

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2012 年 3 月 14 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 李 元元
所属機関名： 千葉県がんセンター
所属部署名： 研究局 職名：研究員
所 在 地： 千葉県千葉市中央区仁戸名町 6 6 6－2
電 話： 043-264-5431 内線：5202



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

Oridonin による膀胱がん細胞死誘導とその制御機構の研究：新規依存性受容体 UNC5D の役割の検討

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 李 元元

職名：研究員

所属機関名： 千葉県がんセンター

部署名：研究局

中国側研究者氏名： 朱 育焱

職名：助教授

所属機関名： 中国医科大学第一付属病院

部署名：泌尿器外科

4. 当該研究における発表論文等

投稿予定である。

5. 成果の概要

本研究ではヒト膀胱がん T24、EJ および J82 細胞へのオリドニンの抑制効果およびその細胞死制御機構の解明と標的分子の探索を行った。その結果、オリドニンはこれらの膀胱がん細胞株にアポトーシスおよびオートファジーを誘発することによって細胞死を引き起こすことが判明した。さらに、EJ 細胞株を接種したマウスモデルを用いた実験ではオリドニンの膀胱がんへの抑制効果を *in vivo* で検証した。三つの細胞株の中に、T24 と EJ 細胞には癌細胞の成長・転移に関わると言われる分泌蛋白質である netrin1 の発現が非常に高く、その発現はオリドニン処理によって時間依存的減少することが分かった。さらに、netrin1 特異的 siRNA を用いて内在性の netrin1 をノックダウンした条件下において、オリドニンによる細胞死誘導が促進されることが観察された。一方、netrin1 の発現がほとんど検出できない J82 細胞ではオリドニン処理によって、netrin1 受容体である UNC5A および UNC5D が誘導されるのが明らかになった。さらに、臨床検体を用いた解析では netrin1 およびその受容体 UNC5A と UNC5D の発現が筋層浸潤性膀胱がんに有意的に高いことが見出された。これらの結果はオリドニンが膀胱がんに対して明らかな腫瘍抑制効果を持つことと、netrin1 とその依存性受容体 UNC5 ファミリーが膀胱がんの進展に関わっており、オリドニンによる膀胱がん細胞死誘導機構の標的分子の一つであることが示唆された。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

中国人共同研究者の朱 育焱氏は、膀胱がんの臨床検体を用いて、netrin1 およびその依存性受容体である UNC5A および UNC5D の発現を Real-time PCR 法にて調べた。さらに、netrin1 の発現を免疫組織化学染色法にて検討した。その結果、netrin1 およびその依存性受容体 UNC5A と UNC5D は膀胱がんを発現され、その発現が筋層浸潤性膀胱がんにおいて有意的に高いことが見出された。これらの結果は、Netrin1/ UNC5 ファミリーが膀胱がんの進展に関与することが示唆された。

Oridonin による膀胱がん細胞死誘導とその制御機構の研究:

依存性受容体 UNC5 ファミリー/netrin1 の役割の検討

研究者氏名	李 元元
日本所属機関	日本千葉県がんセンター 研究員
中国側共同研究者名	朱 育焱
中国所属機関	中国医科大学第一臨床学院泌尿器外科 助教授
共同研究者名	中川原 章

要 旨

膀胱がんは泌尿器悪性腫瘍の1つであり、尿路系腫瘍の中で発生頻度が一番高いものである。本研究ではヒト膀胱がん T24、EJ および J82 細胞へのオリドニンの抑制効果およびその細胞死制御機構の解明と標的分子の探索を行った。その結果、オリドニンはこれらの膀胱がん細胞株にアポトーシスおよびオートファジーを誘発することによって細胞死を引き起こすことが判明した。さらに、EJ 細胞を接種したマウスモデルを用いた実験ではオリドニンの膀胱がんへの抑制効果を *in vivo* で検証した。三つの細胞株の中に、T24 と EJ 細胞には癌細胞の成長・転移に関わると言われる分泌蛋白質である netrin1 の発現が非常に高く、その発現はオリドニン処理によって時間依存的に減少することが分かった。さらに、netrin1 特異的 siRNA を用いて内在性の netrin1 をノックダウンした条件下において、オリドニンによる細胞死誘導が促進されることが観察された。一方、netrin1 の発現がほとんど検出できない J82 細胞ではオリドニン処理によって、netrin1 依存性受容体である UNC5A および UNC5D が誘導されるのが明らかになった。さらに、臨床検体を用いた解析では netrin1 およびその受容体 UNC5A と UNC5D の発現が筋層浸潤性膀胱がんに有意的に高いことが見出された。これらの結果はオリドニンが膀胱がんに対して明らかな腫瘍抑制効果をもつことと、netrin1 とその依存性受容体 UNC5 ファミリーが膀胱がんの進展に関わっており、オリドニンによる膀胱がん細胞死誘導機構の標的分子の一つであることが示唆された。

Key Words オリドニン, 膀胱がん, 細胞死, netrin1, UNC5 ファミリー

緒 言:

膀胱がんは泌尿器悪性腫瘍の1つであり、尿路系腫瘍の中で発生頻度が一番高いものである。膀胱腫瘍の約8割を占めている表在癌は、内視鏡治療と化学療法との組み合わせで治療を行ったとしても、術後2年の再発率が50~70%と言われている[1]。浸潤性膀胱がんは予後が不良で、5年生存率が40-50%である[1]。したがって、膀胱がんに対する新しい有効な治療法の開発が重要である。

一方、発生、血管新生、神経変性などに重要な役割を果たす netrin1 とその受容体 DCC および UNC5 ファミリー (UNC5A, UNC5B, UNC5C と UNC5D) は腫瘍形成および転移に関与することが報告されている。DCC および UNC5 ファミリーはリガンドである netrin1 の有無による抗アポトーシス応答とアポトーシス促進応答を切り替える機能を持つことによって依存性受容体 (Dependence Receptors) と呼ばれ、条件的な癌抑制因子として働いていると考えられる[2, 3]。その中に、UNC5D は最近我々が独自に開発した神経芽腫由来の cDNA ライブラリーを用いて同定した UNC5 ファミリー新規メンバーである。これまでの我々の研究結果から、DNA 損傷処理など様々な刺激に応じて細胞死が誘導される過程において UNC5D ががん抑制遺伝子 p53 のターゲットとして、アポトーシスを誘導することが明らかになった [4]。これまでに、これらの netrin1 受容

体は遺伝子座のヘテロ接合性の消失 (Loss of heterozygosity, LOH) および発現低下がさまざまな腫瘍に検出された [5]。そして、netrin1 の発現は進行神経芽腫に高く、予後不良につながっている [6]。大腸がんでは netrin1 の発現パターンも異常になり、その受容体 DCC および UNC5 ファミリーが、大腸がん全体の半分以上においてダウンレギュレートされている [5, 7]。したがって、腫瘍形成および転移においては、netrin1 受容体経路が重要な役割を果たしているものと思われる。

オリドニン (Oridonin) は冬凌草 (*Rabdosia Rubescens*) と呼ばれる植物により抽出した生薬成分である。このオリドニンには抗炎症作用および抗腫瘍作用があることが知られている。これまでに、白血病、肝臓がん、大腸がんなど様々な悪性腫瘍においてオリドニンがアポトーシス (apoptosis) や自食作用 (autophagy) などを誘導し、がん細胞を細胞死させることが報告されているが [8-10]、膀胱がんでの抗腫瘍効果はまだ不明である。

本研究において、我々は定量的 PCR 法により 3 種類の膀胱がん細胞株および膀胱がん臨床検体における netrin1/UNC5 ファミリーの発現レベルを調べた。また、膀胱がんに対してオリドニンの抑制効果を in vivo および in vitro で検討した。さらに、オリドニンの細胞死制御機構における netrin1/UNC5 ファミリーの関与の有無を検討した。

対象と方法:

膀胱がん培養細胞株と siRNA 導入

ヒト膀胱がん細胞株 T24、EJ および J82 は 10% FCS を加えた RPMI 培地を用いて 37° C にて常法により培養した。Netrin1 siRNA (Santa Cruz) をマニュアルに従って細胞に導入した。48 時間後にオリドニン (Sigma) を添加し処理を行った。

RNA 抽出と定量および半定量 RT-PCR

RNeasy Kit (Qiagen) または RNAiso Plus kit (TAKARA) を用いて培養細胞および臨床検体よりそれぞれ RNA を抽出し、マニュアルに従って cDNA を合成した。標的遺伝子の発現は定量 RT-PCR 法 (培養細胞由来サンプル: Applied Biosystems 7500; 臨床検体由来サンプル: Roche LightCycler) または半定量 RT-PCR 法にて測った。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内因性コントロールとした。

細胞増殖・細胞死解析

細胞増殖は細胞増殖アッセイキットの WST-8 (Dojinndo) を用いて解析した。細胞死は Trypan Blue 染色およびフローサイトメトリー法 (FACS) で検討した。Trypan Blue 染色ではオリドニンで処理した細胞を Trypan Blue (sigma) で染めて (0.2% (W/V))、血球計算盤を用いて総細胞数と青色に染められた死細胞数を算定した。FACS 解析では細胞をエタノールで一晩固定して、PI (Propidium Iodide) で染色した上で、細胞解析用装置 FACS Caliber (BD) にて解析を行った。

ウェスタンブロッティング

オリドニンで処理した細胞から調製した細胞ライセートを電気泳動によって分離して、PVDF 膜に転写し、特異的な抗体を用いて標的タンパク質の発現や活性化を ECL 検出法で検出した。

オリドニンによる抗腫瘍活性の in vivo 評価実験

1 X 10⁶ の膀胱がん EJ 細胞をヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu、6 週齢、♀、日本クリア) の皮下に移植した。移植五日後に腫瘍体積を指標にマウスを 2 群に群分け、オリドニン処理群にオリドニンを加えた PBS 溶液 (15 mg/kg/day) を、対照群に同量の DMSO を加えた PBS を腹腔内注射により 20 日間に投与した。腫瘍径を測定し、腫瘍体積の推移を観察した。実験が終わった際に、腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定した。

結 果:

膀胱がんに対するオリドニンの抑制効果

オリドニンの膀胱がんに対する抑制効果を *in vitro* において検討した。ヒト膀胱がん細胞株 T24、EJ および J82 を用いてオリドニンで 24 時間に処理したところ、オリドニン投与量の用量依存的に細胞死が起こることが観察した (Fig. 1)。また、細胞増殖アッセイキットの WST-8 を用いた細胞増殖解析、Trypan Blue 染色および FACS 解析を行って、同様な結果を得た。さらに、ヌードマウスを用いた EJ 細胞移植モデルでのオリドニンの抗腫瘍活性を検討した。コントロール群に比べて、オリドニンを投与した実験群は腫瘍体積および腫瘍重量が有意的に減っていた。これらの結果から、オリドニンが膀胱がんに対して確実な抑制効果をもつことが明らかになった。

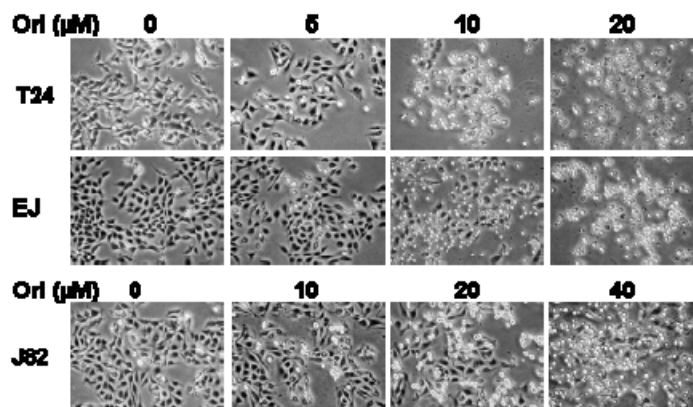


Fig. 1 オリドニンが膀胱がん細胞の細胞死を誘導する。

オリドニンによる膀胱がん細胞死誘導の機序

オリドニンによる膀胱がん細胞死誘導の機序を検討した。オリドニン処理を受けた細胞から調製した細胞ライセートを用いてウェスタンブロッティング法で解析をしたところ、アポトーシスを起こさせるシグナル伝達経路に重要な因子である PARP および caspase3 のオリドニン用量依存的活性化を検出した。さらに、オートファジーの特徴的なマーカーである LC3-II の増加が見られた (Fig. 2)。したがって、オリドニンによる膀胱がん細胞死の誘導過程において、アポトーシスとオートファジーの両方が活性化していることが判明した。

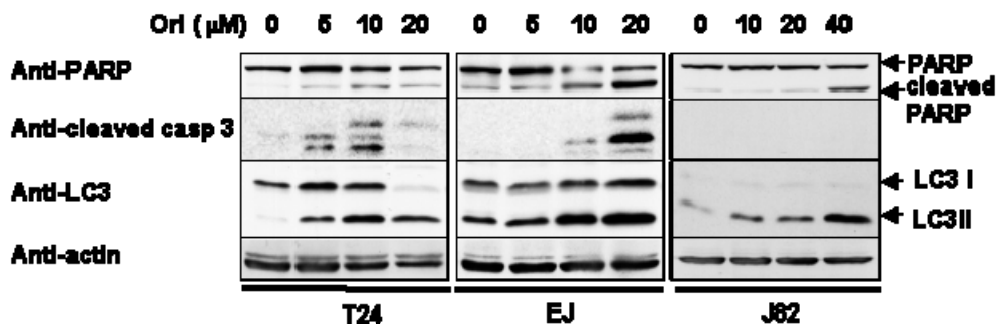


Fig. 2 オリドニンが膀胱がん細胞にアポトーシスとオートファジーを誘導する。

膀胱がんにおける netrin1/UNC5 ファミリーの発現

最近、UNC5D 遺伝子座を含む染色体 8 番のロスは浸潤性膀胱がん患者に多くみられることが報告されている [11]。我々は膀胱がんにおける netrin1/UNC5 ファミリー mRNA の発現は定量 RT-PCR 法で測定した。その結果、netrin 1 およびその受容体 UNC5A と UNC5D の発現は T24 および EJ 細胞に高く、J82 にほとんど検出できなかった。一方、臨床検体を用いた解析では netrin 1 およびその受容体 UNC5A と UNC5D の発現

が筋層浸潤性膀胱がんにおいて有意的に高いことが見出された。オリドニン処理に応じて、netrin1 および UNC5A、UNC5D の発現は T24 細胞において、時間依存的に減少していた一方、EJ 細胞において、netrin1 が下がっていたが、UNC5A と UNC5D が誘導された。J82 細胞には UNC5A と UNC5D が誘導された。さらに、netrin1 特異的 siRNA を用いて内在性の netrin1 をノックダウンした条件下において、オリドニンによる細胞死誘導が促進されることが観察された。

考 察：

本研究において、我々はオリドニンが膀胱がんに対して明らかな腫瘍抑制効果をもつことを in vivo と in vitro で検証した。その作用機構については、アポトーシスとオートファジーを誘導することによって細胞死を引き起こすことが判明した。さらに、我々は腫瘍形成および転移において重要な役割を果たしていると思われる netrin1 が膀胱がん細胞および筋層浸潤性膀胱がん組織に高く発現していることを見出した。そして、netrin1 の依存性受容体 UNC5 ファミリーメンバー UNC5A と UNC5D の発現が netrin1 の高発現細胞においても高いことから、netrin1/UNC5 経路は膀胱がん細胞の成長および浸潤・転移能につながる可能性が示唆される。興味深いことに、netrin1 の高発現細胞においてはオリドニン処理に応じて、netrin1 の発現が減少した一方、netrin1 の発現が検出できない細胞においてはその依存性受容体の UNC5A と UNC5D が誘導された。さらに、siRNA による netrin1 の発現抑制がオリドニンによる細胞死の誘導を促進した。これらの結果は netrin1/UNC5 がオリドニンによる細胞死誘導に重要な役割を担うことを示す。したがって、netrin1/UNC5 経路は膀胱がん治療の新たな標的分子になる可能性が示唆される。

参考文献：

1. Gallagher DJ, Milowsky MI. Bladder cancer. Curr Treat Options Oncol. 10(3-4):205-15 (2009).
2. Goldschneider D, Mehlen P. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. Oncogene 29(13):1865–1882 (2010).
3. Arakawa H. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. Nat Rev Cancer. 4(12):978-87 (2004).
4. Wang H, et al. A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. Biochem Biophys Res Commun. 370(4):594-8 (2008).
5. Thiebault K, et al. The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(7):4173-8 (2003).
6. Delloye-Bourgeois C, et al. Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. J Exp Med. 206(4):833-47 (2009).
7. Mazelin L, et al. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. Nature. 431(7004):80-4 (2004).
8. Zhou GB, et al. Oridonin, a diterpenoid extracted from medicinal herbs, targets AML1-ETO fusion protein and shows potent antitumor activity with low adverse effects on t(8;21) leukemia in vitro and in vivo. Blood. 109(8):3441-50 (2007).
9. Gao FH, et al. Oridonin induces apoptosis and senescence in colorectal cancer cells by increasing histone hyperacetylation and regulation of p16, p21, p27 and c-myc. BMC Cancer. 10:610 (2010).
10. Wang H, et al. Oridonin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through MAPK and p53 signaling pathways in HepG2 cells. Oncol Rep. 24(3):647-51 (2010).
11. Koed K et al. High-density single nucleotide polymorphism array defines novel stage and location-dependent allelic imbalances in human bladder tumors. Cancer Res. 65(1):34-45 (2005).

作成日：2012 年 3 月 8 日