

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791744

研究課題名（和文）尿路上皮癌幹細胞の同定および癌幹細胞をターゲットとした治療モデルの構築

研究課題名（英文） Isolation of the bladder cancer-initiating cells (BCICs) and investigating the BCIC-targeting therapeutic strategy

研究代表者

田所 学 (TATOKORO MANABU)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00456237

研究成果の概要（和文）：進行尿路上皮癌においては、抗癌剤により、一時的には良好な治療効果を示すものの、長期生存率は極めて低い。これは、少数の癌幹細胞成分が残存し、再燃を来すためと考えられている。本研究では、尿路上皮癌幹細胞の分離・同定の上、抗癌剤抵抗性の検証、およびそのメカニズムを解析し、癌幹細胞を標的とした治療戦略の構築を目指した。その結果、低濃度の HSP90 阻害剤を用いることにより、抗癌剤抵抗性克服の可能性が示され、進行尿路上皮癌患者における治療成績改善に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Although many advanced bladder cancer patients show an initially good tumor response to systemic chemotherapy, most of them develop recurrences and eventually die from the disease. This phenomenon is attributable to the re-growth of bladder cancer-initiating cells (BCICs) that have survived chemotherapy. In this study, the authors have isolated BCICs, analyzed their chemo-sensitivity and investigated whether heat-shock protein 90 (Hsp90) inhibitors potentiate the chemo-cytotoxicity on BCICs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：泌尿器科学、腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

本邦では年間 5000 例以上が進行尿路上皮癌により死亡しており、死亡率低減のためには、予防・早期診断・早期治療のほか、進行例に対する有効な治療法の確立が重要である。

進行尿路上皮癌は、化学療法および放射線療法に対する感受性が比較的高い癌であるが、転移性膀胱癌の場合、全身化学療法により良好な近接治療効果（完全寛解率 30%、奏効率 60-70%）が得られるにもかかわらず、長期生存率は極めて低い（5%未満）という現状にある。尿路上皮癌に対する治療感受性

を高めることができれば、全身化学療法と残存病変に対する手術療法、放射線療法を組み合わせることにより、進行尿路上皮癌の治療成績の改善が可能と考える。

2. 研究の目的

(1) 近年提唱されている癌幹細胞理論では、癌組織中にごく少数存在し自己複製能と多分化能を特徴的に有する癌幹細胞は、癌組織の存続・維持に必要不可欠であるのみならず、抗癌剤や放射線に対する治療抵抗性にも重要な役割を担っていると考えられている。

癌幹細胞理論の観点から、進行尿路上皮癌に対する集学的治療が有効であるにも関わらず、生命予後が不良である原因の一つは、ごく少数残存する治療抵抗性を有する癌幹細胞成分が後に臨床的再燃、ひいては癌死を引き起こすためと考えられる。したがって、癌幹細胞集団をターゲットとした癌治療モデルの構築は、将来的に集学的治療による進行尿路上皮癌患者の予後改善に貢献すると期待される。

(2) 近年、様々な固形癌においても癌幹細胞が分離・同定されつつある。膀胱癌においては、最近、CD47 が癌幹細胞マーカーである可能性が報告されたが、尿路上皮癌幹細胞をターゲットとした治療法の探索に踏み込んだ研究はなされていない。

本研究では、

- ① 高純度の尿路上皮癌幹細胞の分離・同定
- ② 尿路上皮癌幹細胞における治療耐性メカニズムの解析
- ③ 尿路上皮癌幹細胞の治療耐性克服および、癌幹細胞を標的とした治療モデルの構築

を目的とした。

3. 研究の方法

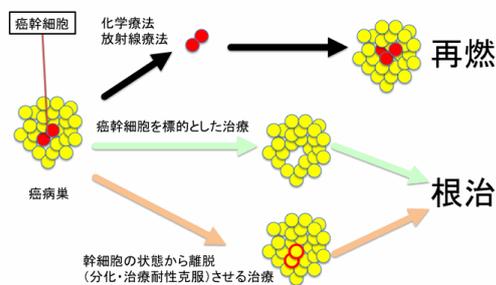


図1 癌幹細胞理論に基づく臨床的再燃

(1) 膀胱癌細胞株 (5637、T24、JTC-30) から、細胞表面マーカー発現により、癌幹細胞の定義とされる「自己複製能」、「多分化能」、「腫瘍再現能」を兼ね備える細胞集団を超高速度 Cell Sorter を用いて分離した。具体的には spheroid colony assay による浮遊細胞塊 (sphere) 形成能、SCID マウス腫瘍皮下移植モデルを用いた limiting dilution assay による腫瘍形成能で評価した。

(2) シスプラチンに対する治療抵抗性を検証し、膀胱癌幹細胞の治療耐性関連分子発現プロファイルに基づき、heat shock protein 90 (HSP90) 阻害剤による膀胱癌幹細胞のシス

プラチン抵抗性克服の可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) CD44+膀胱癌細胞が、CD44-膀胱癌細胞に比べ、sphere 形成能および腫瘍形成能が高い (10~100 倍)、癌幹細胞の要件を満たす細胞集団であることを確認した (図 2)。

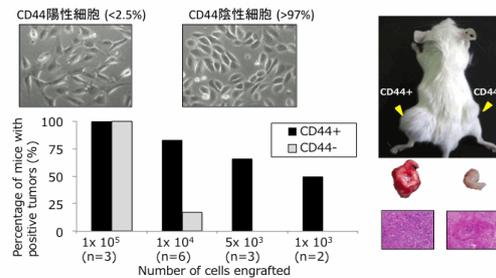


図2 CD44陽性細胞は高い腫瘍形成能を有する

(2) 膀胱癌幹細胞は CD44-細胞の約 2 倍のシスプラチン抵抗性を示した。膀胱癌幹細胞は高い Akt および ERK 活性を示した (図 3)。

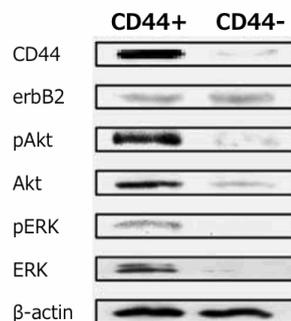


図3 CD44陽性細胞は高いAktおよびERK活性を示した

(3) 非殺細胞濃度の HSP90 阻害剤は、膀胱癌幹細胞の Akt および ERK 活性を同時に不活性化させ、シスプラチンによるアポトーシス誘導を増強することによりその殺細胞効果を相乗的に高めた (図 4, 5, 6)。

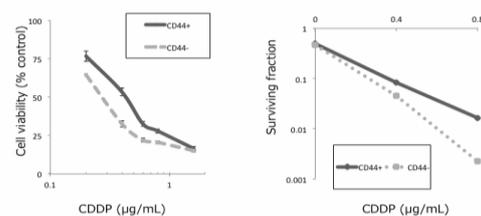


図4 CD44陽性癌細胞は、CDDP抵抗性である

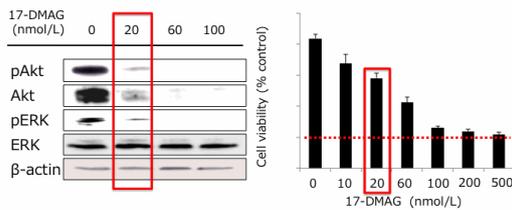


図5 非殺細胞濃度のHSP90阻害剤は、膀胱癌幹細胞のAktおよびERK活性を同時に不活化させる

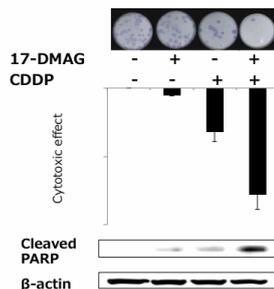


図6 CDDPによるアポトーシス誘導を増強することによりその殺細胞効果を相乗的に高めた

(4) 膀胱癌幹細胞を移植したマウスモデルにおいて、HSP90 阻害剤はシスプラチンの抗腫瘍効果を増強した(図7)。

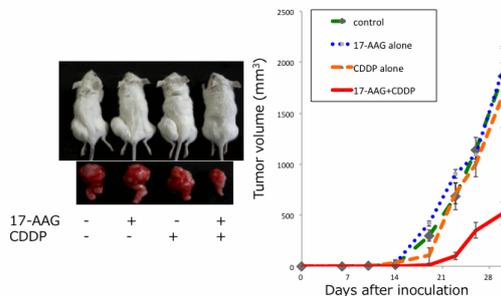


図7 膀胱癌幹細胞を移植したマウスモデルにおいて、HSP90阻害剤はCDDPの抗腫瘍効果を増強したことによりその殺細胞効果を相乗的に高めた

(5) 結論として、膀胱癌幹細胞はシスプラチン抵抗性を示し、低濃度 HSP90 阻害剤を用いることで、シスプラチン耐性克服の可能性が示された。HSP90 阻害剤の併用が、進行膀胱癌患者における全身化学療法の治療成績改善に寄与する可能性が示唆された。

(6) これまでの尿路上皮癌細胞株を用いて得られた知見をもとに、進行尿路上皮癌症例の病理組織から、CD44+癌細胞を分離し、前述した手法を用いて「真の尿路上皮癌幹細胞」を分離し、その生物学的特性を *in vitro*,

in vivo で解析し、HSP90 阻害剤およびシスプラチンなどの抗癌剤併用療法の治療効果を検討する。

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)

(1) 田所 学、古賀 文隆、吉田 宗一郎、川上 理、藤井 靖久、Len Neckers、木原和徳、Potential role of Hsp90 inhibitors in overcoming cisplatin resistance of bladder cancer-initiating cells、International Journal of Cancer、査読あり、131 巻 2012、987-96

DOI: 10.1002/ijc.26475.

[学会発表] (計 2 件)

① 田所 学、古賀 文隆、吉田 宗一郎、川上 理、藤井 靖久、Len Neckers、木原和徳、Potential role of Hsp90 Inhibitors in overcoming cisplatin resistance of bladder cancer stem cells、第 27 回欧州泌尿器科学会年次総会、2012 年 2 月 26 日、フランス、パリ

② 田所 学、古賀 文隆、吉田 宗一郎、福島 啓司、川上 理、藤井 靖久、Len Neckers、木原 和徳、膀胱癌幹細胞のシスプラチン抵抗性と、Heat shock protein 90 阻害剤による抵抗性克服。第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012 年 4 月 21 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田所 学 (TATOKORO MANABU)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号： 00456237

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

