

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20791108  
研究課題名 (和文) 膀胱癌におけるジェムシタビン耐性克服を目的とした分子標的治療の基礎的研究  
研究課題名 (英文) Enhancement of chemo-sensitivity by molecular-targeting drugs in gemcitabine-resistant advanced bladder cancer.  
研究代表者  
村蒔 基次 (MURAMAKI MOTOTUGU)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：10448178

研究成果の概要 (和文)：ジェムシタビン感受性ヒト膀胱癌細胞を用いて、Clusterin の過剰発現とジェムシタビン抵抗性が相関していることを証明した。さらにジェムシタビン抵抗性を獲得した膀胱癌細胞に対しアンチセンス Clusterin (OGX-011) が再びジェムシタビン感受性を付与しうることを示した。

研究成果の概要 (英文)：Clusterin plays significant role in the acquisition of chemo-resistant phenotype in bladder cancer cells and the inactivation of Clusterin using OGX-011 combined with chemotherapeutic agent could be an attractive approach for advanced bladder cancer through the enhancement of chemo-sensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：膀胱癌、ジェムシタビン抵抗性、分子標的薬

## 1. 研究開始当初の背景

膀胱癌に対して有効な新規抗癌剤としてジェムシタビンが導入され、シスプラチンとの組み合わせ化学治療(GC療法)の有効性はM-VACと同等と報告されている。GC療法は副作用の頻度と程度がM-VAC療法よりも良好であり、M-VACに替わる治療法として期待されている(Von der Maase, H, et al, J Clin Oncol, 2005)。しかしGC療法抵抗性膀胱癌の頻度はM-VAC抵抗性膀胱癌の頻度と同等であり、原因として膀胱癌細胞のジェムシタビン抵抗性獲得が一つの原因と予想されている。だが、膀胱癌におけるジェムシタビン抵抗性獲得の分子機構は未だ解明されていない。浸潤性膀胱癌モデルにおいてもアンチセンス Clusterin はシスプラチンの効果を相乗的に増強する(Miyake, H, et al, Clin Cancer Res, 2001)。さらに表在性膀胱癌モデルにおいて、アンチセンス Clusterin はジェムシタビンの抗腫瘍効果を増強し、再発までの期間を遅延させることを報告した

(Miyake, H, et al, J Urol, 2004)。

しかし Clusterin の過剰発現が膀胱癌細胞のジェムシタビン抵抗性と相関しているかどうか、さらにジェムシタビン抵抗性を獲得した膀胱癌細胞に対しアンチセンス Clusterin が再びジェムシタビン感受性を付与することが出来るかどうかについては検討されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ジェムシタビン感受性ヒト膀胱癌細胞を用いて、Clusterin の過剰発現とジェムシタビン抵抗性が相関しているかどうかを検討することと、ジェムシタビン抵抗性を獲得した膀胱癌細胞に対しアンチセンス Clusterin が再びジェムシタビン感受性を付与することが出来るかどうかについて検討することである。

## 3. 研究の方法

(i) ヒト膀胱癌細胞UM-UC-3を用いたジェムシタビン抵抗性細胞株の樹立；

UM-UC-3細胞はジェムシタビン感受性を有する細胞株である。同細胞を低濃度のジェム

シタピンを含有する (1nM) 培養液で継代培養を開始し、漸次ジェムシタピン濃度を増加させた。

(ii) ジェムシタピン抵抗性ヒト膀胱癌細胞 (UM-UC-3/R) の遺伝子発現型スクリーニング；

mRNAマイクロアレー手法を用いてUM-UC-3/RとUM-UC-3親細胞 (UM-UC-3/P) と遺伝子発現パターンを比較し、発現量の変化が著しい遺伝子の中から分子標的治療の対象と考えるターゲットを選定し、ClusterinがUM-UC-3/Rで発現亢進していることを証明した。

(iii) Clusterinアンチセンスオリゴを用いたUM-UC-3/P, UM-UC3/Rの治療実験 (In vitro)；

Clusterinアンチセンスオリゴの治療はアンチセンスオリゴ単独の治療、ならびに臨床的治療濃度よりも低濃度でのジェムシタピンとアンチセンスオリゴの組み合わせ治療を実施した。それぞれ細胞生存アッセイ、Clusterin発現量のチェックを行った。

同時に上記治療により生じた細胞死がアポトーシスによるものかどうかを確認するため、フローサイトメトリーやアポトーシス関連タンパクのチェックを行った。

(ii) Clusterinアンチセンスオリゴを用いたU

M-UC-3/P, UM-UC3/Rの治療実験 (In Vivo)；

UM-UC-3/PまたはUM-UC-3/Rを同所移植 (膀胱壁注入) したマウスを作成し、全ての動物に低濃度ジェムシタピンを投与し、さらにClusterinアンチセンスまたはコントロールオリゴヌクレオチドを投与する実験を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト膀胱癌細胞UM-UC-3を用いたジェムシタピン抵抗性細胞株の樹立；

UM-UC-3細胞はジェムシタピン感受性を有する細胞株である。同細胞を低濃度のジェムシタピンを含有する (1nM) 培養液で継代培養を開始し、漸次ジェムシタピン濃度を増加させることによりジェムシタピン抵抗性を獲得した細胞株を樹立した。

(2) Clusterinアンチセンスオリゴを用いたUM-UC-3/P, UM-UC3/Rの治療実験 (In vitro)；

ジェムシタピン抵抗性の獲得に伴い発現量の増加したClusterinをClusterinアンチセンスオリゴによる治療により抑制できることを示した。ジェムシタピン抵抗株においてClusterinアンチセンスオリゴによる治療により感受性が亢進した。

(3) Clusterin アンチセンスオリゴを用いたUM-UC-3/P, UM-UC3/Rの治療実験(In Vivo);

UM-UC-3/Pはヌードマウスの膀胱への同所移植すると、約4週間後に30-40%の遠隔転移を起こす細胞株である。UM-UC-3/RはUM-UC-3/Pと比べてより悪性度が高く強い転移能を示した。UM-UC-3/PまたはUM-UC-3/Rを同所移植(膀胱壁注入)したマウスを作成し、全ての動物に低濃度ジェムシタビンを投与し、さらにClusterinアンチセンスまたはコントロールオリゴヌクレオチドを投与した。ジェムシタビン抵抗性を獲得した膀胱癌細胞にClusterinアンチセンスオリゴが再びジェムシタビン感受性を賦与することが出来ることを示した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①BJU Int. 2009 Feb;103(3):384-90.

Chemosensitization of  
gemcitabine-resistant human bladder

cancer cell line both in vitro and in vivo  
using antisense oligonucleotide  
targeting the anti-apoptotic gene,  
clusterin.

Muramaki M, So A, Hayashi N, Sowery  
R, Miyake H, Fujisawa M, Gleave ME.

[学会発表] (計 1 件)

①村蒔基次、Chemosensitization of  
gemcitabine-resistant human bladder  
cancer cell line both in vitro and in vivo  
using antisense oligonucleotide  
targetting the anti-apoptotic gene,  
clusterin 2007年10月 日本癌学会総会

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村蒔 基次 (MURAMAKI MOTOTUGU)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10448178