

令和元年5月27日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11017

研究課題名(和文)化学療法抵抗性尿路上皮がんに対する5-Aza-CdRの臨床応用を目指した基礎研究

研究課題名(英文) A potential role of aberrant DNA methylation in the chemoresistance in bladder cancer cells

研究代表者

舛森 直哉 (Masumori, Naoya)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20295356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：in vivoの実験ではCDDP耐性膀胱癌細胞株に5-aza-CdRを投与した後にヌードマウスへ移植、その後CDDPを腹腔内投与し腫瘍のサイズを計測した。5-aza-CdRはmockおよびCDDP単独投与群と比較し、有意な腫瘍の増殖抑制効果を見とめた。miR-200とCDDPの組み合わせが、CDDP感受性因子(IGFBP3, ICAM1)および抗腫瘍効果に関わる因子(TRAIL, PUMA)を相乗的に誘導するとともに、多数のヒストン遺伝子の発現を抑制することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良である転移性膀胱癌に対して5-Aza-CdRを組み合わせた2次治療が臨床応用されることで、新たな治療法の開発につながり、多くの膀胱癌患者の予後延長効果が期待される。5-Aza-CdRが有効な患者を選択するためのコンパニオン診断マーカー候補を同定、2次治療に対する新たな分子標的薬の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We found that the treatment with 5-Aza-CdR strikingly suppressed tumor formation by CDDP-resistant BCa cells in nude mice. Because 5-Aza-CdR alone was sufficient to completely block the xenograft formation, no synergistic effect of 5-Aza-CdR plus CDDP was observed. miR-200b was associated with CDDP sensitivity in BCa cells, and its downregulation was associated with CpG island hypermethylation. Pharmacological demethylation using 5-aza-2'-deoxycytidine restored miR-200b expression, and the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine + CDDP strongly inhibited T24RC cell proliferation. Microarray analysis revealed that miR-200b + CDDP induced genes involved in CDDP sensitivity or cytotoxicity, including IGFBP3, ICAM1 and TNFSF10, in the resistant cells. Expression and DNA methylation of miR-200b were inversely associated in primary BCa, and low expression/high methylation was associated with poor overall survival. T

研究分野：尿路上皮癌

キーワード：転移性尿路上皮癌 化学療法抵抗性 エピジェネティック治療 予後予測マーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

転移を有する尿路上皮がんに対する治療は第1選択としてゲムシタピンを組み合わせたシスプラチン+ゲムシタピン療法(GC療法)が保険適応となり広く行われている。しかしGC療法に抵抗性を示す転移を有する尿路上皮がんに対する化学療法は確立されていない。シスプラチンをベースにした化学療法に代わる新たな治療法の確立が期待されている。また転移を有さない浸潤性膀胱がんに対して、予後の改善を目的としてシスプラチンをベースにした術前化学療法がおこなわれているが、化学療法中に増悪する症例も存在している。そのような症例に対しては、術前化学療法の副作用のリスクを回避しつつ、より早期の膀胱全摘除の導入を目的とした転移予測指標の確立の必要性があった。

### 2. 研究の目的

申請者は、膀胱がん細胞株 T24、UMUC3 を用いてシスプラチン耐性株、ゲムシタピン耐性株を作成した。薬剤耐性株において多数の DNA メチル化の変化が認められ、エピジェネティックな変化が耐性化に寄与していると考えられた。DNA **メチル基転移酵素阻害剤 (5-Aza-CdR)** を用いた**細胞増殖試験**を行い、シスプラチン耐性株において薬剤感受性の再獲得を確認した。またゲノム網羅的な RNA 発現解析にて耐性と関連すると考えられる 6 遺伝子を見出した。それらの結果を基に本研究は、GC療法抵抗性に対する2次治療としての5-Aza-CdRの臨床応用、GC療法に対する予後予測マーカーの確立、以上の2点を目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1)シスプラチン耐性株、ゲムシタピン耐性株を用いたNOD/SCIDマウスを用いたXenograft mouseを作成し、5-Aza-CdRを用いた有効性の検討を行い、Phase1臨床試験への応用を目指す。
- (2)GC療法に対する予後予測マーカーの確立に対する腫瘍抑制性microRNAの解析
- (3)薬剤耐性膀胱癌細胞株のトランスクリプトーム解析。および薬剤耐性株において候補遺伝子に対するノックダウンを用いた細胞増殖試験。候補遺伝子の臨床検体を用いた免疫染色。

### 4. 研究成果

(1)膀胱癌に対する2次治療として5-aza-CdRの臨床研究への応用に向け、ヌードマウスを用いた *in vivo*での研究を遂行中である。*in vivo*の実験ではCDDP耐性膀胱癌細胞株に5-aza-CdRを投与した後にヌードマウスへ移植、その後CDDPを腹腔内投与し腫瘍のサイズを計測した。5-aza-CdRはmockおよびCDDP単独投与群と比較し、有意な腫瘍の増殖抑制効果をもとめた。低用量の5-aza-CdR(0.1 μM, 48時間)とCDDPとの相乗効果に関しても明らかになった。現在、化学療法耐性膀胱癌細胞に対して5-aza-CdRの効果を確認、副作用を最小限に抑える5-aza-CdRおよびCDDPの濃度を、ヌードマウスを用いて調整中である。

(2)miR-200とCDDPの組み合わせが、CDDP感受性因子(IGFBP3, ICAM1)および抗腫瘍効果に関わる因子(TRAIL, PUMA)を相乗的に誘導するとともに、多数のヒストン遺伝子の発現を抑制することを見いだした。IGFBP3やICAM1はCDDP感受性との相関が報告されているとともに、様々な癌においてDNAメチル化により抑制されることがよく知られている。これらの結果から我々は、miR-200が膀胱癌細胞のエピゲノムとクロストークすることで、化学療法感受性に関わる複数の因子の発現制御に関わると考えた。今後miR-200による抗薬剤耐性克服メカニズムを明らかにし、治療効果予測マーカーおよび新規治療法の開発につながることを期待される。

(3)薬剤耐性膀胱癌細胞株のトランスクリプトーム解析を行い、CDDPおよびGEM耐性化への関与が推測される6遺伝子を抽出した。その中でも我々はCDDP耐性株において発現亢進するADAMTS1(ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 1)に着目した。膀胱癌臨床例におけるADAMTS1を免疫組織化学染色により検討した結果、ADAMTS1陽性例ではGC療法に対する無増悪生存期間(p=0.032)および疾患特異的生存率(P=0.006)が、陰性例と比べて有意に低下していた。またCDDP耐性株を用いてADAMTS1をノックダウンした結果、細胞

増殖が顕著に抑制されることを見いだした(下図D)。これらの結果は、ADAMTS1がGC療法効果予測マーカーとなりうること、そして有望な治療標的分子となりうることを示している。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1件)

Shindo Tetsuya、Ninuma Takeshi、Nishiyama Naotaka、Shinkai Nobuo、Kitajima Hiroshi、Kai Masahiro、Maruyama Reo、Tokino Takashi、Masumori Naoya、Suzuki Hiromu  
Epigenetic silencing of miR-200b is associated with cisplatin resistance in bladder cancer. *Oncotarget*. 2018 (36):24457-24469.

### 〔学会発表〕(計 4件)

Nishiyama N、Yi S、Daneshmand S、Jones PA、Djaladat H、Masumori N、Liang G  
DNA methylation inhibitors could re-sensitize drug-resistance bladder cancer cells *in vitro* and *in vivo*.  
AUA 2018 Annual Meeting, San Fransisco, USA, 2018

西山直隆、新海信雄、進藤哲哉、鈴木拓、舛森直哉  
抗癌剤耐性膀胱癌細胞株におけるDNAメチル化の変化およびDNA脱メチル化の抗癌剤感受性への効果  
第11回日本エピジェネティクス研究会年会 東京 2017

Shinkai Nobuo、Nishiyama Naotaka、Shindo Tetsuya、Suzuki Hiromu、Masumori Naoya  
DNA methylation inhibitors could re-sensitize drug-resistance bladder cancer cells  
AUA 2017 Annual Meeting, Boston, USA, 2017

新海信雄、西山直隆、進藤哲哉、鈴木拓、舛森直哉  
抗癌剤耐性膀胱癌細胞株におけるADAMTS1遺伝子の機能的意義  
第26回泌尿器分子細胞研究会 大分県大分市 2017

### 〔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：  
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：  
国内外の別：

### 〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：西山 直隆

ローマ字氏名 Nishiyama Naotaka

所属研究機関名：富山大学

部局名：大学院医学薬学研究部（医学部）

職名：講師

研究者番号（8桁）：70619030

研究分担者氏名：進藤 哲哉

ローマ字氏名 Shindo Tetsuya

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：80749292

研究分担者氏名：新海 信雄

ローマ字氏名 Shinkai Nobuo

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：研究員

研究者番号（8桁）：40772398

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。