

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16815

研究課題名(和文) 進行性尿路上皮癌に対する癌幹細胞を標的としたMUC1阻害剤の抗腫瘍効果の検討

研究課題名(英文) MUC1C Oncoprotein Contributes to Acquiring Cisplatin Resistance in Urothelial Carcinoma Cells

研究代表者

茂田 啓介 (Shigeta, Keisuke)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：10649875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、難治性尿路上皮癌の抗癌剤耐性機序を解明すべく、癌細胞膜上に位置する癌蛋白、膜結合型ムチン1型C末端ペプチド(MUC1C)に着目した。MUC1Cは細胞膜上に位置し、細胞内に単離することで癌シグナル経路であるPI3K/AKTの活性化や癌幹細胞化に関与するとされ、抗癌剤耐性のmaster regulatorとして報告されている。

本研究は、尿路上皮癌内におけるMUC1Cの発現と臨床病理学的意義、機能解析、そして制御機構に着目し、GC治療の薬剤耐性機序解明を目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CDDP耐性癌細胞ではMUC1C蛋白の発現亢進を認めていた。抗癌剤耐性機構のメカニズムとして、PI3K/AKT経路活性化による薬剤排出蛋白MDR1の亢進、および細胞膜マーカ CD44v9発現亢進から示唆される癌細胞の幹細胞化によって酸化ストレス防御機構の増強された結果、CDDP投与後のROS産生低下が原因と思われた。siRNAの導入により、MUC1Cをknock downさせることで癌シグナル伝達を抑制し、抗癌剤感受性の回復が示唆された。MUC1C阻害薬GO-203はCDDPとの併用により、抗癌剤感受性の回復に寄与する事から、GC治療抵抗性患者に対する新規治療薬になりうると思われた。

研究成果の概要(英文)：Mucin1 cytoplasm (MUC1-C) heterodimeric oncoprotein plays a crucial role in tumor progression, but only a few insights are available in urothelial carcinoma(UC). The aim of the present study was to investigate the molecular mechanism of MUC1C and acquisition of cisplatin (CDDP) resistance in UC.

研究分野：尿路上皮癌

キーワード：MUC1C蛋白 薬剤排出性トランスポーター CDDP耐性 MUC1阻害剤

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

1. 研究開始当初の背景

進行性膀胱癌の治療の standard は Cisplatin (CDDP) と Gemcitabine (GEM) を用いた化学療法であるが、一時的に奏功を得てもその後病勢は進行し、死に至る。これは、薬剤感受性を認めるものの後に一部の癌細胞が化学療法に抵抗性を獲得するためである。我々は、癌細胞表面に位置し、細胞内に多能的機能を付与する癌蛋白である膜結合型ムチン 1 型 C 末端ペプチド (MUC1C) に着目した (Kufe et al. Oncogene 2017)。MUC1C は乳癌細胞を中心に癌シグナル伝達における AKT のリン酸化、代謝制御に関与するとされ、抗癌剤耐性の master regulator と報告されている (Shulka et al. Cancer cell 2017)。2014 年 TCGA の報告により乳癌と尿路上皮癌の遺伝類似性が注目されている (TCGA genome atlas Nature 2014) ことから、難治性膀胱癌における MUC1C の多面的機能解析に着手した。

2. 研究の目的

本研究は、尿路上皮癌内における MUC1C の発現と臨床病理学的意義、機能解析、そして制御機構に着目し、抗癌剤耐性機序解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 膀胱癌細胞株 T24, UMUC3 を基盤とした、CDDP 耐性膀胱癌細胞株 T24CR, UMUC3CR の樹立
T24 野生株 (Wild Type: WT)、UMUC3 野生株 (UMUC3WT) に 12 か月間 CDDP を暴露し、培養を継続することで薬剤耐性を獲得した CDDP 耐性の膀胱癌細胞株を樹立した。(それぞれ T24CR、UMUC3CR と命名)。抗癌剤耐性の確認には、WST assay 法で殺細胞効果の減弱を確認。

(2) 抗癌剤耐性株における MUC1C 発現上昇の確認および PI3K/AKT 亢進による薬剤排出性トランスポーター (MDR1) 発現亢進の確認
T24WT、T24CR、UMUC3WT、UMUC3CR を対象として、MUC1C および薬剤性排出トランスポーター (Multiple drug resistance 1: MDR1) 蛋白を RT-PCR 法、Western Blotting 法、蛍光細胞染色法を用いて確認。

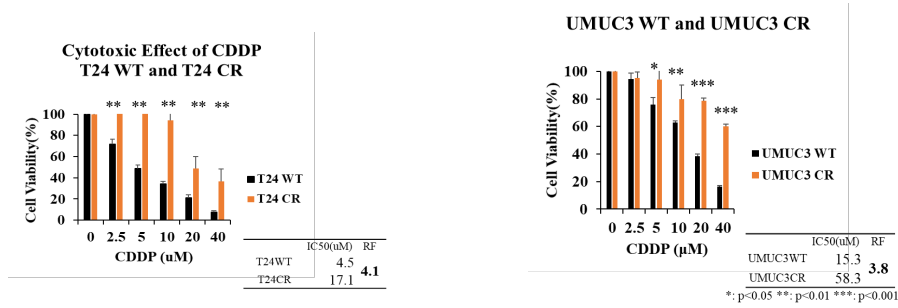
(3) 抗癌剤耐性株における Reactive Oxygen Species (ROS) の低下による酸化ストレスからの防御機構の増強と CD44v9 発現亢進の関連性の確認。
T24WT、T24CR、UMUC3WT、UMUC3CR を対象として CDDP 投与時の Reactive Oxygen Species (ROS) の値を H₂-DCFDA を使用し FACS で定量評価した。かつ CD44v9 発現亢進を確認。

(4) siRNA による MUC1C 蛋白の down regulation 後の発現の低下と P13K/AKT 経路の抑制に伴う MDR1 発現の低下、CD44v9 発現抑制と ROS の上昇、並びに抗癌剤感受性回復の確認。
small interfering RNA transfection 法を用いて MUC1C の発現を抑制し、機能解析を行った。

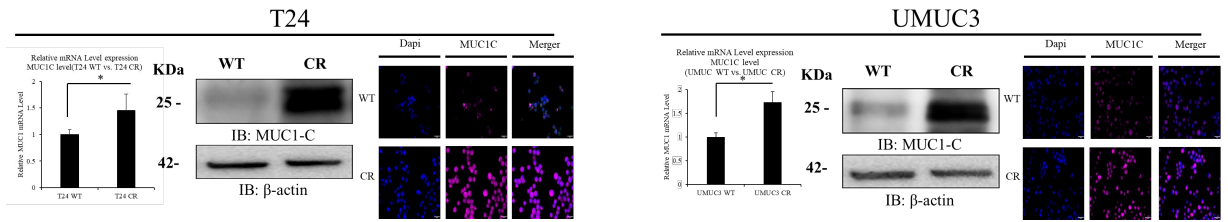
(5) MUC1C 阻害薬 GO-203 使用による、MUC1C 阻害剤と抗癌剤併用効果の検証
MUC1C 阻害薬 GO-203 (Harvard University Dr. Kufe より寄贈) を使用し、MUC1C 阻害剤と抗癌剤併用による殺細胞効果を検証した。

4. 研究成果

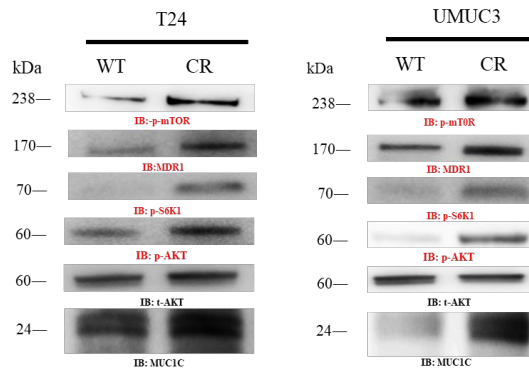
(1) WST assay 法を用いた所、野生株と比較し CDDP 耐性株において抗癌剤による殺細胞効果が減弱していることを確認した。



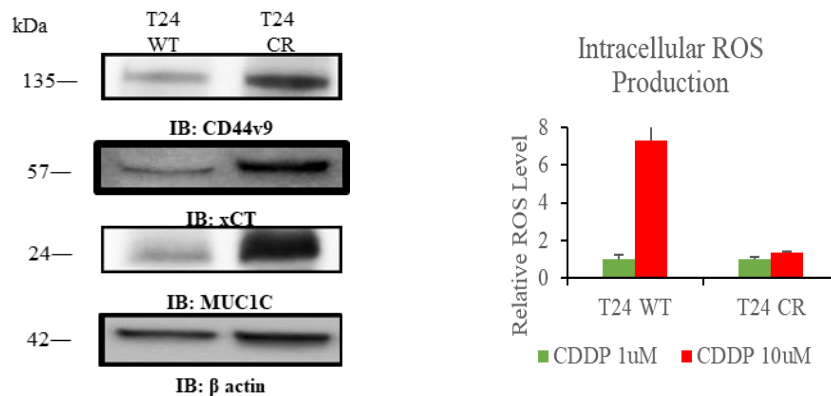
(2) RT-PCR 法、WB 法、蛍光細胞染色法において T24CR、UMUC3CR の MUC1C 発現の亢進を確認した。

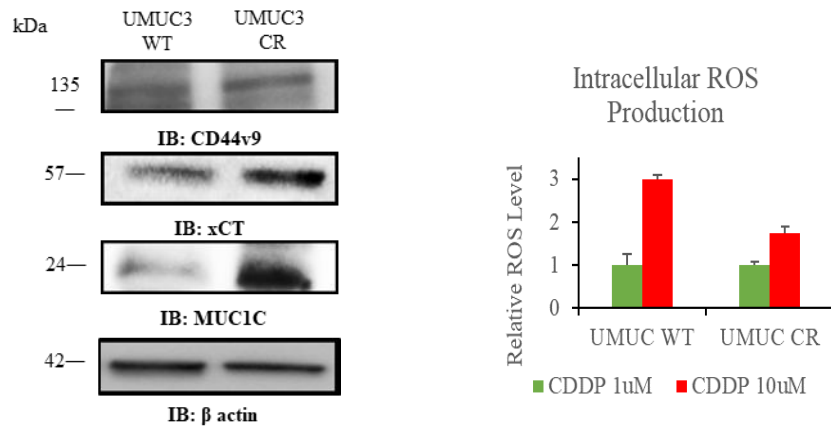


(3) T24CR、UMUC3CR における PI3K/AKT の亢進と MDR1 発現の亢進を WB 法で確認した。

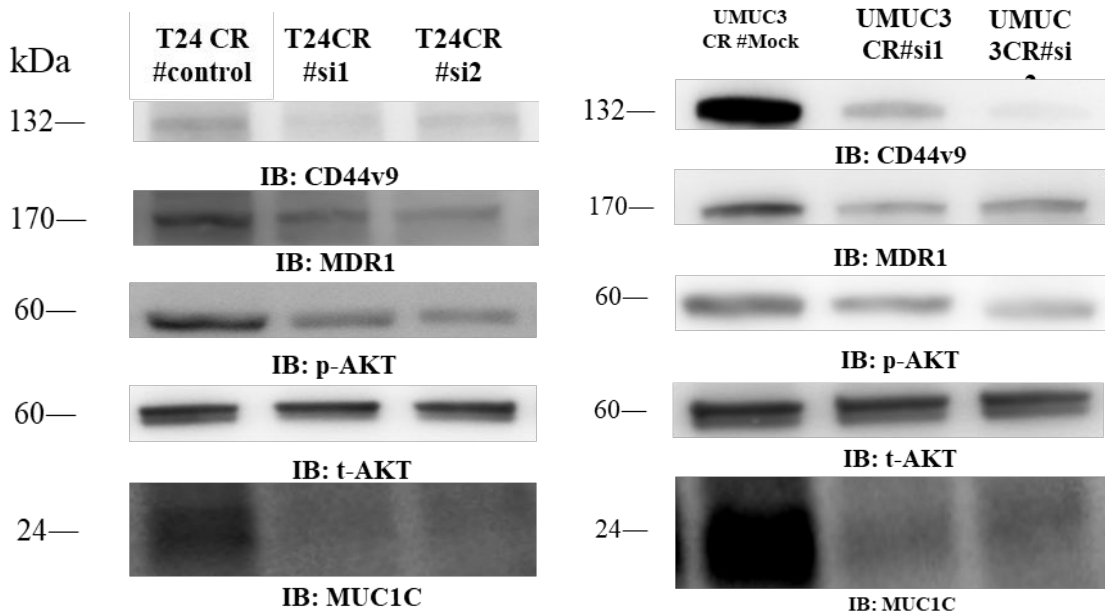


(4) T24CR UMUC3CR 共に CD44v9 の発現上昇と CDDP 投与時の ROS 産生量が低下しており、酸化ストレスの増強が示唆された。

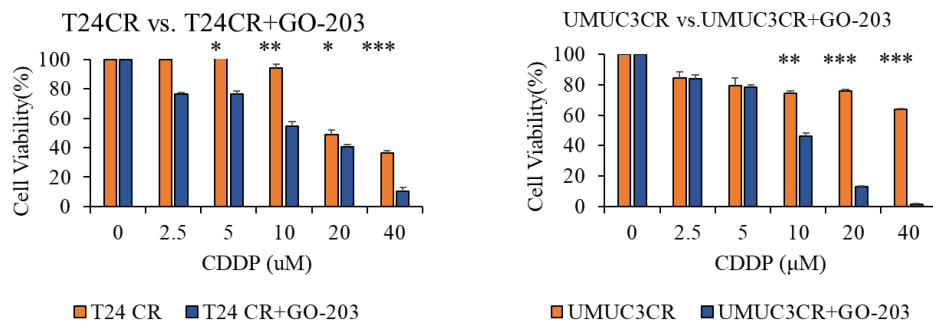




(5) siRNAによりMUC1Cをknock downし、TCR、UMUC3CRともに、CD44v9の発現低下、およびPI3K/AKT経路抑制によるMDR1蛋白の発現低下を確認した。



(6) MUC1C阻害剤(GO-203)によるT24CRとUMUC3CRの抗癌剤感受性の一部回復を認めた。



本研究において、CDDP耐性癌細胞ではMUC1C蛋白の発現亢進を認めていた。抗癌剤耐性機構のメカニズムとして、PI3K/AKT経路活性化による薬剤排出蛋白MDR1の亢進、および細胞膜マーカーCD44v9発現亢進から示唆される癌細胞の幹細胞化によって酸化ストレス防御機構の増強された結果、CDDP投与後のROS産生低下が原因と思われた。siRNAの導入により、MUC1Cをknock downさせることで癌シグナル伝達を抑制し、抗癌剤感受性の回復が示唆された。実際、MUC1C阻害薬であるGO-203はCDDPとの併用により、抗癌剤感受性の回復に寄与する事から、GC治療抵抗性患者に対する新規治療薬になりうると思われた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. The Over Time Conditional Survival of Intravesical Recurrence in Upper Tract Urothelial Carcinoma.(査読有)

Shigeta K, Kikuchi E, Hagiwara M, Ando T, Mizuno R, Abe T, Mikami S, Miyajima A, Nakagawa K, Oya M.J Urol. 2017. doi: 10.1016/j.juro.2017.06.

2. Prolonged pneumoperitoneum time is an independent risk factor for intravesical recurrence after laparoscopic radical nephroureterectomy in upper tract urothelial carcinoma. (査読有)

Shigeta K, Kikuchi E, Hagiwara M, Ando T, Mizuno R, Miyajima A, Nakagawa K, Oya M. Surg Oncol. 2017;26(1):73-79. doi: 10.1016/j.suronc.2017.01.003. Epub 2017.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Could Laparoscopic Surgery Have Same Long-term Oncological Outcomes as Open Radical Nephroureterectomy in T3N0M0 Upper Tract Urothelial Carcinoma? A Multicenter Cohort Study Adjusted by Propensity Score Matching

Keisuke Shigeta, Eiji Kikuchi, Masayuki Hagiwara, Takayuki Abe, Toshikazu Takeda, Kazuhiro Matsumoto, Toshiaki Shinojima, Ken Nakagawa, Mototsugu Oya
114th American Urological Association Annual Conference, 2019

2. Simulating the Surveillance Duration of Intravesical Recurrence After Radical Nephroureterectomy: An Individualized Risk Based Approach Applying the Weibull Model

Keisuke Shigeta, Eiji Kikuchi, Masayuki Hagiwara, Takayuki Abe, Toshikazu Takeda, Kazuhiro Matsumoto, Toshiaki Shinojima, Ken Nakagawa, Mototsugu Oya
114th American Urological Association Annual Conference, 2019

3. The Survival Prediction with time of Intravesical Recurrence in Upper Tract Urothelial Carcinoma4.

Keisuke Shigeta, Eiji Kikuchi, Masayuki Hagiwara, Takayuki Abe, Toshikazu Takeda, Kazuhiro Matsumoto, Toshiaki Shinojima, Ken Nakagawa, Mototsugu Oya
114th American Urological Association Annual Conference, 2019

4. A Novel Risk Based Approach Simulating Oncologic Surveillance According to Smoking Status after Radical Nephroureterectomy with Upper Tract Urothelial Carcinoma

Keisuke Shigeta, Eiji Kikuchi, Masayuki Hagiwara, Takayuki Abe, Toshikazu Takeda, Kazuhiro Matsumoto, Toshiaki Shinojima, Ken Nakagawa, Mototsugu Oya
114th American Urological Association Annual Conference, 2019

5. Oncologic Surveillance After Radical Nephroureterectomy in Upper Tract Urothelial Carcinoma Patients: A Novel Risk-Based Approach

Keisuke Shigeta, Eiji Kikuchi, Masayuki Hagiwara, Takayuki Abe, Toshikazu Takeda, Kazuhiro Matsumoto, Toshiaki Shinojima, Ken Nakagawa, Mototsugu Oya
113th American Urological Association Annual Conference, 2018.

6. Efficacy of Chemotherapy Administration in Elderly Patients with Metastatic Upper Tract Urothelial Carcinoma after Radical Nephroureterectomy.

Keisuke Shigeta, Eiji Kikuchi, Keishiro Fukumoto, Nobuyuki Tanaka, Akira Miyajima, Mototsugu Oya.112th American Urological Association Annual Conference, 2017.