

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462467

研究課題名(和文) 治療抵抗性腎癌・前立腺癌に対する抗サバイピンおよび重粒子線による治療の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study of the treatment with anti-survivin and heavy ion radiotherapy for drug-resistant kidney and prostate cancer.

研究代表者

小池 秀和 (KOIKE, Hidekazu)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90420091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：10 μ Mラパマイシン下で生存可能な耐性腎癌細胞(Caki-1-RapR)を作製した。その細胞では、survivinの遺伝子が有意に高発現していた。in vitroでは、Caki-1-RapRでは、YM155(survivin inhibitor)により、survivin mRNA、タンパク発現、細胞増殖が抑制された。in vivoでは、Caki-1-RapR腫瘍は、YM155単独で有意に抑制、YM155とラパマイシンの併用ではより強力に増殖が抑制された。YM155によるsurvivinの抑制は、ラパマイシン耐性となった腎癌に対する治療の一助になりえる。

研究成果の概要(英文)：We induced a rapamycin-resistant clear cell carcinoma cell line (Caki-1-RapR). We showed that survivin gene expression was significantly up-regulated in Caki-1-RapR compared with that in its parent cells (Caki-1). Caki-1-RapR cells had significantly more invasion ability than Caki-1 cells in a Matrigel invasion assay and more migration ability in a wound-healing assay. In Caki-1-RapR cells, rapamycin did not up-regulate caspase-9 activity and did not induce apoptosis. In Caki-1-RapR cells, YM155(survivin inhibitor) significantly decreased survivin gene and protein expression levels and cell proliferation in a dose-dependent manner in vitro. In addition, YM155 treatment significantly reversed rapamycin resistance in Caki-1-RapR cells. In a nude mouse tumor xenograft model, YM155 significantly inhibited the growth of Caki-1-RapR tumor. In addition, YM155 significantly enhanced the antitumor effects of rapamycin in Caki-1-RapR tumor.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：サバイピン 腎癌

1. 研究開始当初の背景

進行性腎細胞癌に対し、mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤は治療の終盤に使用されることが多いが、いずれ薬剤耐性となるため、その後の治療法の模索が急務である。

我々はこれまで腫瘍細胞で高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) をターゲットとし検討してきた。Survivin と臨床前立腺癌、腎癌の組織異型度、病期との関連を検討し、前立腺癌においては Gleason score (組織異型度) 間に (Urology 2008)、腎癌においては遠隔転移の有無に (Cancer Epidemiology 2009) 関連性を確認した。動物実験においては、腫瘍内への siRNA 導入による Survivin 発現の抑制により腫瘍増殖が抑制された (Journal of urology 2011)。また、ホルモン抵抗性前立腺癌細胞に対する活性型ビタミン D3 の抗腫瘍効果が Survivin 発現の抑制によって増強されることを見出したり (米国泌尿器科学会 2009 年年次総会、前立腺癌基礎研究セッション 最優秀ポスター賞受賞)、スタチン耐性前立腺癌、腎癌細胞では Survivin が高発現し、Survivin 発現の抑制によりスタチンの抗腫瘍効果が復活することなども見出してきた (米国・欧州泌尿器科学会 2010-2012 年年次総会)。

このように Survivin を癌の制御のターゲットとして検討してきたが、治療抵抗性となった腎癌では、いまだ動物実験レベルでの検討も少なく、臨床応用への発展が期待される。

2. 研究の目的

ラパマイシン耐性腎癌細胞において、survivin の抑制によるラパマイシンの抗腫瘍効果の回復、増感について検討した

3. 研究の方法

まず腎癌細胞 Caki-1 を、段階的なラパマイシン濃度下で長期に培養し、最終的に 10 μ M ラパマイシン下で生存可能な耐性腎癌細胞 (Caki-1-RapR) を作製した。

その細胞では、我々が以前から着目してきた survivin (a member of the inhibitor of apoptosis protein) の遺伝子が有意に高発現していた。

それゆえ、ラパマイシン耐性腎癌細胞において、survivin の抑制がラパマイシンの抗腫瘍効果を回復、増感させるのではないかと仮定し、in vitro, in vivo で検討した。

4. 研究成果

(1) Caki-1 と Caki-1-RapR との差異

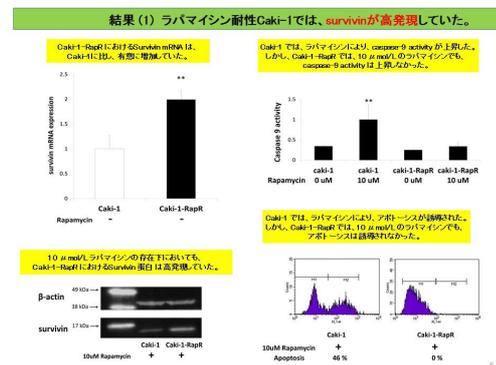
MTS assay では、ラパマイシン負荷時の IC50 値は Caki-1: 25 μ mol/L, Caki-1-RapR: 61 μ mol/L であった。

Caki-1-RapR では Caki-1 に比し、細胞の浸潤能、遊走能が増加していた。

Caki-1-RapR では Caki-1 に比し、survivin 遺伝子発現が増加していた。

10 μ M ラパマイシン存在下でも、Caki-1-RapR では Caki-1 に比し、survivin タンパクが高発現したままであった。

10 μ M ラパマイシンにより、Caki-1 では caspase-9 activity が上昇し、apoptosis が誘導された。一方、Caki-1-RapR では caspase-9 activity の上昇や apoptosis の誘導はみられなかった。



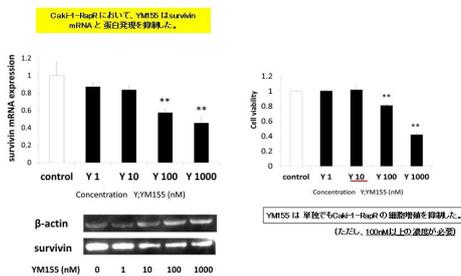
(2)(3)
Caki-1-RapR を使用した in vitro 実験

survivin siRNA 存在下にて、ラパマイシンの抗腫瘍効果が再現した。

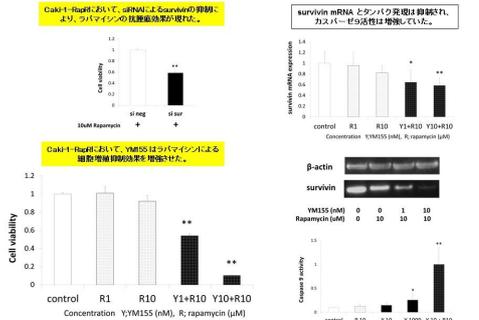
YM155(survivin inhibitor)単剤により、survivin mRNA, タンパク発現、細胞増殖が抑制され、caspase-9 activityが上昇した。

YM155 とラパマイシンの併用により、survivin mRNA, タンパク発現、細胞増殖がより抑制され、caspase-9 activityがより上昇した。

結果 (2) YM155はsurvivin発現を抑制した。



結果 (3) サバインの抑制によりラパマイシンの効果が現れた。

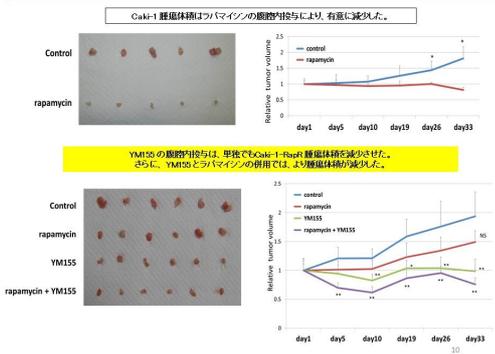


(4)(5) in vivo 実験
(YM155, ラパマイシン腹腔内投与)

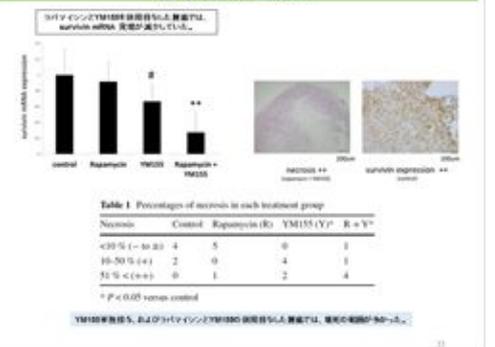
Caki-1 腫瘍は、ラパマイシンにより有意に増殖が抑制された。

Caki-1-RapR 腫瘍は、ラパマイシン単独では有意には抑制されなかったが、YM155 単独では有意に抑制された。さらに、YM155 とラパマイシンの併用ではより強力に増殖が抑制された。

結果 (4) in vivoでも、YM155によりラパマイシンの効果が増強された。



結果 (5) 抽出した腫瘍の評価



【結論】
survivin の抑制は、ラパマイシン耐性となった腎癌に対する治療の一助になる可能性がある。

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 1 件)

Koike H., Nitta T., Sekine Y., Arai S., Furuya Y., Nomura M., Matsui H., Shibata Y., Ito K., Oyama T., Suzuki K. YM155 reverses rapamycin resistance in renal cancer by decreasing survivin. J Cancer Res Clin Oncol 査読有, 2014 Oct;140(10):1705-1713.

〔学会発表〕(計 6 件)

Koike H., Nitta T., Sekine Y., Miyazawa Y., Kato H., Furuya Y., Matsui H., Shibata Y., Ito K., Suzuki K. Decreasing survivin by YM155 reverses rapamycin resistance in renal cancer. 第 110 回米国泌尿器科学会総会(AUA). 2015.05.17, New Orleans.

小池秀和、新田貴士、関根芳岳、宮澤慶行、加藤春雄、古谷洋介、松井博、柴田康博、伊藤一人、鈴木和浩。ラパマイシン耐性腎癌細胞において、YM155 による survivin の抑制は、ラパマイシンの抗腫瘍効果を回復させる。第 103 回日本泌尿器科学会総会。2015.04.18, 金沢。石川県立音楽堂。

Koike H., Nitta T., Sekine Y., Miyazawa Y., Kato H., Furuya Y., Matsui H., Shibata Y., Ito K., Suzuki K. Decreasing survivin by YM155 reverses rapamycin resistance in renal cancer. 第 30 回欧州泌尿器科学会総会(EAU). 2015.03.23, Madrid.

他、3 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

小池 秀和 (KOIKE, Hidekazu)
群馬大学医学部附属病院・講師
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：