

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592384

研究課題名(和文)新規癌関連タンパク質GGCTを標的としたRNA干渉による尿路上皮癌治療の開発

研究課題名(英文)Development of anticancer therapy with GGCT targeting siRNA for urothelial tumor

研究代表者

影山 進 (Kageyama, Susumu)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：50378452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：GGCT (γ-glutamyl cyclotransferase) を標的としたRNA干渉による尿路上皮癌治療の有用性を検討した。

筋層非浸潤性膀胱癌標本の免疫染色では、高発現が64%の症例に認められた。術後5年非再発率は高発現群が30%、低～無発現群が57%であり、高発現群で再発が多かった。UMUC-3へのGGCT siRNA処置では有意な増殖抑制を認め、また、アドリアマイシンの併用投与では、アドリアマイシン単独に比べて相加的な増殖抑制を示した。以上より、GGCTを標的としたsiRNA投与による尿路上皮癌治療は有用な方法と思われた。引き続き、担癌マウスでの治療効果と有害事象の評価を行っている。

研究成果の概要(英文)：We evaluated a utility of GGCT targeting therapy with RNAi for urothelial cancer. In immunohistochemical analysis of surgical specimens of non-muscle invasive bladder cancer, high expression was revealed in 64% of the patients. The five-year recurrence free survivals of high and low-no GGCT expression groups were 30% and 57%, respectively. Significant antiproliferative effect via GGCT targeting siRNA was shown in UMUC-3 cells, and combination treatment consisting of Adriamycin and GGCT siRNA reduced cell viability more than the treatment with Adriamycin alone. According to our results, GGCT can be a useful treatment target with RNAi for urothelial cancer. We continue the treatment experiment of tumor-bearing mice by administration GGCT siRNA, and evaluate therapeutic effects and adverse events.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：γ-グルタミルシクロトランスフェラーゼ RNA干渉 尿路上皮癌

1. 研究開始当初の背景

われわれは尿路上皮癌の診断・治療の標的となる特異タンパク質を求めて長年研究してきた。このようなタンパク質をスクリーニングする目的で、プロテオミクス的手法を用い、尿路上皮癌組織と正常尿路上皮とを試料としてプロテオーム解析を網羅的に行ってきた。これにより尿路上皮癌で高発現しているタンパク質群を同定した。これらのひとつであるカルレティキュリンでは多数の膀胱癌組織および患者尿から高率に検出でき、新規診断マーカーとしての有用性を報告した (Kageyama, Clin Chem, 2004; Kageyama, Int J Urol, 2009)。以上の結果はわれわれのプロテオーム解析技術の信頼度を裏付けた。今回申請の GGCT (別名 C7orf24, CRF21) も上記のタンパク質群のひとつとして同定したものである。

われわれが GGCT を同定した 2001 年当時、機能はおろかタンパク質としての存在も明らかではなかった。われわれは解析結果からこのタンパク質の実在を確信し、リコンビナントタンパク質を作製してモノクローナル抗体の樹立に成功した。当初の結果を検証すべく、ウエスタンブロットで多数の臨床検体を検討し、やはり癌組織で実在するタンパク質であり、しかも正常組織に比べて明らかに高発現していることを確認した。また、膀胱癌に限らず各種の癌細胞株でも高発現していることを確かめた。つづいて GGCT の癌細胞における機能を明らかにする目的で、遺伝子導入および抑制実験を行った。NIH3T3 細胞に GGCT 遺伝子を導入した安定発現株を樹立し増殖促進が見られることを確認した。一方、悪性形質転換は認めず癌化能はないものと結論した。また、RNA 干渉実験では複数の癌細胞株において cell viability の低下を認めた (Kageyama, Proteomics Clin Appl, 2007)。以上の経緯から今回申請の研究を計画した次第である。

近年まで実在タンパク質との認知が無かったため GGCT に関する論文は数少ない。2006 年 Masuda らはアポトーシス誘導物質を白血病細胞株に投与した際に、細胞質画分に放出される 21kDa の物質として GGCT を同定した。HeLa 細胞にこの遺伝子を導入するとチトクローム C 放出を経てアポトーシスを導くことを見出し、彼らは GGCT を cytochrome c-releasing factor 21 (CRF21) と名付けた (Biochem Biophys Res Commun)。2008 年 Oakley らはグルタミン回路で長年未同定であった酵素 gamma-glutamyl cyclotransferase (GGCT) として報告し、現在データベース上ではこの名称が用いられている。彼らはわれわれの論文を引用しているが、報告内容は新酵素の発見、立体構造決定、酵素活性の解析で癌との関わりには触れていない (J Biol Chem)。2009 年 Azumi らはラットの乳癌細胞株より抽出した高発現 mRNA として GGCT を報告

するとともに細胞内局在に関する基礎データを示した (Mol Med Rep)。彼らはまた、正常細胞への GGCT 遺伝子導入において癌化能を呈さないことも示したが、この知見はわれわれの結果と一致する。同年、われわれは正常組織での基礎検討としてラットにおける C7orf24 mRNA の臓器分布を報告した (Oda, J Histochem Cytochem)。肝、腎に比較的多く発現しているものの、全般的に諸臓器で低発現であった。このことは、GGCT を治療標的とした場合に正常組織への傷害が軽微である可能性を示唆した。これまでの報告の多くは基礎的知見のみで、臨床的意義、殊に癌での意義は不明であった。

しかし、2010 年 Gromov らは大変興味深い報告をした (J Proteome Res)。乳癌 123 例の臨床検体を試料としてわれわれと同様の二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析を行い、同じく GGCT が高発現タンパク質であると同定した。ポリクローナル抗体を作製し免疫組織学的検討を行ったところ 46% の陽性率であった。また、高発現症例は有意に生存率が低いことも示した。さらに他癌種でも検討しており、子宮癌で 58%、肺癌で 38%、大腸癌で 72% の陽性率であり、多くの癌でも高発現していると報告した。このことはわれわれが各種癌細胞株での高発現を証明してきたことと合致する結果であった。2011 年われわれのグループの Uejima らが骨肉腫を対象とした論文を発表した (Anticancer Res)。骨肉腫手術標本 40 例での GGCT mRNA 発現は全例で対照とした正常骨芽細胞株より高値 (1.3~21.8 倍、平均 8.7 倍) を示した。タンパク質レベルでも骨肉腫細胞 5 株すべてで正常骨芽細胞株より高い発現が確認された。骨肉腫細胞株 (HOS) を試料としてマトリゲルチャンバーを用いた検討では、siRNA 投与により HOS 細胞の遊走能と浸潤能の双方が抑制された。増殖だけでなく遊走、浸潤といった癌細胞の特徴的性質のいずれにも GGCT が深くかかわっていることが示唆された。

以上から GGCT の働きを効率よく抑制できる方法を確立すれば、全く新しい癌治療法の発展が期待できるものと考えた。

2. 研究の目的

われわれは尿路上皮癌のプロテオーム解析から細胞増殖促進に関わる新規癌関連タンパク質を同定した。同定当時、このタンパク質は機能未知仮想タンパク質として C7orf24 (product of chromosome 7 open-reading frame 24) の名称で登録されていたが、のちに gamma-glutamyl cyclotransferase (以下 GGCT) と命名された。

本研究では尿路上皮癌における GGCT の臨床的意義を明らかにすること、RNA 干渉を用いた GGCT 発現抑制による抗腫瘍効果を in vitro だけおよび in vivo で明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 膀胱癌患者における GGCT 発現の免疫組織化学的検討

臨床材料：当科で TUR-BT を行った 47 例の筋層非浸潤性膀胱癌のパラフィン切片。

免疫組織化学：

1 次抗体 抗 C7orf24 ポリクローナル抗体 (R&D 社)

2 次抗体 HRP 標識抗ヒツジ IgG 抗体 (ZYMED Lab)

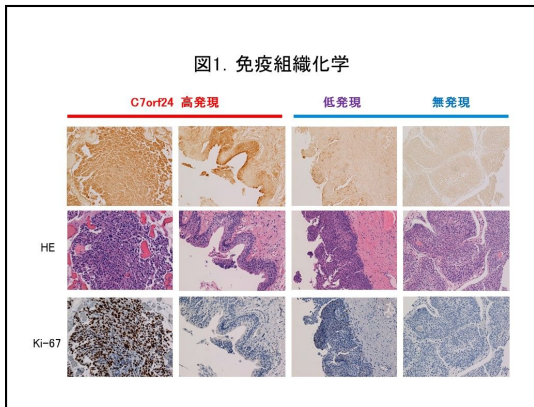
DAB により発色させた。

陽性判定基準 (図 1)

高発現--細胞質および核に反応産物がびまん性に認められる。

低発現--少数の細胞核に反応産物が散見される。

無発現--反応産物なし。



また、細胞増殖マーカーの一つである Ki-67 も MIB-1 抗体を用いて染色。任意の領域を選び、500 個以上の腫瘍細胞をカウントして、陽性細胞率 (Ki-67 Labeling Index) を算出し、GGCT の発現程度と比較した。

データ解析：上記結果と膀胱内再発の有無を含む臨床病理学的諸因子との関連を解析した。

(2) In vitro RNAi :

最適な siRNA 配列の設計

尿路上皮癌由来を含む数多くの癌細胞株においてウエスタンブロットで GGCT 発現株を選定。

UMUC-3 を対象細胞とした RNAi による細胞増殖抑制の確認。リポフェクション法を用いた siRNA 導入。WST-8 アッセイによる生細胞検出。

抗癌剤併用の検討。

尿路上皮癌で頻用されるアドリマイシンとの相乗効果を検討する。

(3) In vivo 治療モデル実験 :

膀胱内投与とモデルマウスの作製

BALB/c マウス (nu/nu, 8 週齢, 雌) に

対して、1mol/l HCL を 0.1ml 15 秒間膀胱注入後、0.1mol/l KOH 15 秒間中和し、PBS で膀胱洗浄後に UMUC-3 を 2×10^6 個/0.1ml とした懸濁液を膀胱内に注入し、正所性膀胱癌マウスを作製した。

GGCT targeting siRNA 膀胱内注入による治療実験

マウスに GGCT siRNA または control siRNA を、濃度 2uM および 0.2uM として 3 時間注入した。UMUC3 膀胱注日を day0 として day7, 10, 13 に siRNA 膀胱注、day21 に解剖により、病変の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 膀胱癌患者における GGCT 発現の検討
染色強度による GGCT 発現は高発現が 64% (30 例)、無～低発現が 36% (17 例) であった。

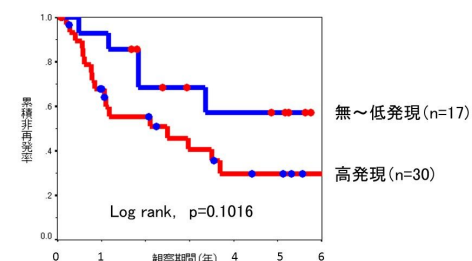
GGCT 発現の程度と腫瘍の病理学的因子とを比較したが、有意差は見られなかった (表 1)。

表 1. C7orf24 発現と腫瘍因子

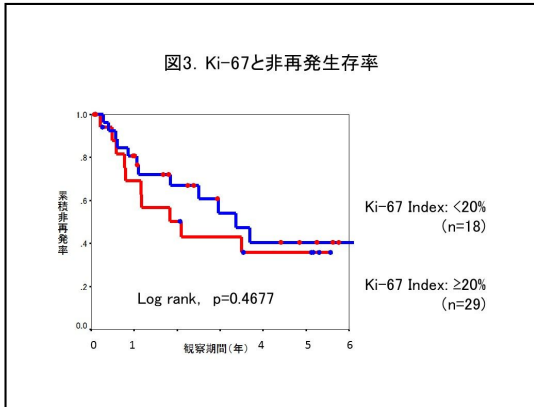
		高発現 (n=30)	無～低発現 (n=17)	Chi-square p
腫瘍径	3センチ未満	26	16	0.426
	3センチ以上	4	1	
腫瘍数	単発	17	12	0.345
	多発	13	5	
BT 既往	初発	27	17	0.178
	再発	3	0	
Grade	G1	7	7	0.199
	G2, 3	23	10	
T stage	Ta	17	10	0.886
	T1	13	7	
術後予防膀胱注	なし	19	12	0.614
	あり	11	5	

5 年非再発率では高発現群が 30%、無～低発現群が 57% で有意差は無いものの、高発現群ほど再発しやすい傾向が見られた (図 2)。

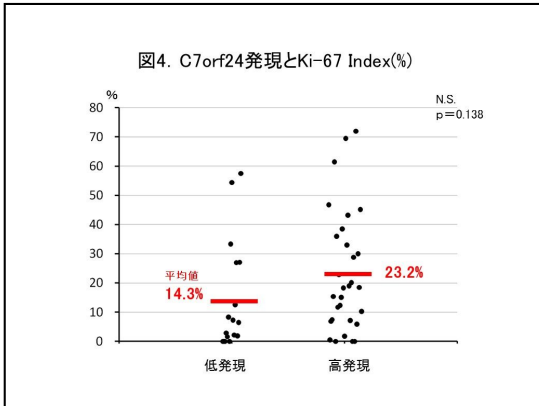
図 2. C7orf24 発現と非再発生存率



全症例の Ki-67 Labeling Index は平均値 20% (中央値 13; range 0 ~ 72) であった. 平均値以上と未満の 2 群に分けて非再発率を比較したが, 両者に差は無かった (図 3).



GGCT 高発現群の Ki-67 Index は平均 23.2%, 無 ~ 低発現群で 14.3% であり高発現群で高かったが, 統計学的有意差は無かった (図 4).



多変量解析による検討では 腫瘍径 3 cm 以上 (p=0.049) と術后再発予防膀胱注の非施行 (p=0.026) が統計学的に有意な再発危険因子であった (表 2). GGCT 発現は再発危険因子とはならなかった.

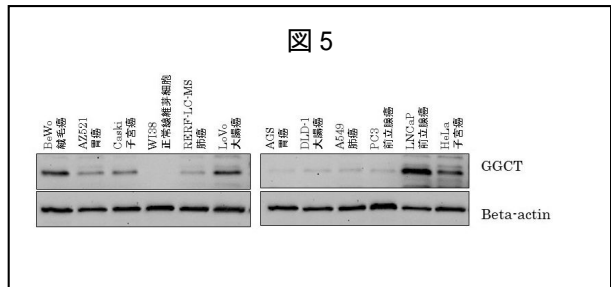
表2. 再発危険因子 (Cox比例ハザードモデル)

因子	カテゴリー 良 / 不良	リスク比 (95% CI)	p
腫瘍径	3cm未満 / 3cm以上	4.413 (1.005 - 17.089)	0.049
腫瘍数	単発 / 多発	2.136 (0.572 - 7.974)	0.259
BT既往	初発 / 再発	0.566 (0.057 - 5.601)	0.626
Grade	G1 / G2, 3	3.388 (0.708 - 16.222)	0.127
T stage	Ta / T1	1.330 (0.413 - 4.277)	0.632
術後予防膀胱注	あり / なし	4.570 (1.201 - 17.385)	0.026
Ki-67 Index	20%未満 / 20%以上	1.483 (0.450 - 4.888)	0.517
GGCT発現	無 ~ 低 / 高	1.873 (0.589 - 5.961)	0.288

(2) In vitro RNAi :

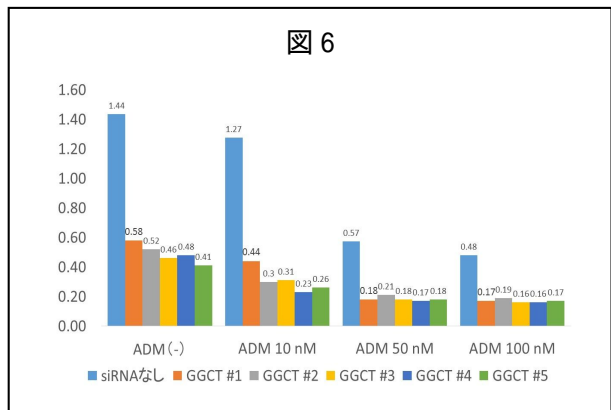
各種細胞株への RNAi (図 5)

絨毛癌, 前立腺癌, 肺癌, 大腸癌, 胃癌, 子宮癌由来の細胞株では程度の差はあるものの, すべてにおいて陽性所見が得られたが, 正常線維芽細胞 WI38 では陰性であった (図 5). 複数の膀胱癌細胞株においても, 陽性所見は幅広く認められた (データ非表示).



UMUC-3 細胞を試料としたアドリマイシンと GGCT siRNA の併用投与

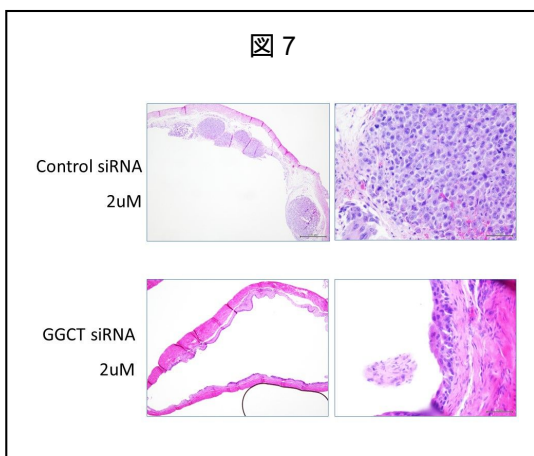
5 種類の GGCT siRNA 配列 (#1 ~ 5) を設計し, いずれも細胞増殖抑制効果を認めることを確認した (データ非表示). 細胞培養プレートに 2,500 個/well の細胞をまき込み, アドリマイシン (ADM, 0 ~ 100nM) および GGCT siRNA (5nM の低濃度に固定) を投与, 6 日目に WST-8 アッセイで cell viability を測定した. いずれの ADM 濃度においても GGCT siRNA 併用により, 抗癌剤単独に比べて 50% 以上の cell viability の低下を認めた (図 6).



(3) In vivo 治療モデル実験

現在までのところ, 1 群あたり 2 ~ 3 個体といった少数例での予備実験のみ施行している (図 7). 図に示すように GGCT siRNA 膀胱内注入による治療効果は認めるものの, 個体間のばらつきが多く, 一定の結果を得られていない. 治療前の膀胱内腫瘍量の個体間較差が原因と思われる, 鋭意, 方法に工夫を加えながら追試

を行っている。



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 2 件)

1. Kageyama S, Isono T, Iwaki H, Hanada E, Tomita K, Yoshida T, Yoshiki T, Kawauchi A. Proteome research in urothelial carcinoma. **International Journal of Urology**, in press, 2015. (査読有)
2. Kageyama S, Hanada E, Ii H, Tomita K, Yoshiki T, Kawauchi A. Gamma-glutamylcyclotransferase: a novel target molecule for cancer diagnosis and treatment. **BioMed Research International**, in press, 2015. (査読有)

[学会発表](計 5 件)

1. 影山 進, 花田英紀, 富田圭司, 村井亮介, 小林憲市, 吉田哲也, 吉貴達寛, 河内明宏, プロテオーム解析による尿路上皮癌治療標的の探索, 第 42 回京阪泌尿器腫瘍セミナー, 2015.2.9, 京都市
2. 飯居宏美, 狩野 智, 花田英紀, 影山 進, 吉貴達寛, C7orf24 阻害による新規細胞死機構の検討, 第 64 回日本薬学会近畿支部, 2014.10.11, 京都市
3. 松村健吾, 飯居宏美, 花田英紀, 影山 進, 吉貴達寛, siRNA と抗がん剤併用による C7orf24 阻害はがん細胞の増殖を抑制する, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014.9.27, 横浜市
4. 花田英紀, 影山 進, 荒木勇雄, 河内明宏, 飯居宏美, 吉貴達寛, 新規癌関連タンパク質 C7orf24 を標的とした去勢抵抗性前立腺癌治療の開発, 第 102 回日本泌尿器科学会総会, 2014.4.24, 神戸市

5. 花田英紀, 影山 進, 河内明宏, 飯居宏美, 吉貴達寛, 癌増殖関連タンパク質 C7orf24 を標的として去勢抵抗性前立腺癌治療の開発, 第 40 回京阪泌尿器腫瘍セミナー, 2014.2.14, 京都市

[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 2 件)

名称: 癌の診断と治療において有用な新規ポリペプチド
発明者: 吉貴達寛, 影山 進, 上田正道
権利者: TSSバイオテック株式会社
種類: 特許
番号: 第 4712692 号 (P4712692)
出願年月日: 平成 17 年 2 月 1 日
取得年月日: 平成 23 年 4 月 1 日
国内外の別: 国内

名称: Novel polypeptide useful for diagnosis and treatment of cancer
発明者: Tatsuhiko Yoshiki, Susumu Kageyama, Masamichi Ueda
権利者: TSS Biotech Inc.
種類: 特許
番号: EP1767633 B1
出願年月日: 2005 年 2 月 1 日
取得年月日: 2010 年 8 月 18 日
国内外の別: 欧州

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
影山 進 (KAGEYAMA, Susumu)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50378452
- (2) 研究分担者
花田 英紀 (HANADA, Eiki)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40555067
荒木 勇雄 (ARAKI, Isao)
滋賀医科大学・医学部・客員教授
研究者番号: 50252424

吉貴 達寛 (YOSHIKI, Tatsuhiro)
滋賀医科大学・医学部・客員教授
研究者番号：80230704

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
河内 明宏 (KAWAUCHI, Akihiro)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：90240952