

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10594

研究課題名(和文) 尿路癌の新たな治療標的および予後予測因子としてのFes/Ferに関する網羅的検討

研究課題名(英文) Investigation on usefulness of Fes / Fer as new therapeutic target and predictive factor in urothelial cancer

研究代表者

竹原 浩介 (TAKEHARA, Kosuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：40580345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高悪性度のT24 cellでFesをknock-downすると細胞増殖・浸潤・遊走が有意に( $P = 0.003$ 、 $0.018$ 、 $<0.001$ )低下したが、5637やRT4 cellでは認めなかった。また、膀胱癌患者203名において、high grade癌では筋層浸潤癌で有意に( $P = 0.002$ )高値で、癌細胞増殖と有意な正相関を認め( $P = 0.002$ )、転移出現期間が短かった( $P = 0.021$ )。一方、Fes/Ferと関連するclass III beta-tubulinは、シスプラチン抵抗性癌におけるPTXを含む二次化学療法の治療効果と有意に( $P = 0.021$ )関連していた。

研究成果の概要(英文)：In T24 cell which is urothelial cancer (UC) cell with high malignant potential, Fes knock-down (KD) lead to significantly suppression of cancer cell proliferation, invasion and migration ( $P = 0.003$ ,  $0.018$ , and  $<0.001$ , respectively). Such significant change by Fes-KD was not detected in 5637 and RT4 cell. In 2013 bladder cancer (BC) patients, there was no significant relationship between Fes expression and muscle invasive status. However, in patients with high grade cancer, Fes expression in muscle invasive BC (MIBC) was significantly higher ( $P = 0.002$ ) than that in non-MIBC (NMIBC), and its was positively correlated to cell proliferation ( $P = 0.002$ ). In addition, Fes expression was significantly associated with metastasis-free survival in high grade BC ( $P = 0.021$ ). On the other hand, class III beta-tubulin (TUBB3), which is Fes/Fer-related molecule, was useful predictor for anti-cancer effects of second-line paclitaxel-based chemotherapy for patients with cisplatin-resistant UC.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：Fes 尿路癌 癌細胞増殖 癌細胞浸潤 予後 TUBB3 化学療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 進行性尿路癌患者治療の中心は、シスプラチン (CDDP) を含む化学療法である。しかし、CDDP 抵抗性となった尿路癌に対し満足のいく抗腫瘍効果が得られる治療法は研究開始当初はなかったため、新たな治療標的の同定が重要であった。

(2) 血管新生が尿路癌を含むほとんどの固形癌の増殖や転移に重要な役割を果たす事は周知の事実である。我々は、以前より血管新生を制御するシグナル伝達物質や蛋白に関して、in vitro 研究を行い報告してきた。そして、それらの研究過程において、非受容体型チロシンキナーゼである『Fes』と『Fer』が血管新生に加えて、細胞増殖や細胞接着に重要な役割を果たすことを見出し、尿路癌における病理学的役割に注目した。

2. 研究の目的

非受容体型チロシンキナーゼ Fes / Fer について、以下を目的とした検討を行う

(1) 尿路癌における病理学的意義や分子生物学的役割を、in vivo、in vitro 両面から明らかにする。

(2) Fes / Fer の治療標的としての有用性や、組織での発現と病理学的特徴や予後との関連を解析する

(3) Fes / Fer と関連する分子について、尿路癌に対する化学療法の治療効果との関連について検討する。

3. 研究の方法

(1) 尿路癌の3つの cell lines (RT4, 5637, T24 cell) において、Fes / Fer の発現と癌細胞増殖や浸潤能、遊走能との関連を検討する。それぞれ、MTT assay、cell invasion assay、そして、scratch assay を用いて解析する。また、Fes / Fer の発現は Western blot により評価する。

(2) 同じく尿路癌の3 cell lines で si-RNA により Fes / Fer の発現を制御することで、上記の病理学的機能についてより詳細に解明する。

(3) 尿路癌患者の臨床検体において、免疫組織学的に Fes / Fer の発現を評価し、それらの発現と臨床病理学的特徴や予後との関連を解析する。なお、本研究では、203 名の膀胱癌患者において検討する。

(4) Fes / Fer の機能を解析する段階で、class III beta-tubulin (TUBB3) の役割に注目し解析を進めている。この TUBB3 は進行性尿路癌患者に用いられるパクリタキセル (PTX) の抗腫瘍効果と関連することが報告されており、本研究では、尿路癌患者における発現を免疫組織学的に評価し、その抗腫瘍効果の予測因子としての有用性について統

計学的に解析する。

4. 研究成果

(1) 尿路癌細胞 (T24, 5673, RT4 cell) における Fes の発現とその病理学的意義に関して以下の結果を得た。

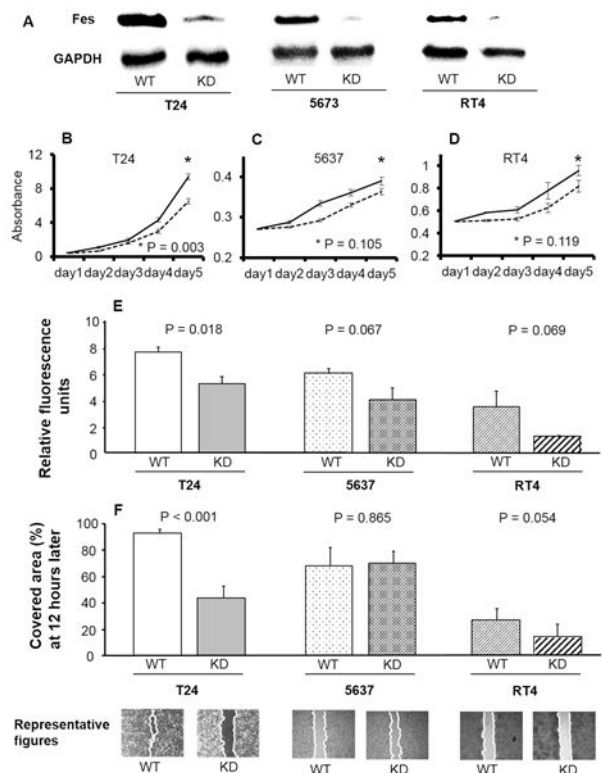
これらの cell lines の中で、最も悪性度の高い T24 cell で Fes の発現も最も強く、最も低悪性度の RT4 cell で Fes の発現は最も低かった。つまり、cell lines における検討では、Fes の発現は悪性度と正の関連にあることが示された。

si-RNA により Fes の発現を knock down (KD) すると、T24 cell において、Fes-KD 細胞は wild type に比し、細胞増殖能および浸潤能が有意に (それぞれ  $P = 0.003$ ,  $P = 0.018$ ) 低下した。また、遊走能についても FES-KD 細胞で有意 ( $P < 0.001$ ) に WT より低下していた。

一方、このような Fes の発現を抑制することにより、同様の病理学的特徴の変化を 5637 cell や RT4 cell でも認めたものの、統計学的には有意差を認めるレベルには届かなかった。

つまり、最も悪性度の高い T24 cell でのみ Fes は有意な病理学的や役割を果たす可能性が示唆された。

(1) に関する研究成果を以下に示す。



(2) 膀胱癌患者の組織における Fes の発現とその臨床病理学的特徴や予後との関連について、以下に示す結果が得られた。

正常の膀胱粘膜では Fes は強く発現していたが、膀胱癌細胞においては中程度の発現は見られたものの強発現している癌細胞はほとんど認めなかった。また、癌間質組織では、血管内皮細胞や浸潤細胞において強発現していた。

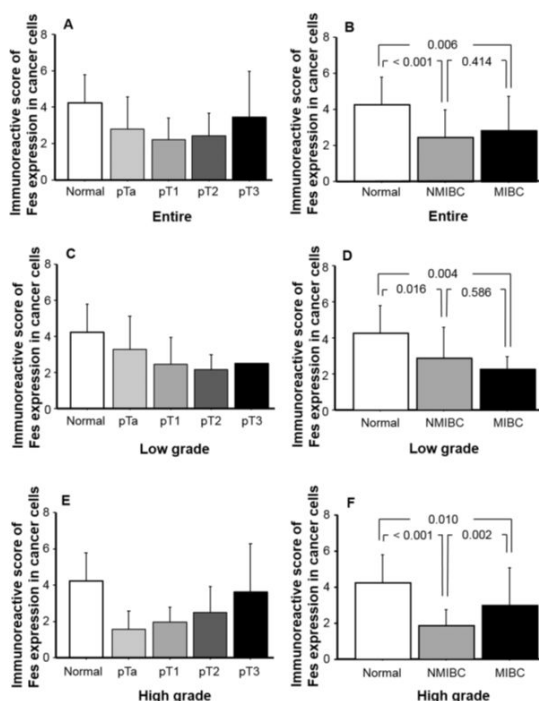
膀胱癌患者 203 名全体における解析では、Fes の発現は、pT stage とは関連を認めず、筋層浸潤癌と筋層非浸潤癌の間でも有意差は認めなかった。また、同様の解析を low grade 癌のみで行ったところ、同様に、pT stage や筋層浸潤の有無で有意差は認めなかった。

一方、これらの解析を high grade 癌でのみ行ったところ、有意差は認めないものの Fes の発現と pT stage には正に関連する傾向を認め、筋層浸潤癌における Fes の発現は、筋層非浸潤癌よりも有意に ( $P = 0.002$ ) 高値であった。

High grade 癌における Fes の発現を、正常粘膜も合わせて解析すると、正常粘膜細胞に比し膀胱癌細胞では Fes の発現は低下している一方、非筋層浸潤癌に比し筋層浸潤癌で発現が高かった。

つまり、発癌により低下した Fes の発現は、筋層浸潤により高値となる結果が得られた。

(2) - ~ に関する結果を以下に示す。

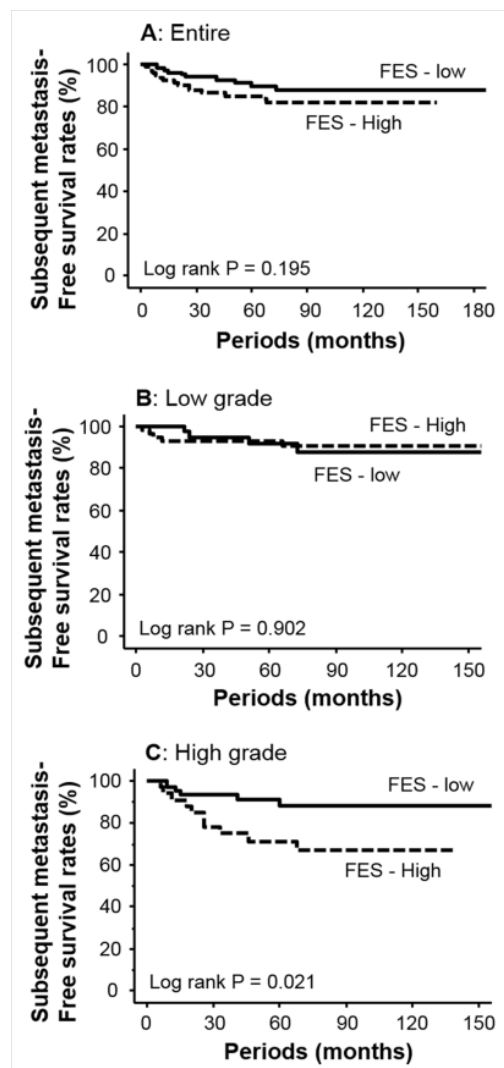


(3) 膀胱癌組織における Fes の病理学的役割や予後との関連について、以下に示す結果が得られた。

抗 Ki-67 抗体を用いた癌細胞増殖の検討では、膀胱癌患者全体の解析において Fes の発現と正の相関を示す傾向は認められたものの有意差は認めなかった ( $P = 0.068$ )。また、同様の検討を、low grade 癌で行ったところ、有意差は認めなかった ( $P = 0.607$ )。一方、high grade 癌での検討では、相関係数は  $0.296$  と高くはないものの有意な正の相関を認めた ( $P = 0.002$ )。

治療後の転移出現までの時期を、上記と同様に、膀胱癌患者全体、low grade 癌、high grade 癌に分けて Kaplan-Meier 曲線で検討したところ、膀胱癌患者全体および low grade 癌では Fes は有意な予後関連因子ではなかった (それぞれ  $P = 0.195$ ,  $P = 0.902$ )。しかし、high grade 癌では、Fes が高発現していた患者では、低発現の患者に比し有意 ( $P = 0.021$ ) に転移出現までの期間が短かった。

(3) - の結果を以下に示す。



(4) Fes / Fer の関連分子である TUBB3 の尿路癌治療効果予測因子としての意義

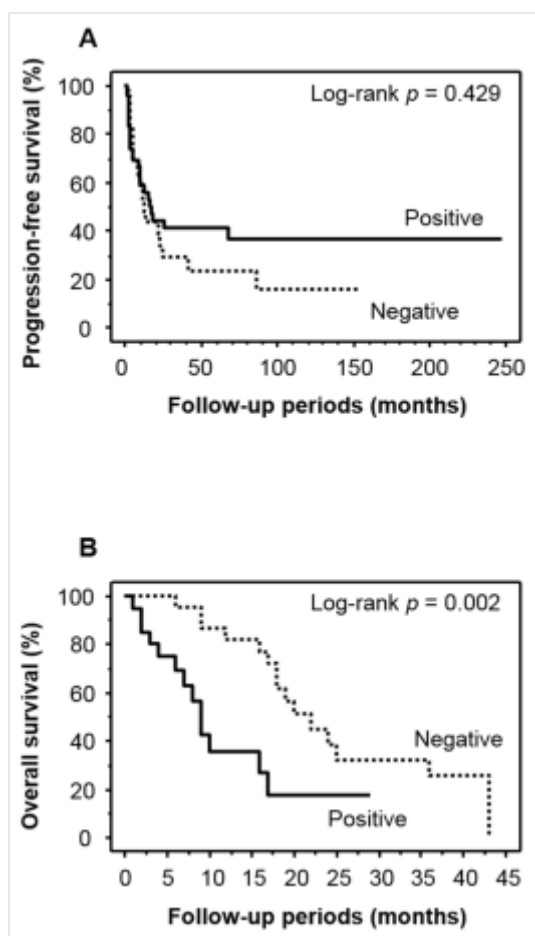
尿路癌組織における TUBB3 の発現を免疫組織学的に検討したところ、解析した 116 名のうち 64 名 (55.2%) で高発現と判定され、その発現は grade と有意な ( $P < 0.001$ ) 関連を認めた。

これらの患者において、一次治療として行われたシスプラチンを含む化学療法の抗腫瘍効果と TUBB3 発現の関連を検討したが、有意な関連は認めなかった (下図 A)。

一方、シスプラチン抵抗性となった後に二次治療としておこなった PTX を含む化学療法において、TUBB3 を高発現していた患者における全生存期間は、低発現の患者に比し有意に ( $P = 0.021$ ) 短かった (下図 B)。

この TUBB3 が PTX を含む二次治療による全生存期間に与える影響を、病理学的所見を含む多変量解析で検討すると、TUBB3 は独立した、有意な予後予測因子であった (ハザード比 3.44、95%信頼区間 1.15 - 10.33、 $P = 0.027$ )

(4) - 、 の結果を以下に示す。



## 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)

Asai A, Miyata Y, Takehara K, Kanda S, Watanabe SI, Greer PA, Sakai H.

Pathological significance and prognostic significance of FES expression in bladder cancer vary according to tumor grade. J Cancer Res Clin Oncol. 査読あり, 2018 Jan;144(1): 21-31.

doi: 10.1007/s00432-017-2524-1.

Miyata Y, Matsuo T, Nakamura Y, Yasuda T, Ohba K, Takehara K, Sakai H.

Expression of Class III Beta-tubulin Predicts Prognosis in Patients with Cisplatin-resistant Bladder Cancer Receiving Paclitaxel-based Second-line Chemotherapy. Anticancer Res. 査読あり, 2018 Mar;38(3): 1629-1635.

<http://ar.iiarjournals.org/>

[学会発表](計 0 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

竹原 浩介 (TAKEHARA, Kosuke)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・  
客員研究員  
研究者番号：40580345

(2) 研究分担者

宮田 康好 (MIYATA, Yasuyoshi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・  
准教授  
研究者番号：60380888

(2) 研究分担者

望月 保志 (MOCHIZUKI, Yasushi)  
長崎大学・病院 (医学系)・准教授  
研究者番号：40404256