

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591889

研究課題名(和文)悪性褐色細胞腫の悪性化機序と分子標的薬の作用機序の基礎研究

研究課題名(英文)Basic research of mechanism of malignant pheochromocytoma

研究代表者

原 尚人(Hara, Hisato)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80189688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では悪性褐色細胞腫の発症機序及び新しい治療薬である分子標的薬の作用機序について検討することを目標として研究を行った。まずラット褐色細胞腫 cell line PC12 を mTOR 阻害薬やスニチニブで処理し、その効果を検討した。その結果、mTOR およびその下流の S6K1 と 4EBP が抑制されていた。抗増殖効果の可能性が示唆された。またアポトーシスの亢進が認められた。オートファジーを抑制し、スニチニブによる作用を検討したところ、アポトーシスや細胞増殖抑制効果が亢進することが示された。つまり、PC12 においてはオートファジーの抑制によってスニチニブに対する薬剤感受性が高まる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This research was performed to explore the malignant potential of pheochromocytoma and the mechanism of effect of molecular targeted therapy. We examined that Rat pheochromocytoma cell line PC12 was treated with mTOR inhibitor and Sunitinib. Antiproliferative effect and the increase of apoptosis effect was showed.

We demonstrated that sunitinib significantly increased the levels of LC3-II. Following sunitinib treatment, immunofluorescent imaging revealed a marked increased punctate LC3-II distribution. Inhibition of autophagy by siRNAs targeting Atg13 or by pharmacological inhibition with ammonium chloride, enhanced both sunitinib-induced apoptosis and anti-proliferation. Inhibition of autophagy may be a promising therapeutic option for improving the anti-tumor effect of sunitinib.

研究分野：内分泌外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：褐色細胞腫 mTOR

### 1. 研究開始当初の背景

褐色細胞腫は、カテコアミンを産生する腫瘍で、8割の患者は手術で摘出すれば治癒する(良性褐色細胞腫)。一方、悪性化した場合は、比較的若年で遠隔転移を来し、進行性に増悪する罹病期間の長い予後不良な疾患である。原因は不明で、良性との鑑別診断、根本的な治療法が確立していない。

最近同定された SDHB・SDH 遺伝子は、ミトコンドリア内膜に存在し TCA 回路および電子伝達系酵素複合体の一部でもあるコハク酸脱水素酵素(複合体)のサブユニットをコードする遺伝子であり、家族性褐色細胞腫・パラガングリオーマ症候群(hereditary pheochromocytoma-paraganglioma syndrome: HPPS)の原因である。遺伝形式は常染色体優性遺伝で浸透率は 90%以上であるとされる。これら SDHB・SDH 遺伝子はいずれもがん抑制遺伝子として働く。特に SDHB の変異は腹部のパラガングリオーマを初発とし、その後高率に遠隔転移(悪性化)を引き起こすことから悪性褐色細胞腫の早期診断マーカーになり得ると考えられ注目されている。これらの遺伝子やそれを指標とする良悪性の鑑別とそれに基づく適切な早期治療は、今後最も推進されるべき分野である。

### 2. 研究の目的

悪性褐色細胞腫は内分泌疾患の中で代表的な難治性疾患にもかかわらず、研究は欧米に比して大変遅れている。悪性化の原因は不明で、有効な治療法が確立していない。そこで、本研究では同疾患の発症機序及び新しい治療薬である分子標的薬の作用機序について検討することで、より安全な分子標的薬使用、新たな創薬、新規悪性マーカーの同定等、新たなブレイクスルーにつなげる事を目標とした。

### 3. 研究の方法

Sunitinib: 今回の実験の目的は、クロマフィン細胞自身における Sunitinib の作用点を同定し検討する事である。既に以下の知見を得ている。PC12 細胞において Sunitinib で 1) アポトーシス促進と抗増殖作用を示した。2) Akt、BAD それぞれのリン酸化の減少が見られた。3) Bcl-2、Bcl-xL タンパクの減少が見られた。3) mTOR および下流の S6K のそれぞれのリン酸化が抑制された。4) HIF-1 $\alpha$  には影響を認めなかった。5) TH が抑制された。6) MAP キナーゼ中、ERK は抑制されたが JNK と P38 は影響をされなかった。以上より、Sunitinib は血管新生のみならず腫瘍細胞自身にも抗腫瘍効果とカテコールアミン合成低下作用を示す可能性がある。S6K の強発現と siRNA によるノックダウンによりさらに S6K とアポトーシス促進の関係を確認する予定であった。

mTOR 阻害薬; p53 や PTEN などの癌抑制遺伝子はヒト腫瘍細胞において高率に変異が

認められることが知られているが、これらの遺伝子に変異を持つ細胞は mTOR 阻害薬に対して高感受性である。Huang らは、変異 p53 を発現する細胞はラパマイシン処置によってアポトーシスが誘導されるのに対し、正常な p53 を導入することによりアポトーシスが回避されることを報告している(Cancer Res. 2001; 61: 3373-81)。mTOR が HIF-1 活性化経路の上流に位置すること、mTOR 阻害薬の抗腫瘍活性には細胞の低酸素に対する反応を抑制する作用が一部関与することも推察されている(Hudson et al. Mol Cell Biol. 2002; 22: 7004-14)。また、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発現も抑制されることが報告されている(Guba et al. Nat Med. 2002; 8: 128-135)。さらに抗腫瘍作用の他にも、本薬物は多発性硬化症の治療薬としても臨床試験が進められており、癌や免疫、炎症などの分野を中心に今後さらなる臨床への応用が期待される。同様の効果が褐色細胞腫においても期待されるところであり、今回ラット褐色細胞腫 cell line PC12 で Rapamycin, Everolimus の効果、作用起序を検討した。

PC12 を Sunitinib, Rapamycin, Everolimus で処理した場合の発現プロファイルをマイクロアレイやプロテオミクスを検討した。腫瘍縮小やカテコルアミン低下等の治療効果にかかわる特異的な経路を明らかにし、その理論的根拠を明らかにする。将来的には新規分子標的治療への応用を考えたい。また、本研究は他の薬剤との併用、同薬剤の事前の効果判定の予測法の確立等の様々なプロジェクトへ発展・応用が期待できるものと考えた。

### 4. 研究成果

本研究では悪性褐色細胞腫の発症機序及び新しい治療薬である分子標的薬の作用機序について検討することを目標として研究を行って来た。褐色細胞腫の原因遺伝子として最近発見された TMEM127 は mTOR の活性を負に制御している遺伝子であり、本邦からの 2 症例が報告されている(Takeichi N et al. Clinical Endocrinology in press)。同遺伝子の変異例では mTOR 阻害薬投与の効果が期待できる。まずラット褐色細胞腫 cell line PC12 を mTOR 阻害薬である Everolimus で処理し、その効果を検討した。Everolimus 12 時間刺激後の変化をウェスタンブロッティングにより検出した結果、mTOR およびその下流の S6K1 と 4EBP が抑制されていた。抗増殖効果の可能性が示唆された。また ELISA 法ではアポトーシスの亢進が認められた。

mTOR 阻害薬はオートファジーの活性を誘導する薬剤としても注目されている。PC12 を Everolimus で 24 時間刺激するとオートファジーに関連する LC3- $\beta$  の増強が認められた。mTOR 阻害薬と同様に Sunitinib を用いても LC3- $\beta$  の増強を認めた。オートファジーは

腫瘍の増殖に重要な働きをしていると考えの増殖を抑制する働きをしているという報告がある一方、特定の環境下においては腫瘍細胞を保護するような働きを示すという報告も認めるのが現状である。そこで Atg13 のノックダウンやオートファジーを抑制する薬剤（塩化アンモニウム）を使用しスニチニブによる作用を検討したところ、アポトーシスや細胞増殖抑制効果が亢進することが示された。つまり、PC12 においてはオートファジーの抑制によってスニチニブに対する薬剤感受性が高まる可能性が示された。

#### 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）

Tatsuhiko Ikeda, Kiyoko-aki Ishii, Yuria Saito, Masahiro Miura, Aoi Otagiri, Yasushi Kawakami, Hitoshi Shimano, Hisato Hara, Kazuhiro Takekoshi. Inhibition of autophagy enhances sunitinib-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma PC12 cells, J Pharmacol Sci. 121(1), 2012, 67-73 査読有 DOI : 10.1254/jphs.12158FP

Yuichi Aita, Kiyoko-aki Ishii, Yuria Saito, Tatsuhiko Ikeda, Yasushi Kawakami, Hitoshi Shimano, Hisato Hara, Kazuhiro Takekoshi. Sunitinib inhibits catecholamine synthesis and secretion in pheochromocytoma tumor cells by blocking VEGF receptor 2 via PLC- $\gamma$ -related pathways, American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. Aug 21, 2012 査読有 DOI : 10.1152/ajpendo.00156.2012.

Naomi Takeichi, Sanae Midorikawa, Atsushi Watanabe, Banyar Than Naing, Hideki Tamura, Toshiko Kano, Hitoshi Sugihara, Sumiko Nissato, Yuria Saito, Yuichi Aita, Kiyoko-aki Ishii, Takehito Igarashi, Yasushi Kawakami, Hisato Hara, Tatsuhiko Ikeda, Kazuo Shimizu, Shinichi Suzuki, Hitoshi Shimano, Masashi Kawamoto, Takashi Shimada, Tsuyoshi Watanabe, Shinichi Oikawa, Kazuhiro Takekoshi. Identical germline mutations in the TMEM127 gene in 2 unrelated Japanese patients with bilateral pheochromocytoma, Clinical Endocrinology. Apr 27, 2012 査読有 DOI : 10.1111/j.1365-2265.2012.04421.x.

Yuria Saito, Yuko Tanaka, Yuichi Aita, Kiyoko-aki Ishii, Tatsuhiko Ikeda, Kazumasa Isobe, Yasushi Kawakami, Hitoshi Shimano, Hisato Hara, Kazuhiro Takekoshi. Sunitinib induces apoptosis in pheochromocytoma tumor cells by inhibiting VEGFR2/Akt/mTOR/S6K1 pathways through modulation of Bcl-2 and BAD, American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. Mar 15;302(6):E615-25, 2012 査読あり DOI : 10.1152/ajpendo.00035.2011.

##### 〔学会発表〕（計 3 件）

池田達彦、石井清朗、竹越一博、島野仁、原尚人、ラット褐色細胞腫細胞 PC12 においてスニチニブによるアポトーシス作用はオートファジー抑制により亢進する、日本外科学会、2014 年 4 月 4 日、京都  
池田達彦、石井清朗、竹越一博、島野仁、原尚人、mTORC1 および mTORC2 阻害のラット褐色細胞腫細胞に対する作用機序の検討、日本内分泌外科学会、2013 年 5 月 23 日、山形  
池田達彦、石井清朗、竹越一博、島野仁、原尚人、mTOR 阻害薬のラット褐色細胞腫細胞に対する作用機序の解明、日本内分泌外科学会、2011 年 7 月 7 日、東京

##### 〔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

原 尚人 (HARA, Hisato)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80189688

(2)研究分担者

竹越 一博 ( TAKEKOSHI KAZUHIRO )

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40261804

(3)研究分担者

石井 清朗 ( ISHI KIYOAKI )

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30419150

(H23-H24)