

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16757

研究課題名（和文）CD44v陽性癌幹細胞モデルを基盤とした新規膀胱内注入療法の確立

研究課題名（英文）Establishing New Therapeutic Strategy for Urothelial Carcinoma

研究代表者

荻原 広一郎 (Ogihara, Koichiro)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：30626677

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、治療抵抗性膀胱癌組織内の癌幹細胞の細胞内代謝ネットワークを明らかにするとともに選択的に有効となる新規治療標的を同定並びに臨床応用に向けた治療戦略を構築する事である。当教室で樹立した2種の膀胱癌細胞株を用いて、本学設置のメタボロミクスコアを用いてメタボローム解析を行った結果、IDH2を軸とした代謝リプログラミング機構の存在が示唆された。IDH2阻害剤を用いたin vivo実験を行い、IDH2阻害薬と既存抗癌剤の併用療法の抗腫瘍効果が高いことを認めた。また、IDH2蛋白は術前化学療法の効果が認められなかったUC検体で強い発現を認めることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、難治性UCにおいてIDH2は逆行性TCA回路を駆動し、2-HGの蓄積とHif-1の安定化を引き起こすことを確認した。またIDH2の機能制御によって、膀胱癌細胞の代謝リプログラミング機構を抑制させることで既存の抗癌剤の感受性回復を期待できる可能性が示唆された。IDH2阻害薬は悪性脳腫瘍や再発性急性骨髄性白血病の一部臨床応用が開始されていることから、難治性UCの治療選択肢の1つになり得ると予想される。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to elucidate the intracellular metabolic network of cancer stem cells within treatment-resistant bladder cancer tissue, and to identify novel therapeutic targets that selectively exert effective effects, as well as to construct a treatment strategy for clinical application. Using two established bladder cancer cell lines in our department, metabolome analysis was performed using the metabolomics core facility at our institution, revealing the existence of a metabolic reprogramming mechanism centered around IDH2. In vivo experiments using an IDH2 inhibitor demonstrated a high antitumor effect of combination therapy with IDH2 inhibitors and existing anticancer drugs. Additionally, we confirmed strong expression of the IDH2 protein in UC samples where the preoperative chemotherapy was not effective.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路上皮癌 IDH2阻害薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年 BCG 治療抵抗性の非筋層浸潤性膀胱癌(NMIBC)は BCG unresponsive と厳密に定義され、転移浸潤する malignant potential の高い細胞群を有するためにできる限り早期の周術期化学療法と膀胱全摘除術が推奨されている。BCG unresponsive 膀胱癌の出現が日常臨床で問題になっており、有効な薬剤治療が存在しないアンメットメディカルニーズである。**なぜ、一部の癌細胞は治療の過程で根治に至らず治療抵抗性を獲得していくのか？BCG unresponsive tumor への新規治療標的は何か？これが研究の核心をなす学術的「問い」である。**

申請者は過去の先行研究でマウス膀胱癌 (MBT2) 細胞から CD44v 高発現細胞 (MBT2V) をマウス膀胱癌幹細胞モデルとして樹立し、CD44v がシスチントランスポーター (xCT) と細胞膜上で架橋構造を形成することで細胞内に還元物質であるグルタチオンを蓄積させ、抗癌剤投与時の活性酸素種 (Reactive oxygen species) 発生を抑制させることを明らかにした (図 1)。さらに xCT 阻害剤である炎症性腸疾患治療薬スルファサラジンがマウス膀胱癌肺転移モデルにおいて転移先の腫瘍量を有意に抑制することを報告している (Ogihara et al. Cancer Science 2019)。

上記先行研究を踏まえ、申請者は癌幹細胞は細胞増殖速度が遅く低酸素低栄養下でも生存が可能である特徴を持つことから、他腫瘍細胞と比較して特殊な細胞内代謝機構を有している事に着目した。過去の研究から CD44v が解糖系酵素であるピルビン酸キナーゼ M2 (PKM2) と競合して解糖系 (ワールブルグ効果) を亢進させることが報告されている (Tamada et al. Cancer research 2012)。すなわち、癌幹細胞は自身の代謝機構を酸化的リン酸化から嫌気解糖系にエネルギー産生基盤を switch することで、過酷な環境下でも生存可能な代謝機構にリプログラミングされている事が予想された。

本研究により癌幹細胞の細胞内代謝機構の全貌解明を行い、癌幹細胞に選択的な新規膀胱内注入療法の開発につなげたいと考えた。

### 2. 研究の目的

**本研究の目的は、治療抵抗性膀胱癌組織内の癌幹細胞の細胞内代謝ネットワークを明らかにするとともに選択的に有効となる新規治療標的を同定並びに臨床応用に向けた治療戦略を構築する事にある。**

### 3. 研究の方法

#### 1. ヒト膀胱癌薬剤耐性細胞株における網羅的代謝産物の定量解析

当教室で樹立した膀胱癌 2 細胞とマウス幹細胞モデルをメタボロミクスコア CE-MS (キャピラリー電気泳動質量分析装置) を用いてメタボローム解析を行う。メタボロミクスコアによる網羅的代謝産物の定量解析は、嫌気解糖系、五炭糖回路、TCA 回路、電子伝達系における糖代謝産物すべてを数値として定量化することで癌細胞が好気性、嫌気性のどの代謝経路に依存しているかを算出可能である。各代謝産物産生の比重を heat map で可視化し、野生株と治療抵抗性株間の代謝産物蓄積または減少に関する各種代謝経路を比較し、治療抵抗性膀胱癌の代謝リプログラミング経路の網羅的スクリーニングを行う。すでに予備的検討からヒト膀胱癌野生株と薬剤耐性株間でのメタボローム解析を実施したところ、耐性株では糖代謝における好気性回路である TCA 回路の一部の代謝経路が抑制され、嫌気解糖系の一部であるペントースリン酸回路の亢進を確認し、嫌気代謝に依存した代謝リプログラミングを構築していることを確認した。これらの結果から、新規治療標的となりうる代謝経路、代謝関連酵素群の同定と機能解析を行う。

#### 2. 膀胱癌皮下腫瘍モデルを利用した IDH2 阻害剤による抗腫瘍効果の確認

ヒト膀胱癌細胞を BALBnu/nu ノードマウスの皮下へ移植する。この皮下腫瘍マウスモデルにコントロール、GEM/CDDP、IDH2 阻害剤単独、IDH2 阻害剤 + GEM/CDDP を行う。IDH2 阻害剤には、過去の

報告より AGI6780 の使用を予定している。薬剤非投与群、IDH2 投与群、併用群と各群に 5 匹ずつ割り付ける。腫瘍移植後第 5 日目より 3 日毎に計 5 回投与する。Day30 に安楽死させ、膀胱腫瘍の摘出を行い、腫瘍組織、腫瘍周辺組織、正常臓器における障害の程度、アポトーシス誘導の有無、血管新生阻害の状況などを免疫染色で確認し、抗腫瘍効果につき比較検討する。

### 3. TMA を用いた、嫌気解糖酵素群と臨床データ照合による予後解析

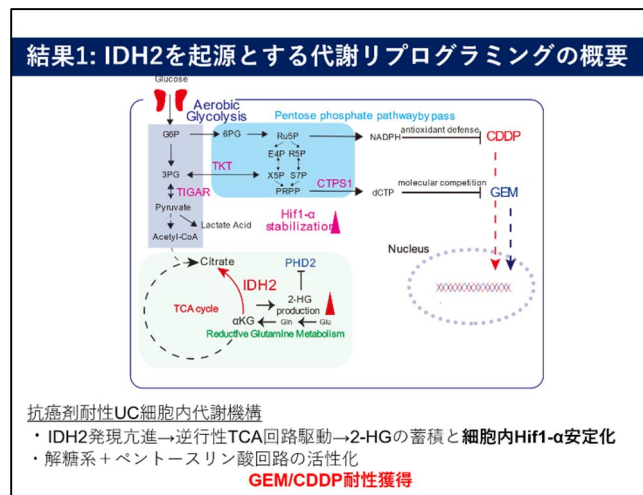
代謝リプログラミングの過程で発現亢進/抑制される各種代謝酵素群を TMA を用いてヒト組織検体に於ける発現の有無と強度を確認し、臨床情報と照合して予後との関連を評価する。

#### 4. 研究成果

##### 1) IDH2 は、逆行性 TCA 回路を駆動させ、Oncometabolite 2-ヒドロキシグルタル酸(2-HG)が蓄積し、細胞内 Hif1- を安定化させる。

当教室で樹立した 2 種の膀胱癌細胞株 T24 と UMUC3 抗癌剤耐性株を用いて、本学設置のメタボロミクスコア CE-MS(キャピラリー電気泳動質量分析装置)を用いてメタボローム解析を行った。CE-MS による網羅的メタボロミクス解析は、水溶性代謝産物の全貌を定量化するだけでなく、安定同位体  $^{13}\text{C}$  で標識することで糖代謝産物のリアルタイムな代謝動態を確認することができた。

結果、抗癌剤耐性株は野生株と比較し以下の代謝相違が得られた。



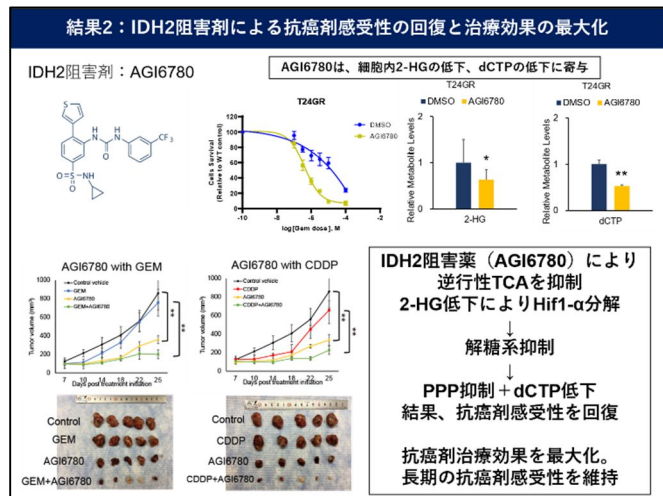
解糖系(ピルビン酸/乳酸)代謝産物の産生量が有意に高いこと、ペントースリン酸回路(Pentose Phosphate Pathway :PPP)の主経路であるピリミジン代謝経路に関連する代謝産物量が高いこと、ミトコンドリア内の酸化的リン酸化過程を  $^{13}\text{C}$ -5 で標識し、リアルタイムな代謝動態を確認したところ、逆行性にクエン酸回路(TCA cycle)が駆動しており、oncometabolite である 2-ヒドロキシグルタル酸(2-HG)を蓄積させ、るとともに細胞内 Hif-1 濃度を安定化させていることがわかった。

このとき、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 2 の発現が有意に上昇していたことから、IDH2 を軸とした代謝リプログラミング機構を備えることを見いだした。その結果、糖代謝の大部分は解糖系にシフトすることで GEM に競合作用を持つデオキシシチジン三リン酸(dCTP)が産生されると同時に、強力な還元物質 NADPH が産生されることで抗酸化能が増強され、CDDP への抗腫瘍効果をも無力化する防御機構を備えることがわかった(結果 1)。

##### 2) メタボリックチェックポイント分子イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 2(IDH2)阻害剤における in vivo 実験

IDH2 の機能制御は、難治性を獲得した UC 細胞に重要と考え、IDH2 阻害を行う実験を行った。皮下腫瘍マウスモデル(BALB nu-/nu-)を用いて in vivo 実験を行った。具体的には、コントロール

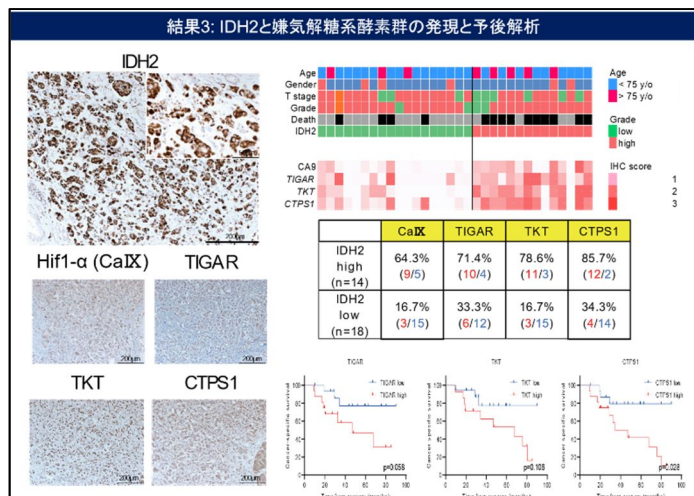
群、既存薬剤(CDDP・GEM)群、IDH2 単剤群、抗癌剤 + IDH2 併用群の4グループに分け、それぞれ6匹ずつの計24匹の腫瘍体積を確認した。CDDP/GEM は15mg/m<sup>2</sup>/50mg/m<sup>2</sup>をそれぞれday8,15に投与し、IDH2 阻害剤(AGI6780) 50mg/m<sup>2</sup>をday8 より連日腹腔内投与した。結果、耐性株では、既存薬剤における腫瘍体積に差は認めない一方で、IDH2 単剤群、IDH2 + 既存抗癌剤併用群で有意に抗腫瘍効果を認めた。特に摘出マウス皮下腫瘍にたい



し、免疫組織学検査を行ったところ癌細胞の活動性を測る指標である Ki-67 活性が IDH2 使用群で有意に低下することを確認した。以上より IDH2 阻害は GEM/CDDP の耐性を獲得した難治性 UC 細胞において抗腫瘍効果並びに既存抗癌剤の治療効果を大きく向上させることに寄与することを確認した(結果 2)。

### 3) 組織マイクロアレイ(Tissue Micro Array:TMA)を用いた臨床検体における解糖系酵素群発現の確認と予後解析

術前補助化学療法として GEM/CDDP が投与された筋層浸潤性膀胱癌患者の手術臨床検体にたいし免疫組織学染色 (Immunohistochemistry: IHC) を行った。結果、抗癌剤感受性の高かった検体では IDH2 蛋白は発現が低かった一方で抗癌剤感受性の低かった検体では IDH2 蛋白が発現亢進していることに加え、Hif-1 蛋白の surrogate marker として知られる CA、嫌気解糖系酵素群である TKT、TIGAR、CTPS1 蛋白の発現亢進も同時に確認でき、IDH2 蛋白の発現亢進は、化学療法治療後の予後とも関連をみとめた (結果 3)。



以上の結果から、難治性 UC の代謝リプログラミング機構は IDH2 によって制御されていることを確認した。IDH2 阻害薬は悪性脳腫瘍や再発性急性骨髄性白血病に一部臨床応用が開始されていることから、難治性 UC の治療選択肢の1つになり得ると予想される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kufukihara Ryohei, Kikuchi Eiji, Ogihara Koichiro, Shigeta Keisuke, Yanai Yoshinori, Takamatsu Kimiharu, Ide Hiroki, Oyama Masafumi, Asakura Hirota, Mizuno Ryuichi, Oya Mototsugu	4. 巻 28
2. 論文標題 Role of Previous Malignancy History in Clinical Outcomes in Patients with Initially Diagnosed Non-Muscle Invasive Bladder Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 5349 ~ 5359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-021-09750-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kufukihara Ryohei, Kikuchi Eiji, Ogihara Koichiro, Shigeta Keisuke, Oya Mototsugu	4. 巻 28
2. 論文標題 ASO Author Reflections: Previous History of Non-urothelial Malignancy May Provide Predictive Information of Worse Clinical Outcome for Initially Diagnosed Non-Muscle Invasive Bladder Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 5360 ~ 5361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-021-09787-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kayama Emina, Shigeta Keisuke, Kikuchi Eiji, Ogihara Koichiro, Hakozaaki Kyohei, Iwasawa Tomohiro, Kamisawa Ken, Kanai Kunimitsu, Ide Hiroki, Hara Satoshi, Mizuno Ryuichi, Oya Mototsugu	4. 巻 51
2. 論文標題 Guideline adherence for radical cystectomy significantly affects survival outcomes in non-muscle-invasive bladder cancer patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1303 ~ 1312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyab060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kufukihara Ryohei, Kikuchi Eiji, Shigeta Keisuke, Ogihara Koichiro, Arita Yuki, Akita Hirota, Suzuki Tatsuya, Abe Takayuki, Mizuno Ryuichi, Jinzaki Masahiro, Oya Mototsugu	4. 巻 40
2. 論文標題 Diagnostic performance of the vesical imaging-reporting and data system for detecting muscle-invasive bladder cancer in real clinical settings: Comparison with diagnostic cystoscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations	6. 最初と最後の頁 61.e1 ~ 61.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.urolonc.2021.07.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------