

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09706

研究課題名（和文）化学療法抵抗性を有する転移性膀胱癌に対するエピジェネティクス治療確立

研究課題名（英文）Established epigenetic treatment for chemotherapy-resistant metastatic bladder cancer

研究代表者

西山 直隆（Nishiyama, Naotaka）

富山大学・学術研究部医学系・講師

研究者番号：70619030

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：クロマチンアクセシビリティはAcceSssibleアッセイにより解析を行い、CDDP / GEM抵抗性細胞株では親株と比較して、ヒストン修飾を受けている領域がことなることが明らかとなった。薬剤の抵抗性にはヒストン修飾によるクロマチン構造の変化が寄与していることが明らかとなった。網羅的DNAメチル化解析では、耐性化はある特定の部位の遺伝子変化ではなく、ゲノム網羅的なDNAメチル化の変化およびヒストン修飾による構造変化の両方が寄与していることが判明した。in vivoでの研究では、低用量の5-aza-CdRでは、CDDPを投与することで相乗効果を認め、耐性株においても増殖抑制効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学療法抵抗性と5-Aza-CdRによる化学療法再感受性のメカニズム解明を明らかにしたことで、今後5-aza-CdRのGC療法の2次治療としての臨床試験の応用の可能性がついた。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。

研究成果の概要（英文）：Chromatin accessibility was analyzed by the AcceSssible assay, revealing that the CDDP / GEM-resistant cell lines differ in histone-modified regions compared to the parental strain. It was clarified that the change in chromatin structure due to histone modification contributed to the drug resistance. Comprehensive DNA methylation analysis revealed that resistance was not contributed by genetic changes at a particular site, but by both genome-wide DNA methylation changes and structural changes due to histone modifications. In an in vivo study, low-dose 5-aza-CdR showed a synergistic effect with CDDP administration, and a growth-suppressing effect was also observed in resistant strains.

研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌 エピジェネティクス 5-Aza-CdR 2次治療

1. 研究開始当初の背景

転移性膀胱癌に対する標準的化学療法として Gemcitabine (GEM) と Cisplatin (CDDP) の併用 (GC 療法) が普及しているが、生存期間は 13.8 ヶ月と短い (J Clin Oncol, 2000)。また転移を有する膀胱癌に対する 2 次治療は PD-1 モノクローナル抗体 Pembrolizumab において全生存期間の延長が認められたために (New Engl J Med 2017)、2017 年 12 月に本邦でも承認された。しかし十分な予後延長効果は認めないことから新たな治療開発が望まれている。このような背景から、治療抵抗例に対する新規治療法の開発を目指した研究を行った。

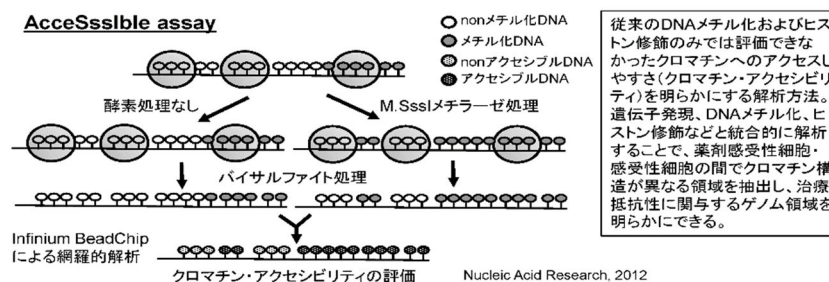
2. 研究の目的

化学療法耐性膀胱癌細胞株および in vivo モデルを用いて 5-Aza-CdR・CDDP 併用治療の安全性と有効性の POC を確立し、2 次治療としての臨床試験を行う。また 5-Aza-CdR による化学療法再感受性に関する分子機構について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(a) エピゲノム解析による化学療法抵抗性メカニズムの解明とマーカー探索

CDDP / GEM 抵抗性細胞株を用いて、抵抗性株と親株の DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチンアクセシビリティをゲノム網羅的に比較する。また 5-Aza-CdR 処理がエピゲノムに与える影響を解析する。クロマチンアクセシビリティは AcceSssIble アッセイにより解析する。AcceSssIble assay は、ゲノム DNA を CpG メチラーゼである M.SssI で処理した後に Infinium BeadChip による網羅 DNA メチル化解析を行うことで、メチル化を受ける領域 (accessible 領域) と受けない領域 (inaccessible 領域) を明らかにする解析法である (下図)。また、5-Aza-CdR 処理が DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチンアクセシビリティに与える影響を解析する。これらのデータを統合し、化学療法抵抗性および化学療法再感受性に関するエピジェネティクス変化の領域を明らかにする。



(b) 実験動物を用いた治療効果の検証

CDDP 耐性膀胱癌細胞株の造腫瘍能、浸潤・転移能ならびに治療効果を、実験動物を用いて検証する。NOD/SCID マウスの皮下に耐性株あるいは親株を移植し、造腫瘍能、腫瘍成長速度、組織所見、遠隔転移能などの検討を行う。また 5-Aza-CdR と CDDP の併用効果を検証する。

投与量を少なく副作用を抑え、より効果を期待できる、至適投与量を検証する。

4. 研究成果

クロマチンアクセシビリティは AcceSssIble アッセイにより解析を行い、メチル化を受ける領域 (accessible 領域) と受けない領域 (inaccessible 領域) を明らかにした。

CDDP / GEM 抵抗性細胞株では親株と比較して、ヒストン修飾を受けている領域がことなることが明らかとなった。薬剤の抵抗性にはヒストン修飾によるクロマチン構造の変化が寄与していることが明らかとなった。

5-aza-2-deoxycytidine (5-Aza-CdR: 商品名 vidaza) を用いた薬剤再感受性に関し、薬剤投与後の CDDP / GEM 抵抗性細胞株に対して、Infinium BeadChip による網羅 DNA メ

チル化解析を行った。薬剤投与 7 日目の段階でのゲノム網羅的な DNA メチル化解析では、耐性株においても親株と同様に 5-Aza-CdR による DNA 脱メチル化を認めるが、DNA 脱メチル化のプロファイルは親株と異なっていることが明らかとなった。

耐性化にはある特定の部位の遺伝子変化ではなく、ゲノム網羅的な DNA メチル化の変化およびヒストン修飾による構造変化の両方が寄与していることが判明した。

CDDP 耐性膀胱癌細胞株の造腫瘍能、浸潤・転移能ならびに治療効果を、実験動物を用いた研究を行った。ヌードマウスを用いた *in vivo* での研究では 2 種類の CDDP 耐性膀胱がん細胞株において、低用量の 5-aza-CdR(0.1 μ M, 48 時間)では腫瘍の増殖抑制はみられず、逆に増大効果が認められた。しかし CDDP を投与することで相乗効果を認め、耐性株においても増殖抑制効果を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西山 直隆
2. 発表標題 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in vitroおよびin vivoでのDNA脱メチル化剤の抗癌剤感受性への効果
3. 学会等名 第29回 泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山 直隆
2. 発表標題 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脱メチル化剤の抗癌剤感受性への効果
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 田山賢太郎、西山直隆、北村寛
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年～2020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	金井 弥栄 (Kanai Yae) (00260315)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授 (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	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	北村 寛 (Kitamura Hiroshi) (00404674)	富山大学・学術研究部医学系・教授 (13201)	
研究分担者	鈴木 拓 (Suzuki Hiromu) (20381254)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関