

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09715

研究課題名（和文）多面的アプローチによる尿路上皮癌における抗癌剤耐性機序の解明

研究課題名（英文）Elucidating anticancer drug resistance in urothelial carcinoma by multi-faceted approach

研究代表者

中川 昌之（NAKAGAWA, Masayuki）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：90164144

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：解糖系上にある代謝酵素であるPHGDHをノックダウンすると、膀胱癌細胞株の増殖能が有意に抑制されアポトーシスが誘導された。in vivo増殖アッセイではPHGDH阻害剤とGC療法の併用群では著名に腫瘍増殖が抑制された。Gem耐性株でmiR-99a-5pの過剰発現は細胞活性を抑制しGEM感受性が改善することを見出した。標的遺伝子としてSMARCD1に着目し、その機能喪失試験では細胞活性が抑制され、GEM感受性が回復した。miR-99a-5pの過剰発現やSMARCD1のノックダウンはin vivoでも腫瘍増殖能を抑制した。その機序はp21の誘導を通じた細胞老化の促進であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路上皮癌は他の泌尿器癌（前立腺癌や腎癌）に比べて明らかに有効な薬物治療の手段が少なく、薬剤耐性が大きな問題である。治療成績の向上や医療経済のためにも新規治療法の開発は急務である。本研究ではPHGDH遺伝子や、miR-99a-5pとその標的遺伝子であるSMARCD1が核心的なGC耐性機序に関わる可能性があることを明らかにできた。さらに研究を進展させれば臨床応用が可能なKey moleculeとして展開できる可能性が確認できた。

研究成果の概要（英文）：Knocking down PHGDH, a metabolic enzyme on the glycolysis pathway, significantly inhibited proliferation of bladder cancer cell lines and induced cell apoptosis. In in vivo, xenograft growth was significantly suppressed in the combination group of PHGDH inhibitors and GC therapy. Overexpression of miR-99a-5p was contributed to inhibit cell viability and improve GEM sensitivity in the GEM-resistant cell lines. We focused on SMARCD1 a candidate target gene, and cell viability was suppressed and GEM sensitivity was restored in the loss-of-function experiments. In vivo, overexpression of miR-99a-5p and knockdown of SMARCD1 also suppressed the xenograft growth. The mechanism was found to be acceleration of cell senescence through the induction of p21.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：尿路上皮癌 薬剤耐性 マイクロRNA シスプラチン ジェムシタピン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における尿路上皮癌全体の明らかな統計はないが、膀胱癌の罹患数は20,107人(2014年)、また死亡数は8,432人(2016年)で、上部尿路上皮癌(腎盂・尿管癌)患者は膀胱癌患者の3割程度存在すると考えられている。早期癌である筋層非浸潤尿路上皮癌が死亡の原因であることはまれであるが、局所進行癌である筋層浸潤癌の患者の5年生存率は約50%と低い。特に、外科手術が適応されない場合は、放射線療法に化学療法を併用しても5年生存率は約40%である。さらに再発・転移症例に対しては抗癌剤治療としてGemcitabine + CisplatinによるGC療法が1st lineとして行われるが、その奏効率は40%程度である。有効な2nd line抗癌剤治療は現在も確立されておらず、5年生存率は3.5%と極めて不良である。

近年、癌特異的な活性化シグナル経路を明らかにして、その責任分子を治療標的とした分子標的薬が開発され種々の癌において一定の効果を上げている、しかしながら尿路上皮癌においては複数の臨床試験が実施されたが、有効性を示すデータは得られなかった。ところが米国NCIが主導したCALGB-90101においては、尿路上皮癌で過剰発現が見られるHER2/neu分子に対するモノクローナル抗体であるtrastuzumabとpaclitaxel、carboplatin、gemcitabineを用いた第II相試験(n=109)では、免疫組織学的染色でHER2陽性であった57名(52%)では奏効率が70%(CR 11%、PR 59%)、OSの中央値14.1か月と比較的良好な結果であった。このことから、尿路上皮癌の個々の症例において活性化しているシグナル伝達経路を明らかにして治療の標的にすれば、有効かつ適切な治療法の開発に繋がることが示唆されている。最近、免疫チェックポイント阻害剤であるPembrolizumabが2nd line治療として承認されたがその奏効率は20%程度と不十分であり、また高額な薬価が問題となっている。このように尿路上皮癌は他の泌尿器癌(前立腺癌や腎癌)に比べて明らかに有効な薬物治療の手段が少なく、治療成績の向上や医療経済のためにも新規治療法の開発は急務である。

CisplatinやGemcitabine耐性の機序としてはこれまで、細胞内への取り込みの低下、細胞質内でのグルタチオン、メタロチオネンなどの解毒系酵素の発現亢進や、薬剤排出ポンプの発現上昇、DNA修復機能の亢進、また薬剤誘導によるアポトーシスの抑制などの広範な原因が報告されている。しかしながら核心的な耐性機序は未だ明らかでなく、有効な耐性克服剤の開発には繋がっていない。

### 2. 研究の目的

これまでの研究は既知の薬剤耐性研究手法の延長や、マイクロアレイを用いた薬剤耐性細胞株の遺伝子発現プロファイルに基づいて試行錯誤的に耐性に関わる遺伝子を探る手法が多く、このような研究戦略が妥当であったか疑問である。尿路上皮癌の個々の症例において活性化しているシグナル伝達経路を明らかにして治療の標的にすれば、有効かつ適切な治療法の開発に繋がることが示唆されている。そこで今回は多面的アプローチによる複合的な解析法によりGC耐性機序の解明が目的であった。

### 3. 研究の方法

当施設で独自に樹立され細胞バンクにも登録されている膀胱癌細胞株BOYとATCCから購入したT24を用いて、既にCisplatinとGemcitabineの高度耐性株を既に樹立していた。これらのGC耐性細胞株を用いてマイクロアレイを行い、感受性株と比較したRNAシーケンスを行った。次に同じ

細胞株を用いて deep sequencing によるマイクロRNAシーケンスを行った。このシーケンス結果から、GC耐性株で発現が変化しているマイクロRNAの発現パターンを調べ、複数のマイクロRNAが制御する遺伝子群を同定した。この解析にはTargetScanやmiRandaなどのターゲット予測ツールやKyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) による超幾何解析を用いてGC耐性関連の遺伝子群が所属する耐性関連シグナル経路を選別する。さらにメタボロミクス解析を行い、GC耐性株で発現が亢進している代謝経路に関わる耐性関連シグナル経路を選別した。この段階では10以上の耐性関連シグナルと100以上の関連遺伝子を想定しているが、The Cancer Genome Atlas (TCGA)を用いた臨床膀胱癌検体における耐性関連遺伝子発現と照らし合わせることで、臨床検体のデータとの整合性を確認した。

#### 4. 研究成果

microRNA (miRNA) は二十塩基ほどの小さな RNA 分子であり、mRNA の分解と翻訳阻害により遺伝子の機能を制御している。以前我々が行った次世代シーケンサー による miRNA 発現解析において、膀胱癌組織で microRNA-223 (miR-223) の発現が低下していた。miR-223 はいくつかの癌において癌抑制的に働くことが報告されているが、膀胱癌での報告はない。膀胱癌における miR-223 の働きを解明するため本研究を行った。臨床検体を用いて qRT-PCR で miR-223 の発現を調べた。precursor miR-223 を導入した膀胱癌細胞株 (BOY・T24) を用いて gain-of-function study を行った。in silico 解析にて標的遺伝子を検討し、選出した WDR62 の siRNA を導入した細胞株を用いて loss-of-function study を行った。The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを用いて miR-223、WDR62 の発現と臨床病理学的事項との関係を評価した。その結果、miR-223 の発現は膀胱癌組織において有意に下していた。precursor miR-223、si-WDR62 の細胞内導入により膀胱癌細胞株の増殖・遊走・浸潤能が抑制された。TCGA データベースを用いた解析では全生存期間において miR-223 の発現が高い群においては低い群に比べて有意に生存期間が長かった ( $P=0.0186$ )。miR-223 は膀胱癌細胞の増殖、遊走、浸潤に関与し、癌抑制的機能を有し、その一つの機序として WDR62 の機能抑制に関与していることが示唆された。

進行性尿路上皮癌の予後は不良であり、再発・転移症例に対して Gemcitabine + Cisplatin (GC)療法が 1st ライン治療であるが、治療反応が乏しい症例や治療後に再発をきたす症例も少なからず存在する。これらの症例に対して、有効な 2nd ラインの治療法は確立されていない。進行性尿路上皮癌や治療抵抗尿路上皮癌の新規治療法の開発には、これら癌細胞で活性化している分子経路を明らかにして、その経路を遮断する戦略が必要である。D-3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ (PHGDH) は解糖系上にある 3-ホスホグリセリン酸を変換しセリン合成へ代謝を誘導する酵素である。癌は急速で持続的かつ制御不能な増殖を維持するためにセリン合成が必要である。本研究では膀胱癌における PHGDH の発現やこれを標的とする治療的意義の検討を行った。TCGA を用いて、膀胱癌における PHGDH の臨床的意義を解析した。また、膀胱癌細胞株における PHGDH 阻害剤や si-RNA による PHGDH 抑制時の効果を in vivo/in vitro で評価した。更に、Gemcitabine and Cisplatin (GC 療法) 投与下での PHGDH 阻害剤の併用効果の有無を確認した。また、PHGDH のメチル化による制御機構に関して評価した。PHGDH 高発現群 ( $n=157$ ) は低発現群 ( $n=247$ ) に比べ予後が悪く、また多変量解析において PHGDH は独立した予後不良因子であった。PHGDH をノックダウンすると、膀胱癌細胞株の増殖能が有意に抑制され、アポトーシスが誘導された。更に、in vivo 増殖アッセイでは PHGDH 阻害剤と GC 療法の併用群が、各々の単剤群と比べて腫瘍抑制の相加相乗効果を示した。また、PHGDH はメチル基供与体 (SAM) により発現抑制を認めた。

進行性膀胱癌に対する一次治療としてゲムシタピン（GEM）とシスプラチン（CDDP）を用いた併用化学療法（GC療法）が推奨されている。しかしながら化学療法に対する耐性化が問題となっている。本研究はGEM耐性に着目し、新たな治療法の可能性を検討した。始めにヒト膀胱癌細胞株(BOY, T24)をGEM添加培養液で12ヶ月ほど継続して培養し、GEM耐性株(GEM-R-BOY, GEM-R-T24)を樹立した。親株、耐性株でsmall RNAシーケンス解析を行い、GEM耐性に関与しているmicroRNA (miRNA) を検索した。候補miRNAをGEM耐性株に形質導入して機能解析を行った。次にRNA次世代シーケンス解析を用いて標的遺伝子の検索を行い、標的遺伝子ノックダウンによる機能解析を行った。GEM-R-BOY・GEM-R-T24細胞株は親株と比べIC50で7倍以上の濃度差を認め、in vitro/vivoともに有意にGEM抵抗性を示した。次世代シーケンス解析を含めたin silico解析でmiR-99a-5pを候補に挙げた。miR-99a-5pの過剰発現は増殖能、遊走能、浸潤能を抑制し、GEM耐性株においてGEM感受性が改善することが示された。miR-99a-5pの標的遺伝子として、RNAシーケンス解析からSMARCD1に着目した。ルシフェラーゼレポーターアッセイでは、miR-99a-5pがSMARCD1を直接制御することが示された。si-RNAを用いた機能喪失試験では増殖能、遊走能、浸潤能が抑制され、GEM感受性が回復した。miR99a-5pの過剰発現やSMARCD1のノックダウンはin vivoにおいても増殖能を抑制した。さらに、ガラクトシダーゼ染色により、miR-99a-5pの誘導とSMARCD1の抑制が、p21の誘導を通じて細胞老化に寄与していることが示された。

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 Sugita Satoshi, Yoshino Hirofumi, Yonemori Masaya, Miyamoto Kazutaka, Matsushita Ryosuke, Sakaguchi Takashi, Itesako Toshihiko, Tatarano Shuichi, Nakagawa Masayuki, Enokida Hideki.	4. 巻 54
2. 論文標題 Tumor-suppressive microRNA-223 targets WDR62 directly in bladder cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 2222-2236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2019.4762	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 Hirofumi Yoshino, Hideki Enokida, Yoichi Osako, Nijiro Nohata, Masaya Yonemori, Satoshi Sugita, Kazuki Kuroshima, Masafumi Tsuruda, Shuichi Tatarano, Masayuki Nakagawa.	4. 巻 54
2. 論文標題 Characterization of PHGDH expression in bladder cancer: potential targeting therapy with gemcitabine/cisplatin and the contribution of promoter DNA hypomethylation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 2190-2202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1878-0261.12697.	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshino H, Osako Y, Yonemori M, Tatarano S, Enokida H, Nakagawa M.
2. 発表標題 Targeting PHGDH exerts anti-oncogenic effects in bladder cancer.
3. 学会等名 European Association of Urology (EAU19) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Osako Y, Yoshino H, Yonemori M, Tatarano S, Enokida H, Nakagawa M.
2. 発表標題 PHGDH can be a therapeutic target in bladder cancer.
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting (AUA2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大迫洋一, 吉野裕史, 米森雅也, 榎田英樹, 中川昌之
2. 発表標題 膀胱癌におけるPHGDHの機能解析.
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴田雅史, 吉野裕史, 榎田英樹, 中川昌之
2. 発表標題 膀胱癌におけるPHGDHの治療標的としての可能性とその発現制御機構の検討.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉井元規, 吉野裕史, 坂口 大, 榎田英樹.
2. 発表標題 microRNA-99a-5pは、膀胱癌におけるゲムシタピン耐性を克服するための重要な分子である.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 泌尿器科学分野  
<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~urology/index.php>

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	大迫 洋一  (OSAKO Yoichi)  (60793354)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・助教    (17701)	
研究分担者	榎田 英樹  (ENOKIDA Hideki)  (80347103)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授    (17701)	
研究分担者	吉野 裕史  (YOSHINO Hirofumi)  (90642611)	鹿児島大学・医歯学域医学系・講師    (17701)	

	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
研究協力者	鶴田 雅史  (TSURUDA Masafumi)		
研究協力者	黒島 和樹  (KUROSHIMA Kazuki)		

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