Systemic Use を使用する。

得られた組織からは Survivin に関連したセカンドメッセンジャー遺伝子の候補を検討するため、cDNA マイクロアレーにて遺伝子発現の包括的な解析により遺伝子の同定を試みる。この検討から、Survivin の発現の変化に伴う遺伝子群を同定する。個別にはサバイビン系特にアポトーシス関連蛋白である XIAP, Bcl-2, Caspase3, PARP (poly-ADP-ribose-polymerase) について評価する。

既存の抗がん剤などでは、薬剤の効果を予測する上でバイオマーカーの同定は重要である。Survivin siRNA による治療においても治療有効群と非有効群との差が予想され、マイクロアレーにてのバイオマーカーの同定

を行い研究を発展させる。

ビタミンD 類による抗腫瘍効果の確認、増強の試み (前立腺癌)

我々は活性型ビタミン D3 の前立腺癌細胞増殖抑制作用機序に survivin の抑制を証明し、さらにホルモン抵抗性前立腺癌細胞では siRNA によるサバイビン発現の抑制によって活性型ビタミン D3 の抗腫瘍効果が増強されることを証明した。ひき続き in vivo で、前述の survivin siRNA 静脈投与に加え、活性型ビタミン D3 の腹腔内投与での検討を行う。また、in vivo では天然ビタミン D が肝、腎にて活性化されるため、天然ビタミン D2, D3 の経口投与での検討も試みる。

抗癌剤 (ドセタキセル DOC) の抗腫瘍効果増強の試み (前立腺癌)

現在臨床で使用されはじめた DOC の抗腫瘍効果の、survivin siRNA による増強作用を in vitro および in vivo で検討する。in vitro では増殖抑制効果を MTS アッセイ、フローサイトメトリーによるアポトーシスアッセイによって検討する。in vivo では、前述の survivin siRNA 静脈投与に加え、DOC はこれまでの文献から 10mg/kg の day0, 7, 14 に腹腔内投与を基準とする。

高脂血症治療剤の抗腫瘍効果の確認と survivin 発現抑制による抗腫瘍効果増強の試み (腎癌)

我々はコレステロール合成に関与する酵素のひとつである farnesyl-diphosphate farnesyltransferase-1 (FDFT-1) の阻害が腎癌細胞増殖抑制作用を持つことを明らかにした。さらにこれも survivin 同様 in vivo にて FDFT-1 siRNA 導入による検討を行う。また FDFT-1 阻害と survivin との関連も検討する。

分子標的薬である血管新生因子 VEGF 阻害薬、mTOR 阻害剤との相乗効果の確認 (腎癌)

近年、血管新生因子 VEGF や mammalian target of rapamycin (mTOR) をターゲットとした分子標的薬が開発され、腎癌において日本ではすでに VEGF 阻害剤、海外では mTOR 阻害剤 (rapamycin) の効果が認められている。Survivin と異なる経路をターゲットとした分子標的薬を併用することで、相乗効果を認めるかどうかの検討を行う。

Survivin に影響をもたらす因子の検討 (腎癌、前立腺癌)

前立腺癌モデルでは、去勢、抗男性ホルモン剤、大豆イソフラボンとの、腎癌ではインターフェロン、分子標的薬などによる Survivin 遺伝子変化や、Survivin siRNA 併用によるア

ポトースの増強効果の有無を検討する。前立腺癌、腎癌共通のものとしてNSAID、スタチン等も検討する。最終的に survivin を抑制するような物質を発見し、survivin に関連した予防医学への応用にも発展させる。

4. 研究成果

前立腺癌では、*in vitro* and *in vivo* において、survivin 遺伝子に対する siRNA 導入により、前立腺癌細胞 LNCaP, PC-3 の細胞増殖が有意に抑制された。続いて、シンバスタチンの抗腫瘍効果につき検討した。PC3 では、低用量および高容量のシンバスタチンともに、survivin 遺伝子発現を減少させ、細胞増殖を抑制した。一方、LNCaP では、低用量シンバスタチンでは、survivin 遺伝子発現は減少せず、細胞増殖も抑制されなかった。しかし、survivin 遺伝子に対する siRNA 導入により survivin 遺伝子発現が抑制された状況では、低用量シンバスタチンは細胞増殖を抑制した。これらは、survivin が前立腺癌の増殖に関与していること、および、シンバスタチンの抗腫瘍効果、細胞増殖抑制増感効果に重要な役割を果たしていることを示唆した。(欧州泌尿器科学会 2010 年年次総会)

また、活性型ビタミン D である $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と survivin 発現の関連につき検討した。

LNCaP において $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の濃度依存性に細胞増殖が抑制された。一方、DU145 においては細胞増殖抑制をきたさなかったものの、siRNA による survivin mRNA の発現抑制下では、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により DU145 細胞増殖が抑制された。 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の前立腺癌細胞に対する増殖抑制機序、および細胞増殖抑制増感効果に survivin が関与している可能性が示唆された(日本泌尿器科学会 2010 年年次総会)(J Urol. 2011 Apr;185(4):1497-503.)

腎癌では、腎癌細胞 caki1 および KMRC1 におけるシンバスタチンの抗腫瘍効果と survivin, IGF1 シグナルとの関連につき検討した。caki1 では simvastatin により細胞増殖が抑制された。一方 KMRC1 では認められなかった。caki1 では simvastatin により IGF1r, survivin mRNA 発現が抑制された。また IGF1 により survivin mRNA 発現が増加し、IGF1r siRNA により細胞増殖が抑制された。また survivin siRNA により、caki1 細胞増殖が抑制された。これらより、simvastatin の腎癌細胞抑制効果に、IGF1 シグナル、survivin が関与している可能性が示唆された。一方、caki1 を移植したヌードマウスでの検討でも、simvastatin により caki1 腫瘍の増殖抑制効果が認められた。しかし、simvastatin 治療においても残存した caki1 腫瘍では、survivin の発現は増強していた。

そこで、simvastatin に耐性をもった caki1 を *in vitro* で作成したところ、survivin は強発現していた。ここで、simvastatin 耐性 caki1 において、siRNA により survivin を抑制した状態とし、simvastatin 投与をおこなったところ、simvastatin の細胞増殖抑制効果が認められるようになった。同様に、simvastatin に耐性をもった KMRC1 でも、siRNA による survivin 抑制下では、simvastatin の細胞増殖抑制効果が認められた。以上より、simvastatin 耐性細胞では、survivin 発現を抑制することで、simvastatin の抗腫瘍効果が発現することを見出し、今後臨床で問題となりつつある薬剤耐性腎癌に対する治療へのアプローチになる可能性が示唆された。(米国泌尿器科学会 2010, 2011 年年次総会、日本癌治療学会 2010 年年次総会) など。

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)

①Hidekazu Koike, et al.

Survivin is associated with cell proliferation and has a role in $1\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ induced cell growth inhibition in prostate cancer.

Journal of Urology 185, 2011. p1497-1503 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

①Hidekazu Koike, et al.

High-fat diet increased renal cancer growth, and the antitumor sensitization effect due to survivin inhibition in simvastatin treatment for renal cancer cells.

第 106 回 米国泌尿器科学会年次総会

2011 年 5 月 15 日

アメリカ ワシントン DC

②小池 秀和、ら

再燃前立腺癌に対するドセタキセル療法の検討。

第 99 回 日本泌尿器科学会総会

2011 年 4 月 23 日

名古屋

③小池 秀和、ら

スタチンの survivin 抑制による腎癌細胞増殖抑制効果

第 48 回 日本癌治療学会学術集会

2010 年 10 月 29 日

京都府、左京区宝ヶ池

④Hidekazu Koike, et al.

Statin inhibits the proliferation of human renal cancer cells via down-regulation of the survivin through IGF-1 signaling.

第 105 回 米国泌尿器科学会年次総会

2010 年 5 月 30 日

アメリカ、サンフランシスコ

⑤小池 秀和、ら

前立腺癌細胞におけるビタミン D3 (1 α ,25(OH)2D3) の抗腫瘍効果と survivin 発現の関連

第 98 回 日本泌尿器科学会総会

2010 年 4 月 27 日 岩手県、盛岡市

⑥Hidekazu Koike, et al.

Statin inhibits the proliferation of human prostate cancer cells via down-regulation of the survivin.

第 25 回 欧州泌尿器科学会年次総会

2010 年 4 月 19 日 スペイン、バルセロナ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 秀和 (KOIKE HIDEKAZU)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90420091

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：