

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

該当なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
佐々木克己、那須保友、 渡部昌実、賀来春紀、 平田武志、谷本竜太、 公文裕巳	前立腺癌に対する REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベク ターを用いた遺伝子治療臨床研 究－中間報告－	西日本泌尿器科	74(9)	525-526	2012
Hirata T., Watanabe M., Kaku H., Kobayashi Y., Yamada H., Sakaguchi M., Takei K., Huh NH., Nasu Y., Kumon H.	REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer	Int J Oncol	41	559-564	2012
谷本竜太	BiP/GRP78 の抑制による REIC/ Dkk-3 遺伝子治療抵抗性前立腺 がんの感受性化	西日本泌尿器科	74(10)	531-536	2012
Hayashi T., Asano H., Toyooka S., Tsukuda K., Soh J., Shien T., Taira N., Maki Y., Tanaka N., Doihara H., Nasu Y., Huh NH., Miyoshi S.	DNA methylation status of REIC/Dkk-3 gene in human malignancies	J Cancer Res Clin Oncol.	138(5)	799-809	2012

---

---

学 会

---

---

第 289 回日本泌尿器科学会岡山地方会演題抄録

日 時 平成 23 年 12 月 10 日

場 所 おかやま三光荘

西 日 本 泌 尿 器 科 別 冊

2 0 1 2 年 9 月 発 行

( 第 7 4 卷 第 9 号 )

---



---

 学 会
 

---



---

## 第 289 回日本泌尿器科学会岡山地方会演題抄録

日 時 平成 23 年 12 月 10 日

場 所 おかやま三光荘

## 対側副腎偶発腫瘍を伴った副腎過形成の 1 例

川口正志・能勢宏幸・村上貴典(姫路聖マリア)

笠原明宣・塩見耕平(姫路聖マリア・内科)

【症例】症例は 57 歳, 男性。2004 年より高血圧のため, 当院内科で加療中。2009 年 9 月健康診断で約 10 mm 大の左副腎腫瘍を指摘された。血中アルドステロン(PAC) 208 pg/ml, レニン活性(PRA) 0.8 ng/ml/hr, ARR (PAC/PRA) 260 のため, 原発性アルドステロン症の疑いにて当科紹介となった。血圧コントロールは良好で, K 値も基準範囲内であったため, 本人希望もあり経過観察としていた。同年 10 月に PAC 394 pg/ml と上昇し, K 3.3 mEq/l と低下が認められ, カプトプリル負荷試験にて原発性アルドステロン症と診断した。局在診断のため ACTH 負荷副腎静脈サンプリングを施行したところ, 負荷後 PAC は左副腎で 510 pg/ml (診断基準 > 1400) であったが, 右副腎では 19200 pg/ml であった。他の診断基準も右副腎でのみ満たしていた。右副腎原発性アルドステロン症の診断で 2011 年 7 月腹腔鏡下右副腎摘出術を施行し, 病理診断は過形成であった。術後 PAC, K は基準範囲となり, 現在降圧薬を漸減している。原発性アルドステロン症において片側性過形成はまれであり, また今症例のように対側に偶発腫瘍を認める場合もあるため, 局所診断のために ACTH 負荷副腎静脈サンプリングは必須であり, 若干の文献的考察を加え報告する。

## 副腎血管腫の 1 例

渡邊雄一(十全総合)

守都敏晃(香川労災・病理)

症例は 61 歳, 男性。高血圧にて当院内科通院中, 2010 年 10 月 30 日胸部 CT 施行。左腎上方に径 13 × 11 cm の辺縁平滑な腫瘍が認められ, 当科へ紹介された。腹部造影 CT では, 腫瘍内部の造影効果は乏しいが, 下極を中心とした辺縁の一部が不整に造影された。原発は左腎の圧排像から, 左副腎と思われた。MRI では内部の出血壊死の存在が疑われた。内分泌検査では, 血中ノルアドレナリンがごく軽度高値を示したのみで, その他は基準値内であった。腫瘍の大きさからは悪性腫瘍の可能性も否定できず, 2011 年 5 月 19 日経腹的左副腎摘除術を施行した。腫瘍重量は 980 g。病理では, 腫瘍内部や副腎皮質内に, 内腔に赤血球成分を含んだ不均一に拡張した大小の管腔を認め, 海綿状血管腫と診断した。比較的稀な疾患とされる副腎血管腫の 1 例を経験したので, 若干の文献的考察を加えて報告する。

## 上部尿路結石 (U1) の ESWL 後に腎被膜下血腫を認めた 1 例

郷原真輔・佐古智子・塩塚洋一・山本康雄

石戸則孝・高本 均(倉敷成人病センター)

症例は 49 歳, 男性。2011 年 9 月 26 日, 左側腹部痛を認め当科受診。US で左水腎症を認め, KUB で左尿管 (U1) に 10 × 9 mm 大の結石を認めたため, 10 月 17 日 ESWL (4849 発) を施行し, 碎石効果は良好であった。しかし術後, 37 度台の微熱と全身倦怠感と左側腹部膨満感を認め, 10 月 21 日再診。経過観察目的で入院となった。翌 10 月 22 日, 採血で Hb 8.8 g/dl (術前 Hb 13.6 g/dl), CT にて左腎背側に血腫の形成を認め, ESWL の合併症である左腎被膜下血腫と診断した。以後安静, 抗生剤と止血剤の連日投与にて保存的治療を行い, 経過良好にて 10 月 31 日退院した。現在, 外来にて経過観察中である。ESWL の約 1% 程度に腎被膜下血腫の合併が知られている。今回我々は, 上部尿路結石 (U1) の ESWL 後に腎被膜下血腫を認めた 1 例を経験したため, 若干の文献的考察を加え報告する。

## 後腹膜鏡下腎摘後に後腹膜播種を認めた透析腎癌の 1 例

甲斐誠二・島 和宏・岸 幹雄(福山市民)

【目的】透析患者では腎癌の発生頻度が高いと言われるが, その予後に関する報告は少ない。一般に透析腎癌は生物学的悪性度が低いと言われているが, 今回われわれは, 後腹膜鏡下腎摘後に後腹膜播種および皮下脂肪織転移を認めた透析腎癌の 1 例を経験したので文献的考察も踏まえて報告する。【症例】50 歳代, 男性。1988 年に慢性腎不全にて透析導入。2008 年前医で右腎癌 T1bN0M0 の診断にて後腹膜鏡下右腎摘出術を施行された。病理診断は clear cell carcinoma, G2, pT1b, INF α, v (-) であった。2010 年 CT にて右大腰筋腹側に腫瘍性病変を認めた。2010 年より当院でフォローアップ。腫瘍径は小さく, 経過観察していたが, 徐々に増大。周辺脂肪組織にも腫瘍が出現し, 腰部皮下脂肪織内にも腫瘍を認めたため, 2011 年後腹膜腫瘍摘出術および皮下腫瘍摘出術を施行した。病理診断にて renal cell carcinoma の後腹膜播種および皮下脂肪織転移と診断した。

## 水腎・尿管の経過観察中に認められた腎盂扁平上皮癌の 1 例

瀬野祐子・倉繁拓志

赤澤信幸(岡山済生会総合)

井筒将斗・須井健太

仁熊健文(岡山済生会総合・外科)

川口正志(姫路聖マリア)

日下信行(広島市民)

症例は 60 歳, 女性。2009 年 9 月の検診で左水腎症を指摘されるも放置していた。2010 年 10 月肉眼的血尿を主訴に受診。膀胱鏡で

は異常なく、尿細胞診は陰性であった。CTにて左水腎・尿管および腎実質の菲薄化を認め、結石および腫瘍性病変は認めなかった。ただ、尿管狭窄部に子宮との癒着を思わせる所見があり、そのための通過障害と考え経過観察とした。2011年3月左腰部痛出現。CTにて左腎の腫大および不均一に造影される腫瘍性病変が疑われたため、CTガイド下生検を行い、ごく少量の扁平上皮を思わせる細胞群を検出した。同時に行った腸管の精査で下行結腸に狭窄を認め、同部の生検で扁平上皮癌が検出されたため、腎病変の浸潤と診断された。術前化学療法としてGC療法を2コース行ったが、判定はPDであった。腹部症状として下血およびイレウスが出現したため、8月左腎摘出、十二指腸、横行結腸、下行結腸、降尾部、脾、副腎を合併切除した。現在、術後早期に出現した局所再発および骨転移のため、対症的な緩和医療を行っている。

水腎・尿管の原因となった尿管下部の狭窄部とは離れた腎盂に発生した腎盂扁平上皮癌の1例を経験したので、臨床経過・画像検査・手術所見・病理所見および若干の文献的考察を加え報告する。

#### 多種の生活習慣病を有する腎癌症例に対する腹腔鏡下腎摘除術の経験

市川孝治・西山康弘・山根 享・早田俊司（鳥取市立）

【目的】食習慣、運動習慣などライフスタイルの変遷により、多種の生活習慣病を有する泌尿器科患者が増加している。今回高血圧、糖尿病、心房細動、肥満を有する腎癌症例に対して腹腔鏡下腎摘除術を行い、考察したので報告する。【症例】70歳、男性、PS0。糖尿病、心房細動、肥満（BMI 30.04）を有する。検診時の胸写にて異常陰影を指摘され、当院紹介となった。CTにて左腎癌、多発肺転移を認めた。腎癌は101×70×63mmで、左腎静脈内への腫瘍塞栓を認め、Gerota筋膜外への浸潤と脾への直接浸潤、横隔膜への浸潤が疑われた。術前診断T4N0M1のもと、ヘパリンコントロールのち左腎摘除術を行うこととした。この際、多種の生活習慣病を有し、術後深部静脈血栓症や感染症などの危険性が高いことから、腹腔鏡下腎摘除術を選択した。術中所見では、脾との剝離、腎門部処理に時間を要した。手術時間448分、出血量900ml、摘出重量1030gで、病理診断はRCC、CCC、G2>G1、pT3apMOM1であった。術翌日よりヘパリン再開、経口摂取、歩行開始し、術後8日目に退院となった。現在インターフェロン投与中である。【考察】T1-2腎癌に対して腹腔鏡下手術は標準術式と言える。T3以上については開腹手術が一般的と考えられるが、他疾患やPSなどを考慮して可能な限り合併症を少なくできる術式を選択すべきと思われた。

#### 尿管平滑筋腫瘍の1例

森 聡博・白崎義範・坪井 啓（三原赤十字）  
時永賢治（福山第一）

症例は78歳、女性。既往歴は高血圧、高脂血症、子宮筋腫、虫垂炎。左下腹部痛を主訴に近医内科を受診したところ、左水腎症を指摘され、精査目的に当科紹介となった。CTにて、左下部尿管に約2cmの淡く造影される腫瘍を認めた。逆行性腎盂造影ではCTに一致する部位の狭窄を認めた。自然尿細胞診はclass I、左分腎尿細胞診はclass IIであった。下腹部痛が持続しており、左尿管腫瘍の診断で左尿管全摘除術、および膀胱部分切除術を行った。腫瘍は尿管壁から発生しており粘膜面は正常であった。病理診断は尿管平

滑筋腫瘍であった。術後、左下腹部痛は消失した。

尿管平滑筋腫瘍は稀な疾患であり、良悪性の判断が困難な場合が多い。若干の文献的考察を加えて報告する。

#### 泌尿器科手術における術後譫妄の検討

高本 篤・那須良次（岡山労災）  
杉本盛人（岡山大）

【目的】泌尿器科領域では高齢者でも手術が必要な場合が多く、術後譫妄で苦勞をする症例をたびたび経験する。今回我々は泌尿器科における術後譫妄について、代表的な術式別の発症頻度とその傾向について検討を行った。【対象と方法】2009年1月～2011年8月までに当科で施行した膀胱全摘除術24例、前立腺全摘除術59例、尿管悪性腫瘍手術50例（根治的腎摘除術、尿管摘除術、腎部分切除術）、TURP96例、TURBT147例、計376例の手術を対象に、カルテ記載よりレトロスペクティブに検討した。譫妄発症の診断は、アメリカ精神医学会の診断基準を参照に、見当識障害、睡眠障害、幻覚障害がみられ、安静臥床を維持できないものとし、カルテ記載、看護記録を基に判定した。【結果】術後譫妄の発生は全376例中、45例（12%）に認めた。術式別には、膀胱全摘除術9例（38%）、前立腺全摘除術0例（0%）、尿管悪性腫瘍手術5例（10%）、TURP16例（17%）、TURBT15例（10%）であった。【結論】膀胱全摘除術では高い割合で術後譫妄を認めた。一方、前立腺全摘除術では、術後譫妄の発生はなく、尿管悪性腫瘍手術でも発生は少なかった。TURP、TURBTでの譫妄の発生には術後のカテーテル不快が影響する可能性が示唆された。

#### 先天性下部尿路通過障害の2例

海部三香子・小出隆生・古川洋二（笠岡第一）

先天性下部尿路通過障害の2例を経験したので若干の文献的考察を加え報告する。症例1は6歳、男児。昼間の尿失禁を主訴に受診。尿流量測定でQmax低下、排尿時間延長を認めた。UCGで球部尿道の狭窄と後部尿道に軽度の拡張を認めた。全身麻酔下に尿道鏡検査を行い、外尿道括約筋前に膜様狭窄を認めており、フック型切開刀で3時、9時、12時を切開した。術直後から昼間の尿失禁は消失、尿流測定検査で改善を認めた。術後2年経過するも再発を認めていない。症例2は15歳、男児、排尿困難を主訴に受診。UCGでは尿道狭窄を認めなかったが、MCUGで振子部尿道の狭窄を認めた。尿道鏡検査では、外尿道口から約4cmの振子部尿道に膜様狭窄、また外尿道括約筋の手前の球部尿道に癒痕組織様のリング状狭窄が認められ、両者ともに排尿障害の原因であると考えられた。まず、全身麻酔下に振子部狭窄の切開を行ったが、用手的腹圧排尿および術中造影検査で不十分と判断し、球部尿道のリング状狭窄を半円型切開刀で5時、7時、12時に切開を加え、さらに24Frバルンダレーターで拡張した。術後速やかに症状改善を認め、3カ月経過した時点での再発は認めていない。

#### 原発性膀胱頸部閉塞症の女性1症例

西澤恒二・松岡 崇・水野 桂  
仲西昌太郎・浅井聖史・岡添 蒼  
豊里友常・井上幸治・寺井章人（倉敷中央）

75歳、女性。原発性肺癌への化学療法3コース目に、全身倦怠感

が強くなり呼吸器内科に入院、翌日尿閉をきたして当科初診した。病歴と診察所見から神経因性膀胱や薬剤性排尿障害は否定であった。尿潜血陽性で、エコー・膀胱鏡検査では尿道口から膀胱内に突出する、尿道全周性の隆起性病変を認めた。尿細胞診は陰性であるものの、原発性あるいは転移性尿道癌を否定できないため、経尿道的腫瘍生検と可及的切除を行った。病理組織所見は尿道粘膜下に多発する静脈血栓とそれに伴う著明な粘膜下浮腫であり、腫瘍性増殖像は認めなかった。術後、隆起性病変は再発せず、排尿障害も認めていない。女性の原発性膀胱頸部閉塞症は稀で詳細不明とされてきたが、本症例のように静脈血栓症による尿道粘膜下浮腫も原因の1つになりうると考えられた。女性の排尿障害で、神経因性・外傷性・解剖学的・医原性の排尿障害が除外され、膀胱頸部に全周性の隆起性病変が認められれば、本病態を念頭に経尿道的腫瘍生検と切除を検討してみてもよいと考えられた。

### 高度排尿障害に合併した高アンモニア血症の1例

安東栄一・松本裕子・明比直樹（津山中央）

今回われわれは、高度排尿障害を原因とした高アンモニア血症で意識障害をきたした症例を経験したので報告する。【症例】81歳、男性。【既往歴】小児脳性麻痺、喘息、排尿障害。【既往歴】2011年8月26日に意識障害となり近医を受診したのち、同日当院内科を紹介となった。【経過】初診時の採血で高アンモニア血症を認め、その他は電解質、血糖などの異常を認めなかった。画像上も明らかな異常を認めず、高アンモニア血症が原因と考えられ入院となった。高アンモニア血症の明らかな原因が判然としなかったものの、ABPC/SBTの投与によって数日後、意識状態の改善傾向、アンモニア値の改善を認めた。その後尿培養でメチシリン感受性黄色ブドウ球菌が検出され、尿路感染を原因とした高アンモニア血症を疑われ当科紹介となった。包皮先端がpin holl状の真性包茎であり、それに伴う高度排尿障害、多量の残尿を認めた。まずは尿道カテーテルを留置し、後日包皮環状切除術を行った。その後の排尿状態は良好であり、高アンモニア血症の再発も認めていない。【考察】尿路感染症を原因とする高アンモニア血症は稀であるが、排尿障害を伴う意識障害の原因として留意する必要がある。

### 気腫性膀胱炎の3例

中塚浩一・上松克利・山田大介（三豊総合）

【症例1】71歳、女性。基礎疾患に慢性心不全、高血圧。全身倦怠感のため内科入院中、肉眼的血尿および下腹部痛あり。CTにて膀胱壁内のガス像を認め当科紹介。尿道カテーテル留置およびCTM投与にて軽快。【症例2】81歳、女性。基礎疾患に糖尿病。心不全による低酸素血症で内科入院中、CTにて膀胱内腔および壁内ガスを指摘され当科紹介。尿道カテーテル留置およびLVFX投与で治癒。【症例3】73歳、女性。基礎疾患に糖尿病と慢性腎不全(血液透析中)。下腿壊疽にて整形外科入院中、発熱、下腹部痛あり。帯下も多量とのことで婦人科紹介受診。CTにて卵巣捻転が疑われ試験開腹術を施行。術中所見にて卵巣は問題なく膀胱壁の黄色性変化を認め術中当科コンサルトとなった。全身状態も不良で、膀胱全摘は断念。尿道カテーテル留置、膀胱持続洗浄および抗菌化学療法を施行も全身状態は徐々に悪化、透析困難となり術後1カ月に死亡した。【考察】気腫性膀胱炎は膀胱内腔や、膀胱壁内のガス貯留を特徴とする

稀な膀胱炎であり、患者は糖尿病や神経因性膀胱、難治性尿路感染症などの基礎疾患を有することが多い。起炎菌は*Escherichia coli*、*Klebsiella*が多く、尿中グルコースの発酵によりガス貯留が見られる。治療としては自験例のごとく抗菌薬投与および膀胱ドレナージが主であるが、重症化する症例や気腫性腎盂腎炎の併発に伴い手術療法を選択せざるを得ない症例も存在する。上記の症例について文献的考察を加え報告する。

### ウイルス性尿路感染症の3例

片山 聡・藤田 治・眞鍋大輔

三枝道尚・武田克治（香川県立中央）

【症例1】60歳、男性。急性リンパ性白血病に対し2009年7月24日非血縁間同種骨髄移植を施行。同年12月21日より肉眼的血尿が出現し同日当科紹介。12月28日CTにて両側水腎症が出現し、同日両側尿管ステントを留置した。尿よりHHV6およびADV陽性であった。以後血尿は消失し尿路通過障害も改善したため両側尿管ステントを抜去し、腎機能の低下なく経過良好である。

【症例2】36歳、女性。急性骨髄性白血病に対し2011年5月6日臍帯血移植を施行。同年6月2日より肉眼的血尿が出現し6月9日当科紹介。6月13日CTにて両側水腎症が出現し、同日両側尿管ステントを留置した。肉眼的血尿コントロールが難しく6月18日両側腎瘻造設した。尿よりCMV陽性であった。以後血尿は消失し尿路通過障害も改善したため両側腎瘻抜去し、腎機能の低下なく経過良好である。

【症例3】49歳、女性。慢性腎不全に対し2009年4月17日当科にて献腎移植を施行。2011年7月10日より悪寒および肉眼的血尿が出現し、7月20日当科紹介。7月22日CTにて移植腎水腎症が出現し同日腎瘻造設した。尿よりADV陽性であった。以後血尿が消失し尿路通過障害も改善したため8月9日腎瘻抜去し、腎機能の低下なく経過良好である。

3例ともに水腎症を呈し尿管ステントあるいは腎瘻造設を行い軽快した。今回我々はウイルス性尿路感染症の3例を経験したので、若干の文献的考察を加えて報告する。

### IgG4関連前立腺炎の1例

伊藤誠一・光畑直喜（呉共済）

佐々木なおみ（呉共済・病理）

症例は68歳、男性。PSA 8.2 ng/mlにて他院で前立腺生検を施行、10カ所生検中1カ所でGS6 (3+3)の前立腺癌を認めた。CTにて左傍大動脈リンパ節に転移を疑う所見があり内分泌治療を開始したが、セカンドオピニオンの希望があり1カ月後に当院へ紹介あり。御本人は前立腺全摘を希望、PSA値、生検陽性本数、GS等から傍大動脈リンパ節転移の可能性は低いと判断し手術を施行した。術中前立腺周囲の癒着が強く癌浸潤を思わす所見があったが病理所見はpT2a、GS6 (3+3)、前立腺両葉にわたりほぼ全域に多数の形質細胞浸潤が見られIgG4陽性細胞が50%以上を占めておりIgG4関連前立腺炎の合併を認めた。術後検査したIgG4は884 mg/dl、1年7カ月経過後のIgG4も821 mg/dlと高値であるが臨床的に他臓器のIgG4関連疾患を示唆する所見は認めていない。

### 当科における精索捻転症の臨床的検討

仲田悠一・後藤隆文・高橋雄介・浅井 武

白井秀仁・羽田祥子（岡山医療センター・小児外科）

精索捻転症は、精索の軸捻転により精巣の血流障害をきたし、放置すれば精巣壊死をきたす疾患である。2004年1月から2011年11月までに当科では9例（9精巣）の精索捻転症を経験した。年齢は、日齢0から15歳11カ月で、中央値は12歳11カ月。患側は右側2例、左側7例で、両側捻転は認めていない。新生児例を除く8例で緊急手術を施行しており、4例で精巣摘出術、4例で精索捻転解除術（内1例は用手整復後）を施行した。また、同时对側精巣固定術は3例に行っており、現在は対側の固定術は同時に行う方針としている。

捻転解除術を施行した例は全例、症状発現から6時間以内に手術を施行しており、現在までのところ対側を含め精巣萎縮などもなく経過している。当科における精索捻転症の臨床的検討に、若干の文献的考察を加え報告する。

### デュタステリドの長期使用成績

河原弘之（玉島中央）

前立腺肥大症患者に対してデュタステリドの使用成績をまとめたので報告する。

【対象】当科に排尿障害を主訴に受診し、前立腺肥大症と診断されデュタステリドの投薬を1年以上続けた70例のうち評価可能な56例を対象とした。

【方法】PSAは投与後3カ月ごとに測定し、前立腺推定重量は6カ月ごとにCTにて測定した。

#### 【結果】

- 1) デュタステリド投与によりPSAは投与前平均値5.27が3カ月で3.84、6カ月で3.31、12カ月で2.60と約50%の低下が見られた。
- 2) PSAの変化はその特徴により4型に分けることができた。  
D: PSAが徐々に低下し低下が続いている。  
DF: PSAが早期に低下し以後、値を維持している。  
DU: PSAが早期に低下するが徐々に上昇してくる。  
NC: PSAの低下があまり見られないか、あっても前値の1/3以上の低下が認められない。
- 3) 推定重量は平均で39.1%の縮小が見られた。
- 4) 前立腺推定重量の変化は70歳以下のもの、またPSAの低下があまり見られないものでも縮小率は高かった。
- 5) 重量別変化では40g以下でも縮小率が高かった。

### 性同一性障害 Female to Male に対するホルモン補充療法とその身体的、血液生化学的変化の検討

杉本盛人・石井和史

渡部昌実・公文裕巳（岡山大）

佐古智子（倉敷成人病センター）

松本裕子（津山中央）

岡山大学病院では、泌尿器科、精神科、婦人科、形成外科の4科が連携し、性同一性障害の包括的診療を行っており、当科では主にFemale to Male (FTM) 患者に対するホルモン補充療法を行っている。今回我々はホルモン補充療法における投与量と男性化効果との

関係、および血液生化学データの変化について検討を行った。

対象は2000年9月から2010年6月までに当科でホルモン補充療法を新規に開始した患者のうち、3カ月以上の経過観察が可能であった患者196人を対象にした。投与開始より3, 6, 12カ月目に問診を含む診察、血液検査を施行。月経停止、低声化、髭の増加が生じた時期について、retrospectiveに検討を行った。また投与3カ月以降の血液データの変化を検討した。

患者背景は年齢18~42歳（中央値26歳）。投与量の内訳は125mg/3週が3人、125mg/2週が102人、250mg/3週が57人、250mg/2週が34人であった。身体的変化に関しては、6カ月以降の出現率では投与量間の有意差は見られなかった。血液データでは有意な多血症、高脂血症の傾向が見られたほか、血清クレアチニン、尿酸の上昇を認めた。また投与量間の検討では多血症および血清尿酸値に関して投与量に依存して増加する傾向を認めた。

FTM患者に対するホルモン投与により、多血症、高脂血症、高尿酸血症を来す可能性が示唆され、一部のデータは投与量に依存していた。また、長期での男性化効果の出現率は投与量に依存していないことから、必要最低限の投与量が望ましいと思われる。

### 膀胱バラングリオーマ（傍神経節腫）の1例

堀川雄平・野崎邦浩・大枝忠史（尾道市立市民）

症例は80歳代、女性。心不全にて当院循環器内科で精査加療中、肉眼的血尿を認めたため、当科紹介。CTでは膀胱右側壁に30mm大の腫瘍を認め、内部に低吸収域を認めていた。膀胱鏡では右尿管口奥に非乳頭状、広基性腫瘍を認め、粘膜下腫瘍が疑われた。尿細胞診はクラスIIであった。MRIにて腫瘍は内部に嚢胞を認めており、腫瘍部で筋層の連続性を認めなくなることから、平滑筋腫やバラングリオーマなどが疑われた。生検目的にTUR-Btを施行。病理結果はバラングリオーマであった。血中と尿中カテコラミン3分画には異常なく、血圧も降圧薬でコントロール良好であった。このため年齢と心疾患を考慮し、膀胱部分切除などは行わず、経過観察中である。バラングリオーマは副腎外褐色細胞腫とも呼ばれ、膀胱に発生するのはバラングリオーマの10%程度との報告があり、比較的稀な疾患である。本症例につき、若干の文献的考察を行い報告する。

### 膀胱憩室内に発生したNephrogenic adenomaの1例

藤田竜二・河内啓一郎・津島知靖（岡山医療センター）

症例は79歳、女性。2011年8月頻尿と肉眼的血尿を主訴に当科受診。膀胱鏡検査にて膀胱憩室内に易出血性の絨毛状病変を認め、表在性膀胱腫瘍と診断した。尿細胞診は陰性。経尿道的膀胱生検および膀胱憩室電気凝固術を行った。病理組織診は乳頭状に増殖する腫瘍で表面を腎尿細管細胞に類似した単層立方上皮が覆っており、その間質ではN/C比が高く細胞内小腺腔を持つ細胞が浸潤性に増殖しておりNephrogenic adenomaと診断された。Nephrogenic adenoma（腎原性腺腫）は慢性的な感染や手術侵襲などにより、尿路に発生する比較的稀な良性腫瘍と考えられているが、肉眼的には表在性膀胱癌に類似しており、再発率の高い疾患であること、病理学的にclear cell adenocarcinomaに類似しているために注意が必要であることなどが指摘されている。その発生源は近年になり、尿中に流れ出た腎尿細管細胞が損傷のある尿路上皮に生着した増殖性



自家移植であることが判明した。今回我々は Nephrogenic adenoma の 1 例を経験したので若干の文献的考察を加えて報告する。

#### 膀胱癌術後腹壁再発に対して皮弁形成にて腹壁再建した 1 例

小武家 誠・坂本英起・中田哲也  
小泉文人 (岩国医療センター)  
青 雅一・森定 淳・片山裕子  
(岩国医療センター・形成外科)  
藤田竜二 (岡山医療センター)  
安東栄一 (津山中央)

症例は 75 歳、男性。膀胱癌にて 2010 年 2 月 9 日当科初診、画像精査にて cT2N0M0 と診断し、3 月 18 日 TURBT (UC, G3, Tis, UC, G3, T1 以上)、5 月 14 日膀胱尿道全摘、回腸導管造設術 (UC, G3, pT2apN0) を施行した。その後外来加療中、術後約 4 カ月目の 9 月 29 日 CT では異常を認めなかった。10 月中旬より臍下腫瘍に結節を触知され近医で加療されていたが腫瘍の増大があり、11 月 25 日当科紹介され CT で腹壁再発を認め同日入院となった。臍尾側正中創上方に 10 × 10 cm の表面発赤、圧痛を伴う可動性不良な腫瘍を触知し、膀胱癌術後腹壁再発と診断し、入院の上 GC (GEM, CDDP) 療法を開始した。治療開始後も再発腫瘍の増大を認め、12 月 6 日腹壁再発腫瘍摘除術、大腿皮弁形成による腹壁再建術を施行した。病理結果は膀胱癌の転移であった。術中播種による腹壁転移再発例の報告は少なく、本症例では外科的切除により NED が得られており、文献的考察を加えて報告する。

#### 広島市民病院における腹腔鏡下前立腺全摘出術 (LRP) の初期導入経験

黒瀬恭平・枝村康平・榮枝一磨・山崎智也  
西村慎吾・日下信行・雑賀隆史 (広島市民)

【目的】広島市民病院泌尿器科では 2011 年 6 月より後腹膜鏡下前立腺全摘除術 (以下 LRP) を導入し、2011 年 9 月より施設認定を得ている。LRP 導入初期経験を報告する。【対象】2011 年 6 月～11 月末までの 32 症例の限局性前立腺癌に対して LRP を行った。年齢は 57～75 (中央値:68.5) 歳、PSA 2.8～34.3 (8.7) ng/ml、臨床病期は T1b:1 例、T1c:13 例、T2a:5 例、T2b:2 例、T2c:10 例、T3a:1 例であった。執刀は腹腔鏡技術認定医 3 名で行った。DVC 処理は自動吻合器を用い、膀胱～尿道吻合は 3-0 PDS-II による連続縫合にて行った。【結果】手術時間は 163～394 (250) 分、出血量は 10～2040 (65) ml 分であった。術中重篤な合併症はなく、同種血輸血を行った症例はなかった。大きな前立腺 (110 g) による内視鏡操作困難のため開腹となった 1 例を除き、全例鏡視下に完遂可能であった。遅発性直腸損傷を 1 例認めたが、保存的に加療可能であった。【結語】LRP は安全に導入可能であった。今後、制癌性および尿失禁などの QOL について評価予定である。

#### 原発性精巣上体癌の 1 例

大平 伸・横山光彦・大畑 絢  
藤田雅一郎・福元和彦・藤井智浩  
常 義政・宮地禎幸・永井 敦 (川崎医大)

症例は 39 歳、男性。既往歴・家族歴に特記事項なし。2010 年 11 月 29 日左陰嚢内腫瘍触知を主訴に当科を受診。左精巣上体に圧痛

のない、小指頭大・弾性硬の腫瘍を触知した。血液生化学検査では CRP 0.7 mg/dl と軽度上昇の他は異常を認めなかった。尿検査でも異常を認めなかった。超音波検査では 3 cm 大の内部不均一な充実性の精巣上体腫瘍を認めた。CT, MRI 検査でも内部に造影効果を伴う腫瘍を認めた。悪性の可能性も否定できないことから、2011 年 2 月 15 日左高位精巣摘除術を施行。精巣上体は 30 × 28 × 27 mm 大で、病理組織学的所見では出血・壊死を伴う低分化型癌を認めた。転移性腫瘍の可能性も考慮し全身精査を行ったが、他に原発巣を疑う所見はなく原発性精巣上体癌と診断した。2011 年 11 月現在、再発・転移の兆候なく生存中である。精巣上体腫瘍において悪性腫瘍の占める割合は約 20% であり、転移性腫瘍が最も多く、その原発巣は胃・肝・脾などの消化器や腎・前立腺などである。精巣上体原発性悪性腫瘍は極めて稀であり、その確定診断には転移性腫瘍の否定が必要である。精巣上体原発の悪性腫瘍を経験したので若干の文献的考察を加えて報告する。

#### 広島市民病院における前立腺癌のがん診療地域連携パスについて

雑賀隆史・日下信行・黒瀬恭平・枝村康平  
西村慎吾・山崎智也・榮枝一磨 (広島市民)

【背景】昨今、大病院志向などを背景とした一部の大病院や基幹病院への患者の偏在化により、急性期病院に勤務する医療者の負担増を招いていることから、医療機能の分化と連携を推進することで地域の医療機関それぞれが専門性と効率性を高め、また地域の医療資源を有効に活用し、地域医療全体の質の向上を図るという視点から、平成 22 年度診療報酬改定においてがん診療連携拠点病院などを中心とした連携の評価が算定されるようになった。【対象および方法】広島市民病院泌尿器科では前立腺癌根治手術施行症例に対して 2011 年 7 月より地域連携パスを用いて地域医療機関と情報交換を行い、退院後の治療、観察の連携を依頼している。【現況と課題】広島市および周辺医療圏に連携登録を依頼し、登録施設数は増加している。さらに放射線治療後、内分泌療法継続などの連携パスを作成し、当該患者の登録、連携を進めている。一方で算定要因の不適合や連携開始時期などの課題も明らかになってきた。【まとめ】広島市民病院における前立腺癌の地域連携パスを提示するとともに、課題事項について報告する。

#### 前立腺癌に対する REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究 - 中間報告 -

佐々木克己・那須保友・渡部昌実・賀来春紀  
平田武志・谷本竜太・公文裕己 (岡山)

【緒言】岡山大学では、2011 年 1 月より、前立腺癌に対して REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた新規遺伝子治療臨床研究を開始した。この臨床研究では、従来から適応とされてきた去勢抵抗性再燃前立腺癌に加えて、ハイリスク初発限局性前立腺癌に対する術前ネオアジュバント療法についても検討を行っている。【方法】対象は、A 群) : 去勢抵抗性再燃前立腺癌および、B 群) : ハイリスク初発限局性前立腺癌の 2 群、ベクター投与用量は低・中・高の 3 群で、A・B 群それぞれ 12 例ずつの治療を予定している。A 群では 4 週、B 群では 2 週の間隔で 2 回のベクター投与を行い、B 群では、2 回目投与 6 週後に前立腺全摘術を行って組織学的抗腫瘍効果の検討を行っている。【結果】2011 年 12 月現在ま



で、A 群 4 例、B 群 9 例、計 13 例に前立腺局所遺伝子治療を実施した。A 群の 1 例で原疾患の進行に伴い、治療の中断を余儀なくされたが、他の 12 例では予定通りの治療遂行が可能であり、問題となる副作用も認めなかった。A 群の 1 例で進行の抑制を認め、追加投与を行っている。また B 群では中用量のベクター投与から組織学的、免疫学的効果が得られ、高用量では、これらの効果の顕在化が

見られると同時に PSA の低下も認められた。【結論】 REIC/Dkk-3 遺伝子治療は投与ベクター用量の増加とともに効果の顕在化が認められつつあり、今後、次世代の自己がんワクチン化療法として、次のステップである高度医療への申請を目指して研究開発を進めていく予定である。

# REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer

TAKESHI HIRATA<sup>1</sup>, MASAMI WATANABE<sup>1-3</sup>, HARUKI KAKU<sup>1-3</sup>, YASUYUKI KOBAYASHI<sup>1</sup>, HIROSHI YAMADA<sup>4</sup>, MASAKIYO SAKAGUCHI<sup>5</sup>, KOHJI TAKEI<sup>4</sup>, NAM-HO HUH<sup>5</sup>, YASUTOMO NASU<sup>1-3</sup> and HIROMI KUMON<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Department of Urology, <sup>2</sup>Center for Gene and Cell Therapy, <sup>3</sup>Innovation Center Okayama for Nanobio-Targeted Therapy, Departments of <sup>4</sup>Neuroscience and <sup>5</sup>Cell Biology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama, Japan

Received January 13, 2012; Accepted March 21, 2012

DOI: 10.3892/ijo.2012.1503

**Abstract.** Bladder cancer is one of the most common urogenital malignancies. The intravesical instillation of anticancer agents is an attractive strategy to treat a superficial lesion or floating/disseminated cancer cells after transurethral operation. An adenovirus carrying REIC/Dkk-3, a tumor suppressor gene (Ad-REIC), exhibits cancer-specific apoptotic effects in various types of cancer cells. The aim of the present study was to examine the potential of Ad-REIC as a therapeutic agent for bladder cancer. KK47 and RT4 human bladder cancer cells were sensitive to the Ad-REIC treatment for apoptosis induction, but some human bladder cancer cell lines (T24, J82 and TccSup) were resistant. Significant cell growth inhibition was observed when these resistant cancer cell lines were treated with Ad-REIC in a condition of floating cells, which is clinically observed after transurethral operation and becomes a cause of intravesical cancer dissemination. The therapeutic potential of Ad-REIC for the treatment of multidrug-resistant bladder cancer was investigated. The adriamycin-resistant KK47 bladder cancer cells (KK47/ADM), which also present multidrug resistance, showed induction of significant apoptosis following Ad-REIC treatment. The Ad-REIC treatment induced downregulation of P-glycoprotein in KK47/ADM cells and restored the sensitivity to doxorubicin (adriamycin). Ad-REIC suppressed P-glycoprotein expression in a c-Jun-NH2-kinase (JNK)-dependent manner. Therefore, the current study indicated two therapeutic aspects of the Ad-REIC agent

against human bladder cancer cells, as an apoptosis inducer/cell growth inhibitor and as a sensitizer of chemotherapeutic agents in multidrug-resistant cancer cells. The intravesical instillation of Ad-REIC could be an attractive therapeutic method in human bladder cancer where the treatment of superficial lesions and floating/disseminated or multidrug-resistant cancer cells is necessary.

## Introduction

Bladder cancer is one of the most common urogenital malignancies. More than 2/3 of bladder cancer presents as superficial (pTa or pT1), which means the tumor is confined to the epithelium or lamina propria. Noninvasive bladder cancer can be completely resected by transurethral resection of bladder tumors. However, 50-70% of bladder cancer recurs and 15-30% progresses to muscle invasive disease, despite a complete transurethral operation (1). Therefore, bladder cancer is a highly recurrent disease and intravesical instillation of anti-cancer agents after transurethral operation is an attractive strategy to prevent the cancer cell dissemination and recurrence. Intravesical chemotherapy and/or immunotherapy are often added after a transurethral operation to prevent intravesical cancer recurrence and progression. However, the tumor recurrence rates are still high and reported to be 30-44% with the adjuvant intravesical treatment (2). Therefore, novel therapeutic agents for the treatment of superficial lesion and floating/disseminated cancer cells are necessary.

The reduced expression in immortalized cell (REIC) gene is identical to Dickkopf-3 (Dkk-3), which is a member of the Dickkopf gene family. Expression of REIC/Dkk-3 gene is significantly downregulated in a broad range of human cancer cells, but typically expressed in non-malignant cells (3-10). The REIC/Dkk-3 is thought to be a tumor suppressor gene and to provide a possible means of gene therapy for human malignant tumors. An adenovirus vector carrying REIC/Dkk-3 (Ad-REIC) induces apoptosis in prostate cancer and testicular cancer, but not in normal cells (5,9,10). Overexpression of REIC/Dkk-3 protein in cancer cells by Ad-REIC treatment leads to endoplasmic

---

*Correspondence to:* Dr Masami Watanabe, Center for Gene and Cell Therapy, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700-8558, Japan  
E-mail: mwcorrespondence@gmail.com

*Key words:* reduced expression in immortalized cells/Dickkopf-3, bladder cancer, apoptosis, P-glycoprotein, c-Jun-NH2-kinase

reticulum (ER) stress and activation of c-Jun-NH2-kinase (JNK), which induce cancer specific cell apoptosis (9).

The aim of present study was to investigate the potential of Ad-REIC as a therapeutic agent for bladder cancer. Recent study showed that some human bladder cancer cell lines are resistant to Ad-REIC treatment for apoptosis induction (11). This study used an *in vitro* cancer cell floating condition to assess the possibility of Ad-REIC intravesical treatment and re-evaluated the efficacy of Ad-REIC in these resistant bladder cancer cell lines. In addition, the appearance of cancer cells resistant to multiple chemotherapeutic agents is a serious obstacle. Doxorubicin (adriamycin) is a major intravesical chemotherapeutic agent that is used immediately after a transurethral operation to prevent cancer cell dissemination (12). However, doxorubicin resistant bladder cancer has become a clinical problem. The multidrug resistance phenotype is often associated with increased expression of adenosine triphosphate (ATP) binding cassette (ABC) superfamily proteins, P-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistance-associated protein1 (MRP1) (13,14). The enhancement of the JNK pathway downregulates P-gp and reverses P-gp mediated multidrug resistance in cancer cells (15). These findings led to the hypothesis that the JNK activation by Ad-REIC treatment might be able to downregulate P-gp and overcome multidrug resistance. Therefore, this study also investigated the potential of Ad-REIC as a sensitizer of chemotherapeutic agents in the adriamycin resistant KK47 bladder cancer cells.

## Materials and methods

**Cells and cell culture.** Human bladder cancer cell lines, KK47 (KK47/Wt), RT4, T24, J82 and TccSup were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). The adriamycin resistant human bladder cancer cell line KK47/ADM was kindly provided by Professor S. Naito (Department of Urology, University of Kyushu, Fukuoka, Japan) (16). KK47/ADM cells were grown in RPMI-1640 medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml), and 1 µM doxorubicin (Adriacin™, Kyowa Hakkoh Co., Tokyo, Japan). Other bladder cell lines were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/ml).

**Adenovirus vector carrying REIC/Dkk-3 (Ad-REIC).** A full-length cDNA of REIC/Dkk-3 was integrated into the cosmid vector, pAxCawt, and then it was transferred into an adenovirus vector by the COS-TPC method (Takara Bio, Shiga, Japan) (17). An adenovirus vector carrying the LacZ gene (Ad-LacZ) was used as a control, as described previously (5).

**Apoptosis assay.** A sample of  $5.0 \times 10^5$  cells were seeded in flat-bottom 6-well plates and incubated for 24 h. The cells were then treated with Ad-LacZ and Ad-REIC at the indicated MOI in 0.5 ml of complete medium for 1 h, and 1.5 ml of fresh medium was added and the cells were incubated for 72 h. The apoptotic cells were visualized by Hoechst 33342 staining. Hoechst 33342 is an intercalating dye that can help to determine the total chromatin quantity variations and the degree of chromatin condensation (18,19). The dye solution was added

into the medium and incubated in the dark for 10 min. The cells were directly observed with phase contrast and fluorescence microscopy. The apoptotic cells were identified by the presence of highly condensed or fragmented nuclei. Apoptotic cells were counted in five different fields using microscopic observations. One hundred cells were judged under one field.

**Cell viability assay.** The cells were detached by trypsin and  $5.0 \times 10^5$  cells in 1 ml complete medium were put into 15 ml tube to assess the anti-proliferative effect of Ad-REIC in the floating cell condition. These floating cancer cells were treated with Ad-LacZ or with Ad-REIC at the indicated MOI with constant agitation for 1 h. These cells were then seeded in flat-bottom 6-well plates and incubated for 72 h. The cell viability was determined using the MTS assay (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corp., Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions.

The cells were seeded in flat-bottom 96-well microplates at a concentration of 1,000 cells per well to carry out the cell viability assay in the Ad-REIC and doxorubicin combined treatment. The cells were incubated for 24 h and treated with Ad-LacZ and Ad-REIC at 100 MOI in the complete medium for 1 h. The medium was exchanged to the fresh medium and the cells were incubated for 24 h. The floating dead cells were removed and attached cells were treated with doxorubicin at the indicated concentration for 48 h. The cell viability was determined using the MTS assay.

**Western blot analysis.** The cells were treated with Ad-LacZ and Ad-REIC at 100 MOI, and cultured for 24 h. The floating dead cells were removed and attached cells were lysed for the sample. The cells were lysed with ice-cold lysis buffer to extract proteins. Insoluble fragments were removed by centrifugation, and the supernatants were adjusted to equal protein concentration in each experiment. Samples (10 µg of protein) were separated on a 7.5% SDS-PAGE gel and transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF membranes; Millipore, Billerica, MA, USA) for western blotting. Following the transfer, the membranes were blocked for 1 h with 5% nonfat milk powder, 6% glycine and 0.1% Tween-20 in Tris buffered saline (TBS) at room temperature. The membranes were incubated for 1 h at room temperature with the primary antibodies; T5168 (1:8,000) for tubulin (Sigma), rabbit anti-human REIC/Dkk-3 antibody raised in this laboratory (1:1,000) and C219 (1:250) for P-gp (Calbiochem, San Diego, CA, USA). After 3 washes in TBS supplemented with 0.1% Tween-20, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature. The bound antibodies were visualized by the enhanced chemiluminescence detection method (ECL kit, Amersham Pharmacia Biotech, Chandler, AZ, USA) using medical X-ray film. JNK inhibitor (1 µM) (SP600125, A.G. Scientific Inc., San Diego, CA, USA) was added to inhibit the kinase activity of JNK in some experiments.

**Statistical analysis.** The data are presented as the mean ± SE. Student's unpaired t-test was performed for the statistical analysis between the two groups and the difference was considered to be significant at  $p < 0.05$ . The analyses were carried out using the StatView 4.5 software package (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA).

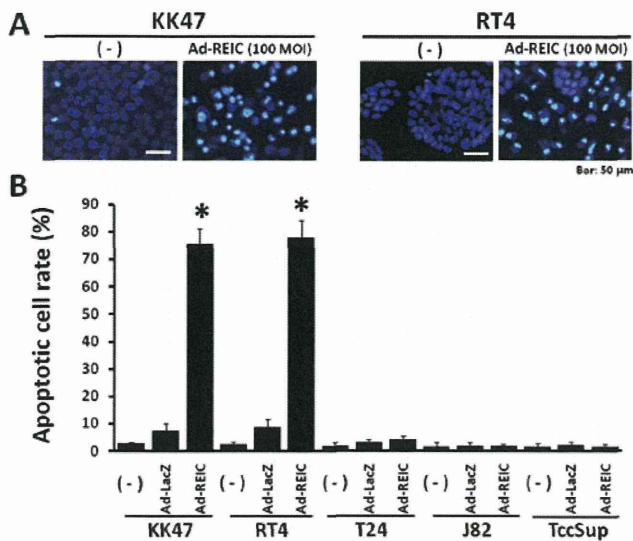


Figure 1. (A) Apoptosis induction after Ad-REIC treatment was analyzed by Hoechst 33342 staining in KK47 and RT4 human bladder cancer cells. Apoptotic cells were clearly observed as brightening cells under fluorescence microscopy. (B) The apoptotic cell rate was examined after the indicated treatment (no treatment, Ad-LacZ and Ad-REIC at 100 MOI) in various human bladder cancer cell lines (KK47, RT4, T24, J82, and TccSup). Apoptotic cells were counted by Hoechst 33342 staining. \* A significant difference was observed between the control Ad-LacZ and Ad-REIC treatment.

## Results

**Apoptosis induction by Ad-REIC treatment in various human bladder cancer cell lines.** Significant apoptotic induction was observed in KK47 and RT4 human bladder cancer cells after Ad-REIC treatment, but not in T24, J82 and TccSup cells (Fig. 1A and B). The incidence of apoptosis by Ad-REIC at 100 MOI was 75.6% in KK47 and 78.0% in RT4 and a significant difference was observed in comparison to the control Ad-LacZ treatment at 100 MOI. The apoptotic cell rate by Ad-REIC in T24, J82 and TccSup human bladder cancer cells was 4.2%, 2.0% and 1.8%, respectively. Therefore, KK47 and RT4 cells are sensitive to Ad-REIC treatment, however, T24, J82 and TccSup cells are resistant under these conditions.

**Ad-REIC significantly reduces bladder cancer cell viability in the floating cell condition.** T24, J82 and TccSup cancer cells were resistant to the Ad-REIC treatment for apoptosis induction under standard cell culture conditions. These resistant cancer cell lines were re-evaluated for Ad-REIC treatment in a floating cell condition, which is clinically observed after transurethral operation and becomes a cause of the intravesical cancer dissemination. The resistant cancer cell lines, T24 and J82 were treated with Ad-REIC at 100, 500 and 1,000 MOI in a floating culture for 1 h and then cultured for 72 h to access the anti-proliferative effect of Ad-REIC. Significant cell growth inhibition was observed in both T24 and J82 bladder cancer cell lines (Fig. 2A). The MTS assay showed that the cell viability at Ad-REIC 1,000 MOI was 20.0% in T24 and 18.2% in J82 cells and a significant reduction in cell viability was observed in comparison to that of the control Ad-LacZ treatment at 1,000 MOI (Fig. 2B). Therefore, significant cell growth inhibition was observed in T24 and J82 cells by the floating cell culture

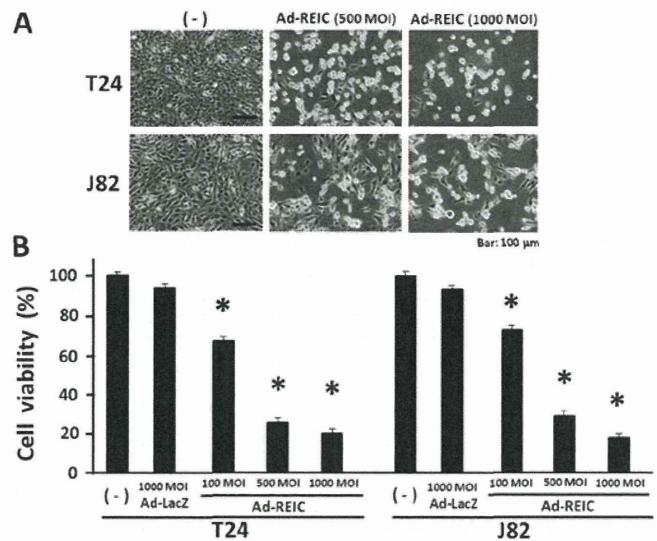


Figure 2. (A) The Ad-REIC resistant cancer cell lines (T24 and J82) in Fig. 1 were treated with Ad-REIC in floating cell conditions. The floating cancer cells were treated with Ad-REIC at the indicated MOI for 1 h with constant agitation. After the treatment, the cells were seeded in flat-bottom 6-well plates and incubated for 72 h. The representative microscopic image in each treatment is shown. (B) The floating T24 and J82 cancer cells were treated with the control (no treatment and Ad-LacZ at 1,000 MOI) and Ad-REIC treatment at 100, 500 and 1,000 MOI. The cells were seeded in flat-bottom 6-well plates and incubated for 72 h. The cell viability is then examined by MTS assay in the T24 and J82 cancer cells. \* A significant difference was observed between the control Ad-LacZ and Ad-REIC treatment. The cell viability of no treatment was considered 100% and the relative cell viability was calculated in the indicated treatment.

with Ad-REIC at 100, 500 and 1,000 MOI. The TccSup cancer cells also showed significant growth suppression following the Ad-REIC treatment at 1,000 MOI in comparison to the control Ad-LacZ treatment (data not shown).

**Apoptosis induction in KK47/Wt and KK47/ADM cells by Ad-REIC treatment.** Apoptosis induction by Ad-REIC was assayed in adriamycin resistant KK47 bladder cancer cells (KK47/ADM) which also presents multidrug resistance (16). The incidence of apoptosis by Ad-REIC at 100 MOI was 75.6% in KK47/Wt and 65.2% in KK47/ADM and significant apoptosis induction was observed in comparison to the control Ad-LacZ treatment (Fig. 3). The incidence of apoptosis by Ad-REIC at 10 MOI was not significant in either KK47/Wt or KK47/ADM cells in comparison to the control Ad-LacZ treatment.

**Ad-REIC treatment sensitizes multidrug resistant KK47/ADM cells to doxorubicin.** The multidrug resistant KK47/ADM cells were used to determine the effect of combined treatment with Ad-REIC and doxorubicin (adriamycin). KK47/Wt and KK47/ADM cells were divided into three groups of no treatment, Ad-LacZ and Ad-REIC at 100 MOI. The ability of Ad-REIC to reverse drug resistance was evaluated by exposing the cells to increasing concentrations of doxorubicin. KK47/Wt cells showed no significant difference between the treatment groups (Fig. 4). However, Ad-REIC treatment significantly shifted the dose-response curve for doxorubicin toxicity to lower concentrations in KK47/ADM cells (Fig. 4). The cell viability at 2.5  $\mu$ M doxorubicin was 80.4%, 85.3% and 42.3% in the no treatment, Ad-LacZ



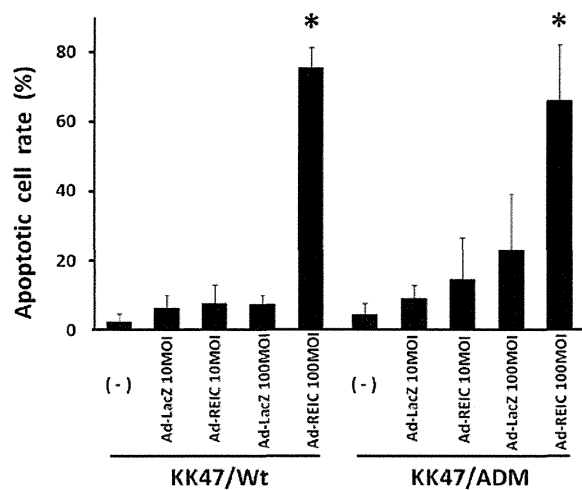


Figure 3. KK47/Wt and multidrug resistant KK47/ADM bladder cancer cells were treated with Ad-REIC at the indicated MOI. Apoptotic cells were counted by Hoechst 33342 staining. \* A significant difference was observed in comparison to the control Ad-LacZ at 100 MOI.

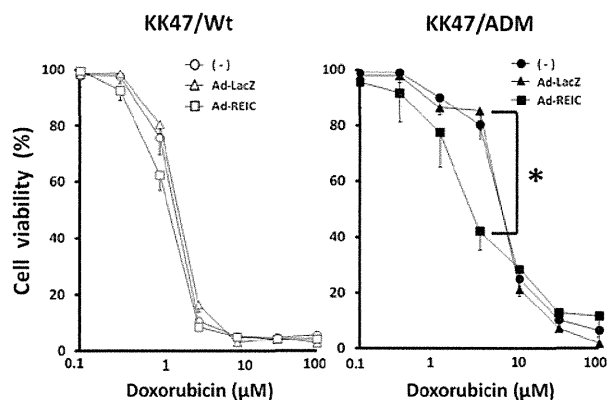


Figure 4. The sensitivity of multidrug resistant KK47/ADM bladder cancer cells to doxorubicin is restored by Ad-REIC treatment. KK47/Wt and KK47/ADM cells were treated (no treatment, Ad-LacZ and Ad-REIC at 100 MOI), and then incubated for 48 h in various concentrations of doxorubicin. The dose-response curves against doxorubicin toxicity are shown based on the cell viability assay. KK47/Wt cells show similar dose-response curves for doxorubicin in each treatment group. \* A significant difference was observed in KK47/ADM cells between Ad-LacZ and Ad-REIC at 2.5 μM doxorubicin. The cell viability at 0 μM doxorubicin was considered 100% in each treatment and the relative cell viability was calculated at the indicated concentration.

and Ad-REIC groups, respectively. Therefore, Ad-REIC treatment partially restored the sensitivity of KK47/ADM cells to doxorubicin.

*Ad-REIC treatment downregulates P-gp expression in KK47/ADM cells in a JNK-dependent manner.* The expression level of REIC/Dkk-3 and P-gp after Ad-REIC treatment was examined using western blot analysis (Fig. 5). REIC/Dkk-3 protein was strongly expressed by Ad-REIC treatment in both KK47/Wt and KK47/ADM cells. P-gp, the representative multidrug resistant protein, was expressed in KK47/ADM cells with no treatment or Ad-LacZ treatment. Ad-REIC treatment significantly down-regulated the expression of P-gp in KK47/ADM cells. The JNK pathway is a crucial factor for the cancer specific apoptosis in

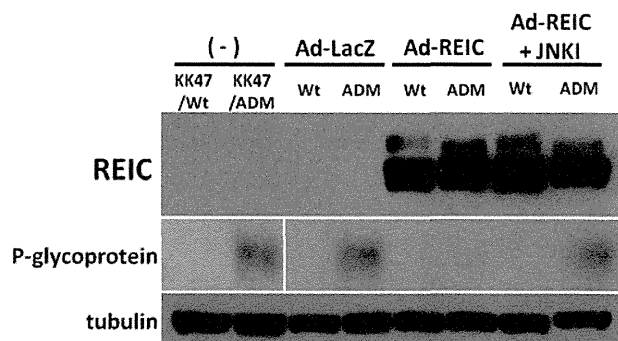


Figure 5. The expression of P-glycoprotein in multidrug resistant KK47/ADM bladder cancer cells is down-regulated by Ad-REIC treatment in a JNK-dependent manner. KK47/Wt and KK47/ADM cells were treated with Ad-LacZ and Ad-REIC at 100 MOI. The expression levels of REIC/Dkk-3 protein and P-glycoprotein were determined by western blot analysis. Tubulin was used as a loading control. A JNK inhibitor (JNKI), SP600125 was used to inhibit the kinase activity of JNK.

Ad-REIC treatment (5). SP600125, a JNK inhibitor, inhibits the kinase activity of JNK (20). Combined treatments with Ad-REIC and SP600125 reversed the expression level of P-gp in KK47/ADM cells. Therefore, Ad-REIC treatment suppressed the P-gp expression in the multidrug resistant KK47/ADM cells in a JNK-dependent manner.

## Discussion

This study showed that KK47 and RT4 cells are sensitive to Ad-REIC treatment for apoptosis induction and three human bladder cancer cell lines, T24, J82, and TccSup, are resistant. However, the efficacy of Ad-REIC treatment must not be evaluated in the standard cell culture conditions but in floating cell conditions in order to demonstrate the utility of Ad-REIC as intravesical therapeutic agent to prevent the recurrence of bladder cancer. Floating cancer cells are clinically observed after transurethral operation and are a cause of the intravesical cancer dissemination and recurrence. We herein demonstrated that Ad-REIC treatment significantly inhibited cell proliferation of the resistant bladder cancer cell lines in the floating cell condition. Since the Ad-REIC treatment did not inhibit proliferation of T24 and J82 cancer cells under the standard cell culture condition (data not shown), the floating cancer cells are more sensitive to Ad-REIC treatment. It is conceivable that Ad-REIC could transfect more efficiently to the floating cancer cells than the attached cells on the dish and therefore indicated the significant anti-cancer effect in the floating cell condition. The influence of adenovirus itself on the cells can be denied, because there was no significant difference between no treatment and Ad-LacZ treatment. Finally, Ad-REIC has anti-cancer effect in 6 human bladder cancer cell lines, RT4, KK47/Wt, KK47/ADM, T24, J82 and TccSup. This result suggests that the intravesical instillation with Ad-REIC could be an attractive therapeutic strategy to treat superficial lesion and floating/disseminated cells of human bladder cancer.

Bladder cancer often recurs after the transurethral resection of bladder tumors and such recurrent tumors arise at different sites in the urothelium. Even though the tumor is completely

resected macroscopically by the operation, microscopic floating or disseminated cells will implant in the bladder epithelium and the spread of the original clone forms multifocal tumors (21). The intravesical instillation of chemotherapeutic agents immediately after transurethral operation is clinically performed to prevent tumor recurrence (22,23) and it is important for the intravesical chemotherapy to kill the floating or disseminated malignant cells in the bladder. Representative anti-cancer agents for intravesical chemotherapy are epirubicin, mitomycin C and doxorubicin. However, multidrug resistant cancer cells or multidrug resistant cancer cells newly emerge during repeated doxorubicin treatments. The present study showed that combination therapy with Ad-REIC and doxorubicin significantly suppressed the growth of the multidrug resistant cell line KK47/ADM by restoring the sensitivity to doxorubicin.

Multidrug resistance is mainly attributed to the overexpression of efflux transporters such as P-gp and MRP1. P-gp and MRP1 are members of the ATP binding cassette (ABC) superfamily of transporters and are capable of effluxing many chemotherapeutics out of cancer cells, and allowing them to survive the toxic insult (13,14). There is a positive correlation between the expression of P-gp and multidrug resistant phenotypes in transitional cell carcinoma (24). On the other hand, the relationship between P-gp expression and JNK pathway was highlighted in a previous study showing that enhancement of the JNK pathway downregulates P-gp and reverses P-gp mediated multidrug resistance in cancer cells (15). Overexpression of REIC/Dkk-3 by Ad-REIC in cancer cells gives rise to endoplasmic stress and induces cancer cell specific apoptosis through the activation of JNK and c-Jun, whereas apoptosis is not induced in normal cells (5,25). The Ad-REIC treatment in KK47/ADM cells seemed to downregulate P-gp expression through JNK activation and reversed the drug resistance to doxorubicin. Similar findings were also obtained in the multidrug resistant human breast cancer MCF7/ADR cells. Ad-REIC treatment upregulates the expression of phosphorylated JNK and c-Jun in MCF7/ADR cells, and downregulates the level of P-gp following partial reversal of doxorubicin resistance (26).

The current study demonstrated two therapeutic aspects of the Ad-REIC agent against human bladder cancer cells, namely as an apoptosis inducer/cell growth inhibitor and as a sensitizer to chemotherapeutic agents in the multidrug resistant cancer cells. Therefore, the intravesical instillation of Ad-REIC could be an attractive therapeutic method in human bladder cancer where the treatment of superficial lesions and floating/disseminated or multidrug resistant cancer cells is required.

## References

- Dobruch J and Herr H: Should all patients receive single chemotherapeutic agent instillation after bladder tumour resection? *BJU Int* 104: 170-174, 2009.
- Kurth KH, Bouffieux C, Sylvester R, van der Meijden AP, Oosterlinck W and Brausi M: Treatment of superficial bladder tumors: achievements and needs. The EORTC Genitourinary Group. *Eur Urol* 37 (Suppl 3): 1-9, 2000.
- Tsuji T, Miyazaki M, Sakaguchi M, Inoue Y and Namba M: A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 20-24, 2000.
- Tsuji T, Nozaki I, Miyazaki M, Sakaguchi M, Pu H, Hamazaki Y, Iijima O and Namba M: Antiproliferative activity of REIC/Dkk-3 and its significant down-regulation in non-small-cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 257-263, 2001.
- Abarzua F, Sakaguchi M, Takaishi M, Nasu Y, Kurose K, Ebara S, Miyazaki M, Namba M, Kumon H and Huh NH: Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of c-Jun-NH2-kinase. *Cancer Res* 65: 9617-9622, 2005.
- Abarzua F, Sakaguchi M, Tanimoto R, Sonogawa H, Li DW, Edamura K, Kobayashi T, Watanabe M, Kashiwakura Y, Kaku H, Saika T, Nakamura K, Nasu Y, Kumon H and Huh NH: Heat shock proteins play a crucial role in tumor-specific apoptosis by REIC/Dkk-3. *Int J Mol Med* 20: 37-43, 2007.
- Edamura K, Nasu Y, Takaishi M, Kobayashi T, Abarzua F, Sakaguchi M, Kashiwakura Y, Ebara S, Saika T, Watanabe M, Huh NH and Kumon H: Adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene transfer inhibits tumor growth and metastasis in an orthotopic prostate cancer model. *Cancer Gene Ther* 14: 765-772, 2007.
- Watanabe M, Kashiwakura Y, Huang P, Ochiai K, Futami J, Li SA, Takaoka M, Nasu Y, Sakaguchi M, Huh NH and Kumon H: Immunological aspects of REIC/Dkk-3 in monocyte differentiation and tumor regression. *Int J Oncol* 34: 657-663, 2009.
- Kashiwakura Y, Ochiai K, Watanabe M, Abarzua F, Sakaguchi M, Takaoka M, Tanimoto R, Nasu Y, Huh NH and Kumon H: Down-regulation of inhibition of differentiation-1 via activation of activating transcription factor 3 and Smad regulates REIC/Dickkopf-3-induced apoptosis. *Cancer Res* 68: 8333-8341, 2008.
- Tanimoto R, Abarzua F, Sakaguchi M, Takaishi M, Nasu Y, Kumon H and Huh NH: REIC/Dkk-3 as a potential gene therapeutic agent against human testicular cancer. *Int J Mol Med* 19: 363-368, 2007.
- Jin Y, Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H and Huh NH: Partial sensitization of human bladder cancer cells to a gene-therapeutic adenovirus carrying REIC/Dkk-3 by downregulation of BRPK/PINK1. *Oncol Rep* 27: 695-699, 2012.
- Zincke H, Utz DC, Taylor WF, Myers RP and Leary FJ: Influence of thiotepa and doxorubicin instillation at time of transurethral surgical treatment of bladder cancer on tumor recurrence: a prospective randomized, double blind, controlled trial. *J Urol* 129: 505-509, 1983.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM and Deeley RG: Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654, 1992.
- Gottesman MM and Pastan I: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62: 385-427, 1993.
- Zhou J, Liu M, Aneja R, Chandra R, Lage H and Joshi HC: Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer cells by the c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res* 66: 445-452, 2006.
- Kimiya K, Naito S, Soejima T, Sakamoto N, Kotoh S, Kumazawa J and Tsuruo T: Establishment and characterization of doxorubicin-resistant human bladder cancer cell line, KK47/ADM. *J Urol* 148: 441-445, 1992.
- Abarzua F, Kashiwakura Y, Takaoka M, Watanabe M, Ochiai K, Sakaguchi M, Iwawaki T, Tanimoto R, Nasu Y, Huh NH and Kumon H: An N-terminal 78 amino acid truncation of REIC/Dkk-3 effectively induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 614-618, 2008.
- Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, Jalloustre C, Reiffers J, Bernard P and Lacombe F: A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 17: 59-65, 1994.
- Maciorowski Z, Delic J, Padoy E, Klijanienko J, Dubray B, Cosset JM, Dumont J, Magdelénat H and Vielh P: Comparative analysis of apoptosis measured by Hoechst and flow cytometry in non-Hodgkin's lymphomas. *Cytometry* 32: 44-50, 1998.
- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM and Anderson DW: SP600125, an anthranyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13681-13686, 2001.
- Harris AL and Neal DE: Bladder cancer - field versus clonal origin. *N Engl J Med* 326: 759-761, 1992.

22. Oosterlinck W, Kurth KH, Schroder F, Bultinck J, Hammond B and Sylvester R: A prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group randomized trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of epirubicin or water in single stage Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder. *J Urol* 149: 749-752, 1993.
23. Solsona E, Iborra I, Ricos JV, Monros JL, Casanova J and Dumont R: Effectiveness of a single immediate mitomycin C instillation in patients with low risk superficial bladder cancer: short and long-term follow-up. *J Urol* 161: 1120-1123, 1999.
24. Naito S, Sakamoto N, Kotoh S, Goto K, Matsumoto T and Kumazawa J: Correlation between the expression of P-glycoprotein and multidrug-resistant phenotype in transitional cell carcinoma of the urinary tract. *Eur Urol* 22: 158-162, 1992.
25. Sakaguchi M, Kataoka K, Abarzua F, Tanimoto R, Watanabe M, Murata H, Than SS, Kurose K, Kashiwakura Y, Ochiai K, Nasu Y, Kumon H and Huh NH: Overexpression of REIC/Dkk-3 in normal fibroblasts suppresses tumor growth via induction of interleukin-7. *J Biol Chem* 284: 14236-14244, 2009.
26. Kawasaki K, Watanabe M, Sakaguchi M, Ogasawara Y, Ochiai K, Nasu Y, Doihara H, Kashiwakura Y, Huh NH, Kumon H and Date H: REIC/Dkk-3 overexpression downregulates P-glycoprotein in multidrug-resistant MCF7/ADR cells and induces apoptosis in breast cancer. *Cancer Gene Ther* 16: 65-72, 2009.



BiP/GRP78 の抑制による REIC/Dkk-3 遺伝子  
治療抵抗性前立腺がんの感受性化

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学

谷 本 竜 太

DOWN-REGULATION OF BiP/GRP78 SENSITIZES RESISTANT  
PROSTATE CANCER CELLS TO GENE-THERAPEUTIC  
OVEREXPRESSION OF REIC/Dkk-3

RYUTA TANIMOTO

Department of Urology, Okayama University Graduate School of Medicine,  
Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan

西 日 本 泌 尿 器 科 別 冊

2012年10月発行

(第74巻第10号)

## BiP/GRP78 の抑制による REIC/Dkk-3 遺伝子 治療抵抗性前立腺がんの感受性化

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学

谷 本 竜 太\*

### 抄録:

我々は、以前より REIC/Dkk-3 遺伝子によるがん特異的細胞死誘導について詳細に解析し、アデノウイルスベクターを用いた REIC/Dkk-3 (Ad-REIC) のがん遺伝子治療への有効性について報告してきた。しかし、最近、膀胱がん、骨肉腫、胃がん由来細胞株等の中で、Ad-REIC による強制発現に対して強い耐性を示す細胞株が存在することがわかってきた。そこで本研究では、Ad-REIC による細胞死に対する耐性能獲得の原因タンパク質の同定を行い、耐性の克服を目指した。

我々はまず、REIC/Dkk-3 過剰発現による細胞死に対して強い耐性を示す細胞株を感受性細胞から単離した。得られた獲得性耐性株と最初から耐性を示した内因性耐性株を多数解析することで、小胞体分子シャペロンの1つである BiP/GRP78 (BiP) タンパク質の発現量と耐性が非常によい相関を示すことを見出した。さらに、このタンパク質の発現を siRNA を用いて人為的に抑制すると、Ad-REIC に対する感受性が回復した。これらの結果より、BiP タンパク質の発現量の増大が耐性獲得に重大な役割を担っていることが判明した。

本研究により、BiP が Ad-REIC によるがん遺伝子治療に対する内因性および獲得性耐性診断に有用であるだけでなく、その耐性克服のための極めて有力な分子標的であることが明らかになった。

(西日泌尿. 74 : 531-537, 2012)

キーワード：遺伝子治療, REIC, Dkk-3, BiP, GRP78

### 緒 言

REIC/Dkk-3 は、ヒト正常線維芽細胞の不死化に伴って発現が低下する遺伝子として岡山大学で同定された新規がん抑制遺伝子である<sup>1)</sup>。REIC 遺伝子発現アデノウイルス (Ad-REIC) によるがん細胞への遺伝子導入により、REIC の発現が抑制されている多くのがん細胞では小胞体内腔に折り畳みが不完全な REIC タンパク質 (unfolded REIC) が大量に蓄積し、小胞体ストレスによる直接的アポトーシスが誘導される<sup>2)3)</sup>。また、REIC タンパク質は末梢血単球を樹状細胞へと分化誘導するなど免疫活性化能があり、細胞傷害性 T 細胞の誘導による抗腫瘍効果を発揮する<sup>4)</sup>。一方、REIC を大量に発現している正常細胞ではアポトーシスは誘導されず、小胞体ス

トレス応答として IL-7 (免疫活性化サイトカイン) の産生が誘導され、NK 細胞が活性化されて抗腫瘍効果が発揮される<sup>5)</sup>。これらの相乗効果により、Ad-REIC 腫瘍内局所投与法は、種々のマウス実験モデルにおいて局所がん原発病巣はもとより遠隔がん転移病巣にも顕著な治療効果を示すことが実証され<sup>6)</sup>、次世代の自己がんワクチン治療法として期待されている。

これらの研究を踏まえ、岡山大学では Ad-REIC 製剤を用いた医師主導の前立腺がん遺伝子治療臨床研究を、前立腺がんでの再発ハイリスクグループにおける術前の再発予防投与、ならびに内分泌療法抵抗性の再燃がんに対する治療として実施している。

しかし、ここで留意すべき点は、本治療法に対するがん細胞の耐性の問題である。治療の過程において新たな耐性がんが出現するとすれば、治療法としては解決すべき課題となる。一方、最近、膀胱がん、骨肉腫、胃がん由来細胞株の中で Ad-REIC に対し、強い耐性を示す細

\* 〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1  
TEL 086-235-7287, FAX 086-231-3986  
E-mail: tanimo10@gmail.com

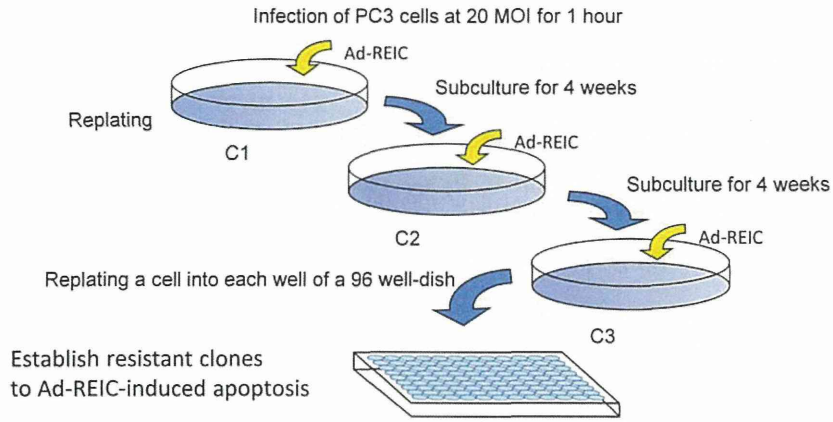


Fig. 1 Schema for isolation of Ad-REIC-resistant PC3 clones

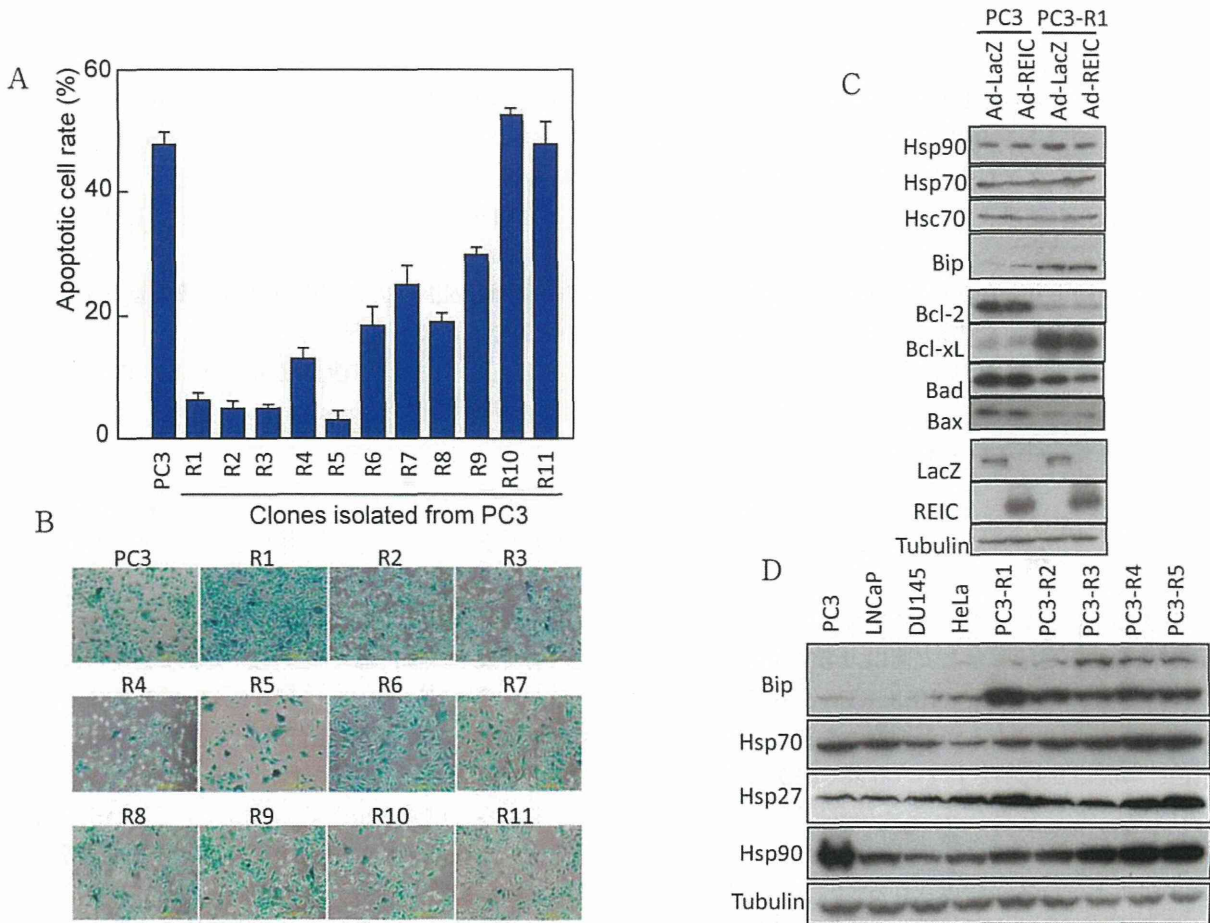


Fig. 2 Isolation of PC3 cell clones resistant to Ad-REIC and overexpression of BiP in the resistant clones. (A) Rates of apoptosis induced by Ad-REIC (20 MOI) of PC3 cells and PC3-derived clones (R1~R11) that were obtained after exposure to Ad-REIC 3 times. (B) Infection efficiency of Ad-LacZ to PC3 cells and PC3-derived clones determined by staining with X-gal after infection with Ad-LacZ at 20 MOI. (C) Western blot analysis for proteins belonging to the family of heat shock/chaperone proteins and Bcl family proteins. Cell extracts were prepared 24 h after infection with Ad-LacZ or Ad-REIC at 20 MOI. Tubulin was used as a control. (D) Western blot analysis for heat shock / chaperone proteins of different cell lines and PC3-derived resistant clones (R1~R5). LNCaP and DU145 cells (prostate cancer) and HeLa cells (cervical cancer) are sensitive to Ad-REIC.

胞株が存在することもわかってきた<sup>7)</sup>。このような耐性が、がん細胞のどのような特性によるのかを解析することは、REIC/Dkk-3を標的としたがん治療を目指す上で極めて重要である。本稿では、Ad-REICの初回治療から耐性を示す内因性耐性株と獲得性耐性株を用いてAd-REICによるアポトーシス耐性能獲得のメカニズムと、その耐性の克服について概説する。

## 1. REIC 遺伝子治療抵抗性 前立腺がんクローンの確立

Ad-REICを前立腺がん細胞株PC3(Ad-REIC感受性細胞)に感染させると大部分の細胞が死滅するが、一部が生存して増殖する。その生残細胞に再びAd-REICを感染させるという操作を3回繰り返して、生存してきた

細胞群から11種のクローン(R1~R11)を得た(Fig. 1)。各クローンのAd-REICに対する感受性を検討したところ、R1~R5はAd-REICによる細胞死に対して強い耐性を示した。R6~R9は弱耐性を示し、R10とR11は親株PC3と同等の感受性を示した(Fig. 2A)。Ad-LacZを用いて感染効率を検討したが、これらのクローン間に著明な差はなく(Fig. 2B)、Ad-REIC耐性は感染効率の差によって生じるものではないことが確認された。

## 2. REIC 遺伝子治療抵抗性 原因因子のスクリーニング

REIC/Dkk-3に関する我々の一連の研究結果より、熱ショックタンパク質群やアポトーシス関連タンパク質群の発現変化がAd-REICによる細胞死誘導に対して部分的

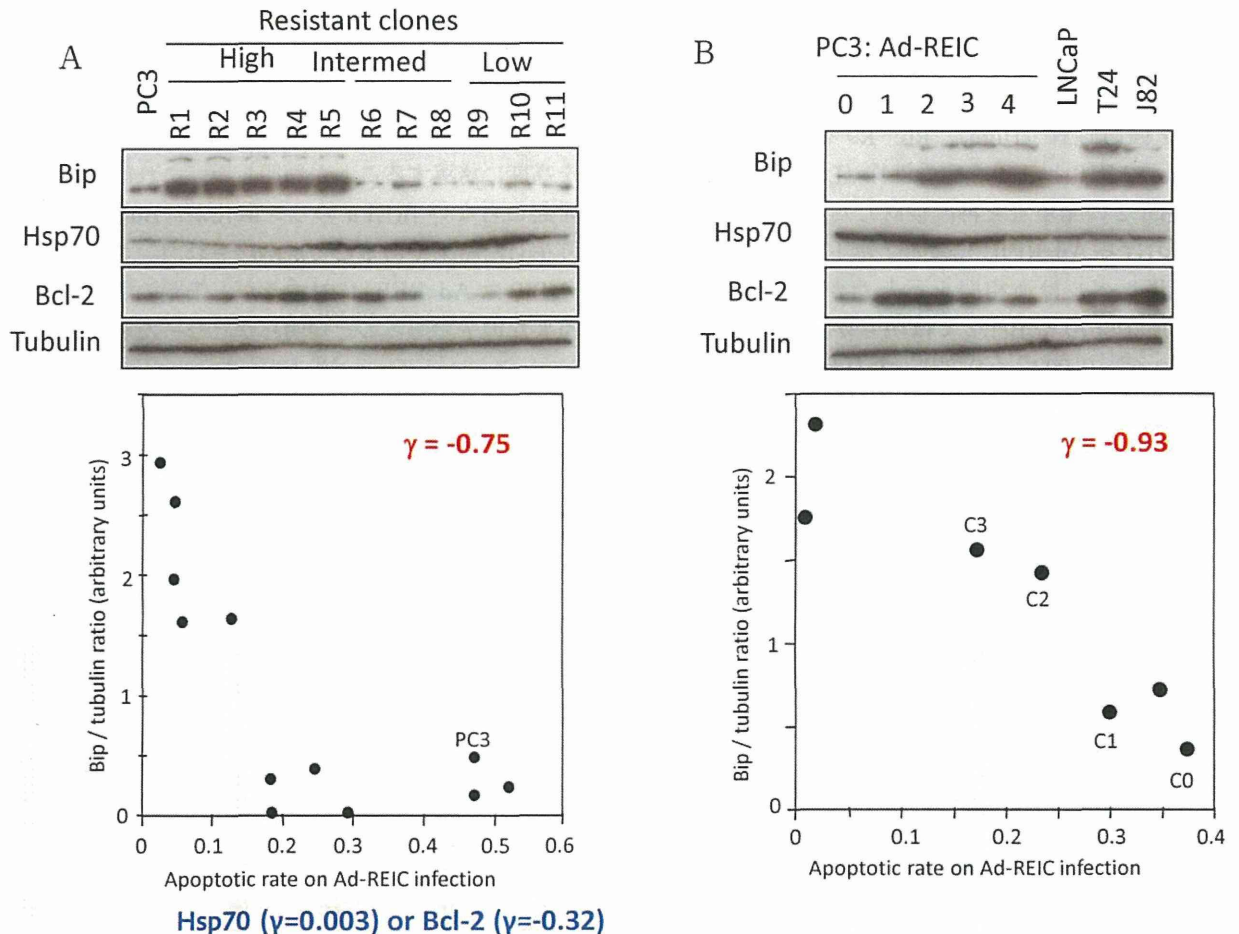


Fig. 3 Inverse correlation between expression levels of BiP and the rates of apoptosis induced by Ad-REIC (A) Upper panel: Western blot analysis for BiP, Hsp70 and Bcl-2 in PC3 cells and PC3-derived clones with varying resistance to Ad-REIC. Lower panel: Correlation between rates of apoptosis induced by Ad-REIC and expression levels of BiP among different clones.  $\gamma$ , correlation coefficient. (B) Analysis similar to that described in (A) in PC3 cells and PC3-derived populations that survived different cycles of Ad-REIC infection and recovery (C0~C4; 0 to 4 times). LNCaP is a sensitive prostate cancer cell line, and T24 and J82 are resistant bladder cancer cell lines.

に耐性を与えることがわかっていた<sup>7)8)</sup>。そこで、まず Ad-REIC 耐性獲得の原因となる因子を検討するため、耐性株の代表として R1 を選択し、これと親株 PC3 を用いて熱ショックタンパク質群とアポトーシス関連タンパク質群の発現レベルを比較検討した。その結果、Hsp90, Hsp70, Hsc70 の発現量に有意な差は認められなかった。アポトーシス抑制作用を持つ Bcl-2 と Bcl-xL については、Bcl-2 は PC3 で発現が高く、逆に Bcl-xL は R1 で発現が高かった。Bcl-2 と Bcl-xL の機能は類似しているので、全体としてはあまり大きな意味がないと考えた。一方、小胞体分子シャペロンである BiP/GRP78 (以下 BiP) は、R1 で顕著な発現上昇を認めた (Fig. 2C)。このため、耐性を与える候補因子として BiP に着目した。この BiP の発現は、すべての Ad-REIC 耐性クローン群で共通して上昇していた (Fig. 2D)。

### 3. BiP 過剰発現と Ad-REIC 耐性の関係

次に我々は、耐性クローンにおける BiP の過剰発現が Ad-REIC 耐性にどの程度関わっているのかを検討した。R1~R5 を強耐性株 (High), R6~R9 を弱耐性株 (Intermediate), R10 と R11 を感受性株 (Low) とし、BiP, Hsp70, Bcl-2 の発現量を再度検討した。それぞれのクローンにおける Ad-REIC によるアポトーシスの割合と BiP の発現レベルは逆相関を示したが ( $\gamma = -0.75$ ) (Fig. 3A), Hsp70 や Bcl-2 では明らかな相関は見られなかった ( $\gamma = 0.003, -0.32$ )。すなわち、耐性の強さ

に相関して BiP の発現上昇が認められた。同様に、Ad-REIC 感染回数ごとに生残してきた PC3 細胞 (ヘテロ集団) と内因性耐性細胞株 (T24, J82) においてもそれらは明らかな逆相関を示した ( $\gamma = -0.93$ ) (Fig. 3B)。以上の結果は、BiP が Ad-REIC 耐性に大きく関与していることを示していた。

### 4. BiP の機能抑制

我々は、BiP タンパク質の機能を抑制することができれば、Ad-REIC 耐性の克服が可能であると考えた。BiP タンパク質の機能を抑制する手段として RNAi 法に着目し、その効果を検討したところ、BiP 遺伝子の発現抑制によって R1 の Ad-REIC に対する耐性が解除された (Fig. 4A)。他の Ad-REIC 耐性クローン R3 や内因性耐性株、T24, J82 でも同様の結果が得られた (Fig. 4C, D, E)。正常ヒト線維芽細胞 OUMS-24 では Ad-REIC 感受性にはならなかった (Fig. 4B)。次に耐性クローンでの BiP 機能抑制による Ad-REIC 感受性の回復機序を検討した。R1 において BiPsiRNA は、ER ストレス誘導性アポトーシスに必須である JNK の活性化を高度に誘導することが判明した。これは、耐性株で通常起こらない IRE1 $\alpha$  のリン酸化が、BiP 機能抑制により生じた結果であることが示唆された。これらの結果より BiP は Ad-REIC に対するがん細胞の耐性化に非常に重要な因子であることが明らかとなった。

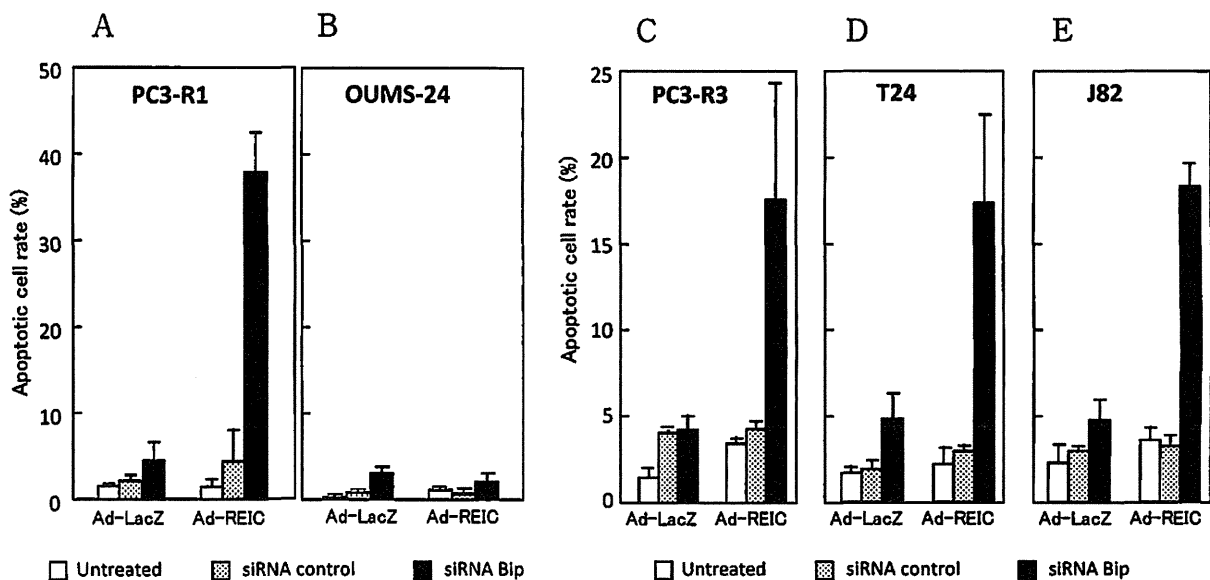


Fig. 4 Sensitization of cancer cells to Ad-REIC by down-regulation of BiP using siRNA. (A, B) Sensitization of PC3-R1 cells but not OUMS-24 cells to Ad-REIC by down-regulation of BiP using siRNA. (C, D, E) Sensitization of different cell types to Ad-REIC (20 MOI) by transfection of BiPsiRNA (0.2  $\mu$ M) 24 h prior to the Ad-REIC challenge.