

令和 2 年 4 月 18 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11157

研究課題名(和文) 尿路上皮癌における癌幹細胞性に着目した新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of the novel treatment strategy against urothelial carcinoma controlling for cancer stem-like property

研究代表者

菊地 栄次(Kikuchi, Eiji)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：10286552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：以下の5つの結果を得た。(1) 筋層浸潤性膀胱癌におけるCD44v9の高発現は予後不良因子である。(2) CD44v8-10は膀胱癌の抗癌剤耐性獲得に強く関連する。(3) 現喫煙症例において膀胱癌腫瘍中心部のPD-1の高発現は予後不良因子である。(4) CD44v陽性のT24細胞株においてメトホルミンは殺細胞効果を示した。(5) マウス膀胱癌肺転移モデルにおいてサラゾスルファピリジン+シスプラチンは強い抗腫瘍効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路上皮癌におけるCD44v9、喫煙膀胱癌におけるPD-1は今後予後マーカーとしての確立が望まれる。このことにより予後不良症例の抽出、リスク分類が可能となり個別化治療への応用の意義が示唆される。CD44vは膀胱癌の抗癌剤耐性獲得に寄与し、CD44vをターゲットしたメトホルミンやサラゾスルファピリジンは次世代の新規治療戦略として期待されると考える。

研究成果の概要(英文)：The following five results were obtained. (1) High expression of CD44v9 in tumor specimen is a prognostic factor in patients with muscle invasive bladder cancer. (2) CD44v8-10 is highly associated with acquisition of resistance for anti-cancer agents in bladder cancer. (3) In current smoker bladder cancer patients high PD-1 expression in tumor nest is a prognostic factor. (4) Metformin had cytotoxic effects against T24 cell line with high CD44v expression. (5) In mouse bladder cancer lung metastatic model, sulfasalazine plus cisplatin had strong anti-tumor effects.

研究分野：尿路上皮癌

キーワード：尿路上皮癌 癌幹細胞 抗癌剤耐性 シスプラチン

1. 研究開始当初の背景

筋層非浸潤性膀胱癌 (NMIBC)、特に T1G3 腫瘍は BCG 膀胱内注入療法にも関わらず 3 年以内に約 40% のケースが再発し、うち約 10% が病期進展する。再発・病期進展抑制効果が高く、より副作用発現の少ない新規膀胱内注入療法の確立は必至である。転移性腎盂・尿管・膀胱癌の標準治療は多剤併用化学療法であるが、長期生命例は少ない。現行の化学療法では転移性尿路上皮癌の有効性、副作用軽減には限界があり、新規抗癌治療戦略の開発は我々に課せられた急務の課題である。

抗癌剤治療に対する宿主の防御機構、抗癌剤耐性機序の解明は、新規治療戦略の確立に際し重要である。自己複製能を持ち、異なる分化段階の細胞を産生する能力を有する癌幹細胞は、既存の化学療法や放射線治療に対し、抵抗性を持つことが示唆されている。また抗癌剤耐性を獲得した癌細胞は宿主の免疫攻撃から逃れ、癌進展を加速させる。尿路上皮癌における癌幹細胞の抗癌剤治療抵抗性に与える影響、免疫寛容との直接的関連は詳細に検討されていないのが現状である。そこで尿路上皮癌幹細胞を制御することは癌進展のメカニズムの解明と新しい治療の開発に寄与すると考え、本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究において癌幹細胞の発現と浸潤性尿路上皮癌の予後との関連、尿路上皮癌幹細胞が抗癌剤耐性機序に及ぼす影響、尿路上皮癌の最も重要なリスク因子である喫煙が抗癌剤耐性獲得や癌幹細胞へ直接与える影響を検討したい。近年免疫寛容を制御する programmed cell death 1 (PD-1) とそのリガンドである PD-L1 は尿路上皮癌分野で治療への応用が強く期待されている (Lancet, 387, 1909-20, 2016)。そこで PD-1/PD-L1 と癌幹細胞との直接的関連を検証する。さらには癌幹細胞を直接ターゲットとし、各種抗癌剤、抗 PD-1/PD-L1 抗体などを組み合わせた抗癌剤抵抗性尿路上皮癌に対する新規治療戦略の確立を研究の目的とし、具体的には 5 つの project を立案した。現在、分子機構の解明は急速に進められており Cancer Genomic Atlas Research Network Project により、尿路上皮癌特有に PI3K/AKT/mTOR、RTK/RAS 経路などの遺伝性変異が確認され (Nature, 507, 315-22, 2014)、数々の報告がこれらを標的とした治療戦略の有望性を予測している (Cancer Cell, 25, 152-65, 2014; PNAS, 111, E672-81, 2014)。本研究ではこれらのシグナル経路に関連する有力分子が癌幹細胞に及ぼす影響にも注目する。

(1) 臨床組織検体を用いた尿路上皮癌幹細胞存在の臨床的意義、PD-1/PD-L1 との直接的関連の検証

尿路上皮癌において癌幹細胞の存在が予後不良因子、抗癌剤抵抗性・免疫寛容誘導要因であるかを検証することは非常に重要と考える。癌幹細胞の有力なマーカーで CD44 variant form の一つである CD44v9 の発現の有無を臨床組織切片の免疫組織染色法にて検証する。T1G3 NMIBC、筋層浸潤性膀胱癌 (MIBC) においても癌幹細胞の予後的解析を進めることで、CD44v9 を用いた予後不良症例の抽出が可能となり、個別化治療の確立の一助になりうると予測される。CD44v9 と PD-1/PD-L1 発現の関連性、抗癌剤治療前後や BCG 治療前後のこれらの蛋白発現の変化を検証する。CD44v9 と PD-1/PD-L1 の関連性が立証されれば、CD44v9 が抗 PD-1/PD-L1 抗体治療の効果予測因子の一つとして期待されるものと考えられる。

(2) 抗癌剤耐性膀胱癌株を用いた癌幹細胞の抗癌剤耐性への関与の検証

現在までに尿路上皮癌幹細胞が抗癌剤耐性にいかに関与するか、その詳細な分子機構を検討した研究は存在しない。すでに尿路上皮癌における抗癌剤耐性機序解明に向け、独自に CDDP 耐性株を樹立しており、これら細胞株を使用し様々な角度から尿路上皮癌幹細胞の抗癌剤耐性への関与を明らかにしたい。

(3) 喫煙が癌幹細胞発現や抗癌剤耐性へ及ぼす影響の機序解明

アレイ解析を行い、喫煙歴を有する尿路上皮癌症例による分子変化を検証し、標的分子を抽出する。CD44v9 発現細胞、siRNA で CD44v9 をノックダウンした細胞における標的分子の変化を探る。

(4) 癌幹細胞と PD-1/PD-L1 の直接的関連の検証

癌幹細胞がいかにして宿主の免疫寛容をきたすのか、そのメカニズムの詳細は分かっていない。CD44v9 発現細胞と非発現細胞における、EMT 関連因子の発現、PD-1/PD-L1 の発現、CD8+腫瘍浸潤リンパ球における INF 産生能の変化を検証する。本検討により癌幹細胞と宿主の免疫寛容誘導の基礎的関連性を確認する。

(5) MBT-2 同所性膀胱腫瘍モデル、膀胱癌肺転移モデルを用いた癌幹細胞を直接ターゲットとした新規治療の効果検証

経口糖尿病治療薬 metformin (Cancer Res, 69, 7507-11, 2009) や経口炎症性腸疾患治療薬 sulfasalazine (Med Oncol, 2016, doi: 10.1007/s12032-016-0760-x.) は癌幹細胞を直接ターゲットとして抗腫瘍効果を発揮すると報告されている。これらの薬剤はすでに臨床の場で広く用いられており、安全性は確立されている。よって本剤を用いた治療は今後比較的円滑に、臨床応用が実現可能と考える。

同所性に膀胱腫瘍を確立し、膀胱内注入の研究を行うには MBT-2 同所性膀胱腫瘍モデルが現在の膀胱癌臨床に即したモデルとして最適である。我々は今まで長年にわたりこのマウス膀胱癌正所性モデルの確立を維持している (J Urol, 170, 1375-8, 2003; Hum Gene Ther, 22, 1423-32, 2011; BMC Cancer, 2015, doi: 10.1186/s12885-015-1338-2.; Int J Oncol, 47, 377-83, 2015)。また同様に高率に肺転移を起こす MBT-2 variant 膀胱癌転移モデルも確立している (Urology, 66, 676-81, 2005)。

3. 研究の方法

(1) 臨床組織検体を用いた尿路上皮癌幹細胞存在の臨床的意義、PD-1/PD-L1 との直接的関連の検証

UTUC (N=400)、T1G3 NMIBC (N=200)、MIBC (N=300) における詳細な臨床データベース、未染の病理プレパラートを用いて癌幹細胞の有力なマーカーである CD44v9 の発現の程度と尿路上皮癌の予後、PD-1/PD-L1 発現との関連を検証する。具体的には以下の 4 つの免疫染色解析を行う。CD44v9 の発現強度が T1G3 NMIBC における再発・病期進展、MIBC における転移再発・癌特異的生存の予後予測に關与するかを検討する、腎盂・尿管・膀胱癌における CD44v9 の発現強度と腫瘍内部・腫瘍辺縁における PD-1/PD-L1 の発現との関連性を検証する、BCG、MMC 抗癌剤膀胱内注入後の再発 NMIBC 症例に関しては膀胱内注入前の TURBT 標本と再発後の TURBT 標本における CD44v9 の発現強度、PD-1/PD-L1 の発現変化を比較検討する、術前化学療法を施行した MIBC 全摘症例では TURBT と全摘標本との対比を行い CD44v9 の発現強度、PD-1/PD-L1 の発現変化を確認する。

(2) 抗癌剤耐性膀胱癌株を用いた癌幹細胞の抗癌剤耐性への関与の検証

CDDP 耐性膀胱癌株と非耐性株を比較し、CDDP 耐性株において PI3K/AKT/mTOR 経路、Snail, Twist, Vimentin, E-, N-, P-cadherin などの EMT マーカー、転移浸潤能、活性酸素発生能などの変化を確認する。さらに CDDP 耐性株において CD44v9 発現を siRNA でノックダウンし、抗癌剤感受性の変化を検証する。尿路上皮癌で遺伝子変異が強く確認されている cyclin E1、MYC、MDM2、HER2、CDKN2A、PPAR 発現の変化も探る。

(3) 喫煙が癌幹細胞発現や抗癌剤耐性へ及ぼす影響の機序解明

具体的には以下の 3 つの機能解析を行う。全身化学療法を施行した UTUC、MIBC において、喫煙歴の有無における分子変化の違いをマイクロアレイ(DNA, miRNA)解析により確認する、CD44v9 発現細胞と非発現細胞にニコチンを暴露し、アレイ解析により得られた標的分子の変化を検討する、CD44v9 を siRNA でノックダウンし、ニコチン曝露による標的分子の変化を確認する。

(4) 癌幹細胞と PD-1/PD-L1 の直接的関連の検証

膀胱全摘、あるいは腎尿管全摘標本より新鮮腫瘍切片を採取し、single cell suspension を作成する。フローサイトメトリーを用いて CD44v9 発現細胞と非発現細胞を分離する。同時に CD8+腫瘍浸潤リンパ球も抽出する。その後、以下の 4 つの機能解析を行う。CD44v9 発現細胞と非発現細胞における EMT 関連因子 (TWIST1, BMI1, ZEB1, ZEB2, SNAI1, SNAI2) を定量 RT-PCR を用いて比較検討し、CD44v9 発現細胞における EMT 関連因子の増加の有無を検討する、CD8+腫瘍浸潤リンパ球と CD44v9 発

現細胞あるいは非発現細胞を共培養し、INF 産生能の違いを検証する、CD44v9 発現細胞と非発現細胞における PD-L1 発現の違いをフローサイトメトリーで確認し、INF 曝露下での PD-L1 発現の違いを確認する、抗 PD-1/PD-L1 抗体を用いて CD44v9 発現細胞と非発現細胞における INF 産生能の違いを検証する。

(5) MBT-2 同所性膀胱腫瘍モデル、膀胱癌肺転移モデルを用いた癌幹細胞を直接ターゲットとした新規治療の効果検証

具体的には以下の 4 つの動物実験を行う。同所性膀胱腫瘍モデルを用いて、無治療、metformin 投与、抗癌剤 (あるいは抗 PD-1/PD-L1 抗体)投与、薬剤併用投与に群分けし、膀胱内腫瘍生着率、腫瘍サイズを確認する。組織内の CD44v9、PD-1、PD-L1 の発現変化を確認すると同時に、標本の細胞周期、血管新生、アポトーシス関連蛋白を免疫染色法にて確認する、同所性膀胱腫瘍モデル実験を metformin の代わりに sulfasalazine を用いて行う、C3H/HeN マウス膀胱癌肺転移モデルを用いて、無治療、metformin 投与、抗癌剤 (あるいは抗 PD-1/PD-L1 抗体)投与、薬剤併用投与に群分けし、肺転移数、リンパ節転移数を計測し、マウスの体重変化を観察する、マウス膀胱癌肺転移モデル実験を metformin の代わりに sulfasalazine を用いて行う。

4. 研究成果

(1) 筋層浸潤性膀胱癌における CD44v9 の高発現は予後不良因子である

筋層浸潤性膀胱癌 63 検体を用いて CD44v9 の発現を確認した。免疫組織学的検討において CD44v9 高発現群 (n=19, 30%)と低発現群 (n=44, 70%)の 2 群に分けると、CD44v9 高発現群の 5 年癌特異的生存率は 45.5%で CD44v9 低発現群 (90.4%)と比較して有意に低い値であった (p<0.001)。Cox 比例ハザードを用いた多変量解析において CD44v9 は独立して癌死に関連していた。よって癌幹細胞のマーカーと考えられる CD44v9 の高発現は筋層浸潤性膀胱癌の予後予測因子と考えられた。

(2) CD44v8-10 は膀胱癌の抗癌剤耐性機序獲得に強く関連する

抗癌剤耐性膀胱癌株 T24PR (platinum-resistant subline of T24)と親株である T24 を比較し癌幹細胞の抗癌剤耐性への関与の検証を行った。CD44v8-10、シスチントランスポーターの一サブユニットである xCT 蛋白発現は T24 株と比較し T24PR 株において有意に高かった。シスプラチン投与における IC50 は T24PR 株において 19.3uM で T24 株の 4.1uM と比較し約 5 倍高かった。T24 株と比較して T24PR 株において細胞内のグルタチオン濃度は有意に高く、シスプラチン投与において ROS の産生は有意に低かった。CD44v8-10 をターゲットとした siRNA を用いて CD44v8-10 をノックダウンしたところ、T24PR 株においてシスプラチンに対する治療感受性の回復が確認された。以上からシスプラチン耐性膀胱癌細胞株においては CD44v8-10 発現が亢進しており、シスプラチンに対する ROS の産生の低下が認められた。CD44v8-10 が抗癌剤耐性機序獲得に強く関連することが立証された。

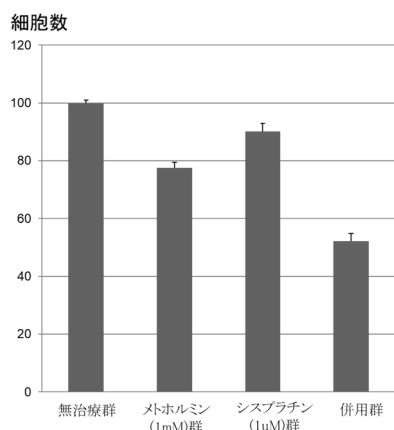
(3) 現喫煙症例において膀胱癌の腫瘍中心部の PD-1 の高発現は予後不良因子である

手術治療された腎盂・尿管癌 153 例を対象に PD-1 と喫煙歴の関連を検討した。腫瘍中心部における PD-1 の発現を免疫組織学的に評価し、400 倍率の顕鏡下で PD-1 染色陽性細胞数が 10 以下の場合、PD-1 低発現群、10 を超えた場合に PD-1 高発現群と定義した。現喫煙群は 52 例 (34%)、禁煙群は 36 例 (23.5%)、非喫煙群は 65 例 (42.5%)であった。現喫煙症例において PD-1 高発現群の 5 年癌特異的生存率は 50.0%で PD-1 低発現群の 91.4%と比較して有意に低かった (p=0.001)。また現喫煙症例において PD-1 高発現 (HR: 7.9, p=0.017)は独立して癌死と関連していた。以上より PD-1 発現は現喫煙症例において予後不因子であることが確認された。なお腎盂・尿管癌症例における CD44v 発現と PD-1 発現を同時に検討したが関連を認めなかった。

(4) CD44v 陽性の T24 細胞株においてメトホルミンは殺細胞効果を示した

癌幹細胞に、より強い抗腫瘍効果を示すと報告されている糖尿病治療薬であるメトホルミンに注目した。ヒト膀胱癌細胞株 T24、HT1376 の CD44v 発現はそれぞれ陽性、陰性であった。T24 細胞のみにメトホルミン投与により細胞増殖抑制を認めた。T24 細胞においてシスプラチン投与に伴い CD44v 陽性細胞の割合は増加し、メトホルミン投与でその割合は低下した。またメトホルミン単剤投与、シスプラチン単剤

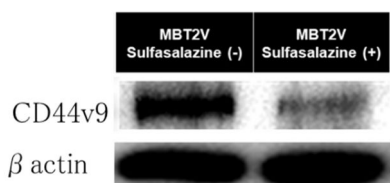
投与と比較しメトホルミン・シスプラチン併用投与で T24 細胞において殺細胞効果の増強が確認された (図 1)。シスプラチン耐性膀胱癌株 T24PR において CD44v 発現の亢進を認めた。T24 皮下腫瘍モデルを用いて in vivo の検証を行ったがメトホルミン・シスプラチン併用投与で有意な抗腫瘍効果の増強が確認された。以上のことから CD44v 陽性細胞を標的としたメトホルミン治療はシスプラチン治療抵抗性尿路上皮癌に対する新規治療となりうる可能性が示唆された。



(図 1) T24 細胞におけるメトホルミン+シスプラチン併用の殺細胞効果

(5) マウス膀胱癌肺転移モデルにおいてサラゾスルファピリジン+シスプラチンは強い抗腫瘍効果を示した。

CD44v を制御すると報告されている、潰瘍性大腸炎の治療薬であるサラゾスルファピリジン (sulfasalazine: SSN)を用いて MBT-2V 膀胱癌細胞株 (高率に肺転移を生じる株)に対するシスプラチン (CDDP)の殺細胞効果増強の可能性を in vitro で検証した。SSZ は濃度依存性に殺細胞効果を認め、ROS の産生増加が確認された。CDDP 単独治療に比べて SSZ を加えることで MBT-2V 細胞の殺細胞効果の増強が確認された。SSZ 治療により CD44v9 の発現は有意に低下した (図 2)。また phospho-p38MARK の発現は有意に上昇した。MBT-2V をマウスに尾静注し作成された肺転移モデルを使用し、SSZ の治療効果を検討した。SSZ は 500mg/kg を 2 日投 1 日休で腹腔内投与、CDDP は 2mg/kg を 1 日投 4 日休で腹腔内投与した。腫瘍移植後 15 日目の平均肺転移数は無治療群で 114.3 個、SSZ 単独治療群で 50.6 個、CDDP 単独治療群で 69.2 個であったが、SSZ+CDDP 群で 15.5 個であり、有意に少なかった。以上から SSZ は ROS の産生を介して CDDP の殺細胞効果を増強させることは確認された。また SSZ+CDDP 治療は肺転移を有する膀胱癌の新規治療戦略になりうる可能性が示唆された。



(図 2) MBT2V 細胞におけるサラゾスルファピリジンが CD44v9 発現に与える影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hagiwara M, Kikuchi E, Tanaka N, Kosaka T, Mikami S, Saya H, Oya M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Variant isoforms of CD44 involves acquisition of chemoresistance to cisplatin and has potential as a novel indicator for identifying a cisplatin-resistant population in urothelial cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-018-3988-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ogihara K, Kikuchi E, Okazaki S, Hagiwara M, Takeda T, Matsumoto K, Kosaka T, Mikami S, Saya H, Oya M.	4. 巻 110
2. 論文標題 Sulfasalazine could modulate the CD44v9-xCT system and enhance cisplatin-induced cytotoxic effects in metastatic bladder cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1431-1441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13960.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 早川望、菊地栄次、三上修治、大家基嗣
2. 発表標題 上部尿路上皮癌におけるPD-1発現と喫煙の既往歴の関連
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 萩原正幸、菊地栄次、小坂威雄、宮嶋哲、中川健、佐谷秀行
2. 発表標題 尿路上皮癌細胞における糖尿病治療薬メトホルミンを用いた CD44v 制御
3. 学会等名 第105回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荻原広一郎、菊地栄次、武田利和、小坂威雄、佐谷秀行、大家基嗣
2. 発表標題 The therapeutic effect of sulfasalazine for metastatic urothelial carcinoma targeting to cancer stem cell
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荻原広一郎、菊地栄次、田中伸之、小坂威雄、佐谷秀行、大家基嗣
2. 発表標題 癌幹細胞を標的としたスルファサラジン膀胱内注入治療の効果
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小坂 威雄 (Kosaka Takeo) (30445407)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	