

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月12日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10605

研究課題名(和文) 分子生物学プロファイリングによる膀胱上皮内癌治療効果と予後予測マーカーの探索

研究課題名(英文) Molecular biological profile of carcinoma in situ of urinary bladder as predictive and prognostic markers

研究代表者

藤本 清秀 (FUJIMOTO, KIYOHIDE)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50264867

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)：膀胱上皮内癌のBCG療法抵抗性には、膀胱癌組織のOCT3/4、vimentinの発現上昇、E-cadherinとCXCL1の発現低下、CD4、CD8、CD56、CD204、Foxp3陽性細胞の誘導の有無が関連する。局所浸潤や転移の予後には膀胱癌組織における浸潤に関連するCLDN4、癌微小環境で再発・進展・薬剤耐性に関与するCXCL1、およびtumor buddingを誘導するcollagen type 1/1が関連する。また、筋層浸潤の予測には、尿中IL8、MMP9、MMP10、angiogenin A、APOE、SDC1、A1AT、PA、CA9、VEGFのパネルが有用である。

研究成果の概要(英文)：Expression of OCT3/4 and CXCL1 is associated with BCG treatment failure of carcinoma in situ of the urinary bladder. Induction of CD4+, CD8+, CD56+, CD204+, Foxp3+ immune cells is also associated with BCG treatment outcomes of non-muscle invasive bladder cancer including carcinoma in situ. CLDN4 expression of cancer cells and CXCL1 in the tumor microenvironment is associated with recurrence, progression and drug resistance. Collagen type 1 and collagen type 1 expression in tumor budding site is associated with muscle invasion. A biomarker panel including IL8, MMP9, MMP10, angiogenin A, APOE, SDC1, A1AT, PA, CA9, and VEGF is a useful tool for predicting muscle invasive progression of carcinoma in situ.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：膀胱癌 上皮内癌 膀胱内注入療法 CLDN CXCL1 Collagen CD56 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

膀胱上皮内癌 (carcinoma *in situ*: CIS) の臨床病理学的特徴には、第9染色体欠失、*TP53* や *FGFR3* の変異、血管新生、上皮間葉系転換 (EMT)、癌幹細胞の関与が示唆される。CIS やその前段階の平坦病変 (過形成や異形成) を伴う膀胱癌の再発・進展とこれらの因子の関係を解析することで CIS の自然史が解明され、予後予測や治療選択の分子マーカーの確立が期待される。CIS に生じる遺伝子変化と治療抵抗性については、第9染色体欠失と *TP53* 変異が高率にみられるが、CIS の臨床病理学的多様性を規定する変化ではない。

一方、CIS では DNA メチル化異常により細胞間接着因子である *E-Cadherin* の発現が低下することが報告され、EMT に最も特徴的な遺伝子変化として *E-Cadherin* の発現低下は、CIS の治療抵抗性の因子としても注目された。BCG 療法施行例を対象に、臨床病理学的因子と EMT マーカー (Vimentin、*E-Cadherin*)、癌幹細胞マーカー (OCT3/4) の発現について比較検討を行ったところ、OCT3/4 および Vimentin の発現上昇と *E-Cadherin* の発現低下が BCG 療法抵抗性と関連した。すなわち、癌幹細胞マーカーを発現し、EMT 形質を示す CIS は、BCG 療法抵抗性であることが明らかとなった。

また、隆起性腫瘍に随伴する CIS と比較し、CIS 単独発生の病変は上皮層直下の血管新生が顕著であり、これらのシグナル経路異常は DNA メチル化異常により惹起されることが報告されていた。

2. 研究の目的

CIS 発生と臨床病理学的多様性の原因として EMT や血管新生に関連する遺伝子の DNA メチル化異常を同定し、CIS に対する BCG 療法抵抗性を診断する分子マーカーの確立を目的とした。膀胱癌患者を対象に網羅的 DNA メチル化解析の結果も有しており、CIS 病変を加えて再解析することで CIS 特異的な DNA メチル化異常を抽出することができる。分子マーカー候補を段階的に絞り込み、組織・尿検体を用いた検証に加え、BCG 療法の治療効果と予後を予測するマーカーを抽出する。

3. 研究の方法

本研究は膀胱癌 (CIS、筋層非浸潤癌、筋層浸潤癌) を対象に BCG 療法抵抗性に関連する遺伝子変化を明らかにし、DNA メチル化を指標とした BCG 治療抵抗性および予後予測マーカーの確立を目的とする。CIS 特異的な EMT や血管新生関連遺伝子の異常と発現、あるいは免疫応答の状況から BCG 療法抵抗性のマーカーの選定を行う。

4. 研究成果

膀胱癌患者および健常者の尿と膀胱組織を対象に DNA メチル化プロファイリング解

析を行い、unsupervised クラスタリング解析から特異的な DNA メチル化プロファイルを作成し、膀胱癌の再発の原因となるエピジェネティックフィールド効果を確認した。

BCG 療法抵抗性因子として、tight junction マーカーである CLDN 1 と CLDN 4、間葉系マーカーの vimentin、さらに癌幹細胞マーカーの OCT3/4 の発現を評価し、OCT3/4 発現が BCG 療法抵抗性に関与し、CLDN4 発現が局所浸潤や転移に関連すること、抗ヒト CLDN4 モノクローナル抗体による細胞増殖・浸潤能の抑制、アポトーシスの誘導、細胞透過性の亢進、さらに抗癌剤への相加効果を確認した。

Multiplex urinary immunoassay により、尿中 IL8、MMP9、MMP10、angiogeninA、APOE、SDC1、A1AT、PA、CA9、VEGF を ELISA 法で測定したが、high grade CIS をはじめ筋層浸潤癌で発現が亢進し、10 個のバイオマーカーパネルによると感度:85%、特異度:81%、AUC:0.982 で、膀胱癌検出に本パネルが有用であることが明らかとなった。

筋層非浸潤性膀胱癌の癌微小環境における、腫瘍関連マクロファージ (TAM) と腫瘍関連線維芽細胞 (TAF) の意義を明らかにした。CXCL1、CD204 (TAM マーカー)、 α SMA (CAF マーカー)、*E-cadherin*、MMP2 を免疫染色し、CXCL1 発現が TAM と TAF のリクルートに関連し、腫瘍増殖と播種を促進することを明らかにした。癌微小環境における CXCL1 シグナルは再発、進展、さらに薬剤耐性に関与していた。また、膀胱癌が産生するコラーゲンタイプ α 1 とコラーゲンタイプ α 1 が、癌の浸潤ポイントにおいて tumor budding を誘導することを確認した。

BCG および各種抗癌剤の膀胱内注入療法により惹起される免疫細胞誘導とサイトカイン誘導について検討した。BCG 膀胱療法では CD4、CD8、CD56 が誘導されるが、CD204、制御性 T cell、PD-L1 は抑制されず BCG 療法抵抗性に関連することが示唆された。一方、抗癌剤のマイトマイシンでは、CD56、CD204、Foxp3 は抑制された。サイトカインについては、BCG は IL1A、IL12、IL17A を誘導し、マイトマイシンは IL4、IL17A を誘導するなど、薬剤により誘導する免疫応答細胞やサイトカインが異なることを確認した。

膀胱癌細胞のミトコンドリア内の鉄代謝異常を解析し、5-aminolevulinic acid、protoporphyrin、鉄イオン、活性酸素種、p53、ferrochelatase、heme oxygenase-1、peptide transporter-1、ATP-binding cassette group-2、hydroxymethylbilane synthase などの鉄代謝関連物質の動態から、鉄の蓄積が活性酸素種の増加を起こし、発癌や進展に関与することを明らかにした。Ferrochelatase 発現低下がヘム合成経路における protoporphyrin の蓄積に関係すること、p53 がミトコンドリア内の鉄代謝関連蛋白を制御することを明らかにした。

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 14 件)

1. Hori S, Miyake M, Tatsumi Y, Morizawa Y, Nakai Y, Onishi S, Onishi K, Iide K, Gotoh D, Tanaka N, Fujimoto K. Gamma-Klotho exhibits multiple roles in tumor growth of human bladder cancer. *Oncotarget* 13;9(28):19508-19524,2018.
2. Miyake M, Tatsumi Y, Matsumoto H, Nagao K, Matsuyama H, Inamoto T, Azuma H, Yasumoto H, Shiina H, Fujimoto K; Nishinohon Uro-Oncology Collaborative Group. Outcomes of subsequent non-muscle-invasive bladder cancer treated with intravesical Bacillus Calmette-Guérin after radical nephroureterectomy for upper urinary tract urothelial carcinoma. *BJU Int* 121(5):764-773,2018.
3. Miyake M, Morizawa Y, Hori S, Tatsumi Y, Onishi S, Owari T, Iida K, Onishi K, Gotoh D, Nakai Y, Anai S, Chihara Y, Torimoto K, Aoki K, Tanaka N, Shimada K, Konishi N, Fujimoto K. Diagnostic and prognostic role of urinary collagens in primary human bladder cancer. *Cancer Sci* 108(11):2221-2228, 2017.
4. Nakai Y, Ozawa T, Mizuno F, Onishi S, Owari T, Hori S, Morizawa Y, Tatsumi Y, Miyake M, Tanaka N, Tsuruta D, Fujimoto K. Spectrophotometric photodynamic detection involving extracorporeal treatment with hexaminolevulinate for bladder cancer cells in voided urine. *J Cancer Res Clin Oncol* 143(11):2309-2316, 2017.
5. Miyake M, Tatsumi Y, Gotoh D, Ohnishi S, Owari T, Iida K, Ohnishi K, Hori S, Morizawa Y, Itami Y, Nakai Y, Inoue T, Anai S, Torimoto K, Aoki K, Shimada K, Konishi N, Tanaka N, Fujimoto K. Regulatory T Cells and Tumor-Associated Macrophages in the Tumor Microenvironment in Non-Muscle Invasive Bladder Cancer Treated with Intravesical Bacille Calmette-Guérin: A Long-Term Follow-Up Study of a Japanese Cohort. *Int J Mol Sci* 18(10).pii:E2186, 2017.
6. Miyake M, Morizawa Y, Hori S, Marugami N, Iida K, Ohnishi K, Gotoh D, Tatsumi Y, Nakai Y, Inoue T, Anai S, Torimoto K, Aoki K, Tanaka N, Shimada K, Konishi N, Fujimoto K. Integrative Assessment of Pretreatment Inflammation-, Nutrition-, and Muscle-Based Prognostic Markers in Patients with Muscle-Invasive Bladder Cancer Undergoing Radical Cystectomy. *Oncology* 93(4):259-269, 2017.
7. Miyake M, Hori S, Morizawa Y, Tatsumi Y, Toritsuka M, Ohnishi S, Shimada K, Furuya H, Khadka VS, Deng Y, Ohnishi K, Iida K, Gotoh D, Nakai Y, Inoue T, Anai S, Torimoto K, Aoki K, Tanaka N, Konishi N, Fujimoto K. Collagen type IV alpha 1 (COL4A1) and collagen type XIII alpha 1 (COL13A1) produced in cancer cells promote tumor budding at the invasion front in human urothelial carcinoma of the bladder. *Oncotarget* 8(22):36099-36114, 2017.
8. Hori S, Miyake M, Tatsumi Y, Onishi S, Morizawa Y, Nakai Y, Tanaka N, Fujimoto K. Topical and systemic immunoreaction triggered by intravesical chemotherapy in an N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine induced bladder cancer mouse model. *PLoS One*

- 12(4):e0175494, 2017.
9. Miyake M, Hori S, Morizawa Y, Tatsumi Y, Nakai Y, Anai S, Torimoto K, Aoki K, Tanaka N, Shimada K, Konishi N, Toritsuka M, Kishimoto T, Rosser CJ, Fujimoto K. CXCL1-Mediated Interaction of Cancer Cells with Tumor-Associated Macrophages and Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Tumor Progression in Human Bladder Cancer. *Neoplasia* 18(10):636-646, 2016.
 10. Hori S, Miyake M, Onisi S, Tatsumi Y, Morizawa Y, Nakai Y, Anai S, Tanaka N, Fujimoto K. Clinical significance of α and β -Klotho in urothelial carcinoma of the bladder. *Oncol Rep* 36(4):2117-2125, 2016.
 11. Nakai Y, Anai S, Tanaka N, Chihara Y, Haramoto M, Otani T, Nakagawa Y, Hirao Y, Konishi N, Fujimoto K. Insignificant role of bacillus Calmette-Guérin maintenance therapy after complete transurethral resection of bladder tumor for intermediate- and high-risk non-muscle-invasive bladder cancer: Results from a randomized trial. *Int J Urol* 23(10):854-860, 2016.
 12. Goodison S, Ogawa O, Matsui Y, Kobayashi T, Miyake M, Ohnishi S, Fujimoto K, Dai Y, Shimizu Y, Tsukikawa K, Furuya H, Rosser CJ. A multiplex urinary immunoassay for bladder cancer detection: analysis of a Japanese cohort. *J Transl Med* 14(1):287, 2016.
 13. Morizawa Y, Miyake M, Shimada K, Hori S, Tatsumi Y, Nakai Y, Anai S, Tanaka N, Konishi N, Fujimoto K. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a detection marker of tumor recurrence in patients with muscle-invasive bladder cancer after radical cystectomy. *Urol Oncol* 34(6):257.e11-17, 2016.
 14. Nakai Y, Tatsumi Y, Miyake M, Anai S, Kuwada M, Onishi S, Chihara Y, Tanaka N, Hirao Y, Fujimoto K. Expression of ferrochelatase has a strong correlation in protoporphyrin IX accumulation with photodynamic detection of bladder cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 13:225-232, 2016.
- 〔学会発表〕(計5件)
1. Miyake M, Hori S, Morizawa Y, Nakai Y, Owari T, Itami Y, Tanaka N, Fujimoto K. Altered deposition of collagens promote tumor budding at the tumor invasion front in urothelial carcinoma of the bladder. 33rd Annual European Association of Urology Congress 2018年3月19日, Copenhagen, Danmark.
 2. Hori S, Miyake M, Tatsumi Y, Morizawa Y, Nakai Y, Onishi K, Iida K, Gotoh D, Itami Y, Tanaka N, Fujimoto K. Intravesical instillation of chemotherapeutic agents enhances immunomodulation of tumor microenvironment status in conventional BCG therapy. 33rd Annual European Association of Urology Congress 2018年3月19日, Copenhagen, Danmark.
 3. Hori S, Miyake M, Tatsumi Y, Morizawa Y, Nakai Y, Onishi S, Tanaka N, Fujimoto K. Clinical Significance of Gamma-Klotho in Urothelial Carcinoma of the Bladder. 37th Congress of the Société Internationale d'Urologie 2017年10月20日, Lisbon, Portugal
 4. Hori S, Miyake M, Tatsumi Y, Morizawa Y, Nakai Y, Goto D, Onishi K, Iida K, Onishi S, Tanaka N,

Fujimoto K. Evaluation of pro- and anti-tumor effect induced by three colony-stimulating factors, G-CSF/ GM-CSF/ M-CSF using a human bladder cancer xenograft model: Is G-CSF a friend of cancer cells? 32th Annual European Association of Urology Congress 2017年3月27日, London, United Kingdom.

5. Miyake M., Hori S, Morizawa Y, Toritsuka M, Tatsumi Y, Nakai Y, Anai S, Tanaka N, Shimada K, Fujimoto K. Deposition of type IV and XIII collagens promote tumor infiltration at the invasion front in human bladder cancer. 32th Annual European Association of Urology Congress 2017年3月26日, London, United Kingdom.

〔図書〕(計0件) 該当なし

〔産業財産権〕 該当なし

出願状況 (計0件) 該当なし

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) 該当なし

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 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本清秀 (Fujimoto Kiyohide)
奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50264867

(2) 研究分担者

千原良友 (Chihara Yoshitomo)
奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員
研究者番号：40405395

三宅 牧人 (Miyake Makito)

奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80601400

(3) 連携研究者 該当なし
()

研究者番号：

(4) 研究協力者 該当なし
()