

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 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791784
 研究課題名(和文) バフィロマイシンを用いた表在性・浸潤性膀胱癌細胞に対する治療戦略の確立
 研究課題名(英文) Establishment of the treatment strategy for the superficial and invasive bladder cancer cell using the bafilomycin.
 研究代表者
 吉峰 俊輔 (YOSHIMINE SHUNSUKE)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：70445245

研究成果の概要(和文)：

バフィロマイシンは Bcl-xL タンパクの抑制を通じて尿路上皮癌細胞株(膀胱癌細胞株)の抗腫瘍効果をもたらすことを確認した。Bcl-xL タンパクは上部尿路上皮癌患者の検体で高発現しており、予後因子であることを確認した。これにより Bcl-xL を介したバフィロマイシンの新規抗癌剤としての可能性を示唆することができた。

研究成果の概要(英文)：

The bafilomycin induced antitumor effect of bladder cancer cell lines through the inhibition of the Bcl-xL protein function. The Bcl-xL protein was presented at high frequency in the specimen of the upper urinary tract urothelial carcinoma and the high expression level of Bcl-xL was an independent poor prognostic factor. Therefore it is demonstrated that the bafilomycin may be a novel anticancer agent through the inhibition of Bcl-xL protein.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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：癌・癌治療・膀胱癌・化学療法

1. 研究開始当初の背景

局所浸潤性、転移性尿路上皮腫瘍(尿路上皮癌)の治療としての methotrexate、vinblastin、adryamycin、cisplatin を用いた MVAC 療法の奏効率約 70%とされているが、生存予後の改善にあまり寄与せず、その副作用も決して無視できるものではない。その他、gemcitabin、paclitaxel を用いた GP、gemcitabine、cisplatin を用いた GC 等が存在し、一定の奏効率を認めるものの、その後、再発を認め長期の生存に寄与しない。現在の化学療法の有効性、副作用軽減に限界があり、新規抗癌治療戦略の確立が切望されている。また表在性膀胱癌に対しても初期治療後、高頻度に排尿困難、血尿、発熱等の強い副作用を認める BCG 膀胱内注入療法を越える再発予

防効果を有する治療法は存在せず、新規膀胱内注入抗癌治療の確立が必至である。膀胱癌術後再発治療としての化学療法の現状は、副作用が強く、かつ長期の生存を得られない。また、膀胱内再発治療における BCG 膀胱内注入療法に関しても副作用の観点からよりよい抗癌剤治療が求められている。したがって、これらの見地より新規薬剤を使用した尿路上皮癌細胞に対する新たな治療戦略が必要とされている。

2. 研究の目的

今回われわれは、濾胞型 ATPase 阻害剤であるバフィロマイシン(BMA)を用いた表在性・浸潤性膀胱癌細胞(尿路上皮癌)に対する治療戦略の確立を目的とした。BMA が抗アポトーシス蛋白である Bcl-xL の機能阻害を

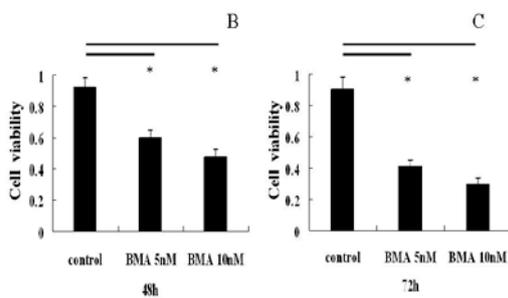
引き起こすことが肺癌の細胞株で報告されており、Bcl-xLを過剰発現した癌細胞は各種抗癌剤抵抗性を示すことが報告されている。さらに膀胱癌細胞株においてはBcl-xLが高頻度に過剰発現していることが報告されているため、Bcl-xLを含めたBcl関連蛋白の発現を検討し、BMAの膀胱癌細胞株における抗腫瘍効果、マウスの膀胱癌皮下腫瘍モデルにおけるアポトーシスの誘導、発現、抗腫瘍効果に関し検討する。また、当教室保存の上部尿路上皮癌患者の臨床検体を用いた免疫組織学的解析を含め、予後因子の検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

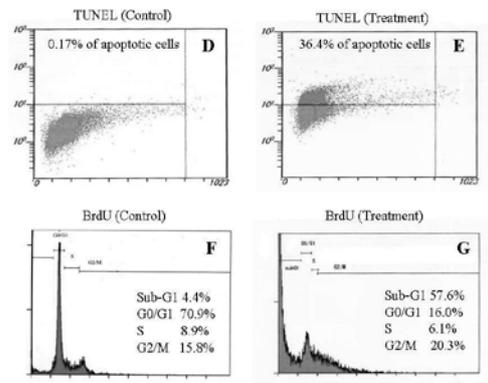
研究方法として、膀胱癌細胞株に対する *in vitro* における BMA による詳細なアポトーシス関連蛋白の検討を行う。また、マウス膀胱癌皮下腫瘍モデルを作成し、BMA の腹腔内投与を施行し、抗腫瘍効果を測定する。これらの結果を検討することで薬剤の投与経路、投与濃度、投与期間等の新たな発見につながると考えられる。最後に、摘出した膀胱癌検体を用い、*in vivo* におけるアポトーシス誘導の有無および、正常細胞への副作用の発現の有無などを検証する。また、上記方法で得られた知見により尿路上皮癌の臨床検体を用いて免疫組織学的検討と臨床経過のプロファイルを統合させ、統計学的手法による尿路上皮癌患者での予後因子に結びつく蛋白の解明と、臨床応用への可能性を検討する。

4. 研究成果

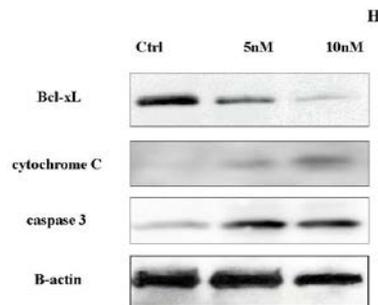
(1) BMA による膀胱癌細胞株 (UMUC-3) での容量・時間依存性に腫瘍増殖抑制効果を認めた。



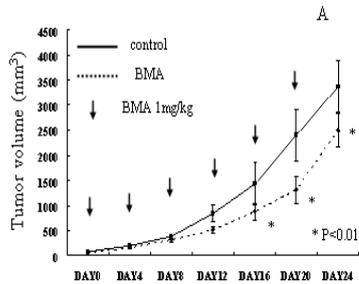
(2) BMA による膀胱癌細胞株 (UMUC-3) でのアポトーシス誘導効果を認めた。



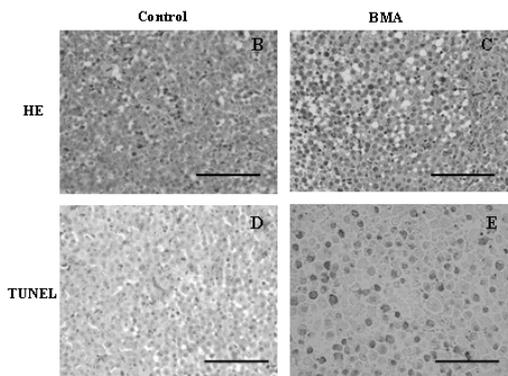
(3) BMA による膀胱癌細胞株 (UMUC-3) でのアポトーシス関連タンパクのウェスタンブロットでの検討、容量依存性に抗アポトーシスタンパクである Bcl-xL タンパクの down-regulation を認めた。



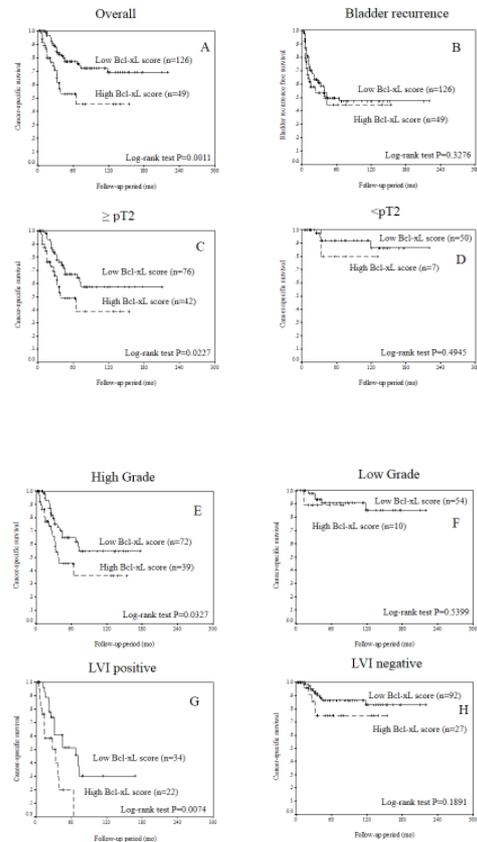
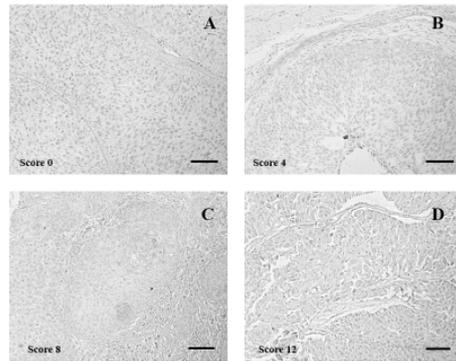
(4) 膀胱癌細胞のマウス皮下腫瘍モデルでの BMA の抗腫瘍効果の検討。BMA 投与群でコントロール群に比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を確認した。



(5) マウス皮下腫瘍モデルでのアポトーシスの誘導、BMA 治療群で腫瘍細胞のアポトーシス誘導 (TUNEL 染色) が確認された。



(6) 上部尿路上皮癌患者の臨床経過との関連の検討 (Bcl-xL タンパクの予後因子としての解析)。病理組織検体で Bcl-xL タンパクが高発現している群 (High Score) では低発現の群 (Low Score) と比較し有意に予後が悪いといった結果であった。また、腫瘍の深達度、高グレード、リンパ管浸潤陽性群では Bcl-xL タンパクが高発現していることが確認された。



(7) 臨床データの解析の結果、Bcl-xL タンパクの高発現は、上部尿路上皮癌患者の独立した予後因子であることが確認された。

Characteristic	Cancer-specific survival		Bladder recurrence-free survival	
	Univariate analysis p	Multivariate analysis HR (95% CI)	Univariate analysis p	Multivariate analysis HR (95% CI)
Age (Q2 / <Q3)	0.250		N.S.	0.369
Gender (Male / Female)	0.279		N.S.	0.291
Tumor stage (pT1 / >pT2)	0.001		N.S.	0.435
Grade (High / Low)	<0.001		N.S.	0.577
Tumor location (Pelvic / Ureter)	0.231		N.S.	0.169
LVI (Positive / Negative)	<0.001	4.663 (2.343-9.287)	<0.001	0.745
Pathologic complete response (High / Low)	0.001	2.075 (1.107-3.852)	0.022	0.137

HR, Hazard ratio; CI, Confidence interval; LVI, Lymphovascular invasion

以上の結果より、尿路上皮癌においてアポトーシス関連タンパクである Bcl-xL は上部尿路上皮癌患者の予後因子であり、BMA はこの Bcl-xL タンパクの down-regulation と、アポトーシスを誘導することが確認された。したがって、BMA は膀胱癌を含めた尿路上皮癌患者の有望な新規抗癌剤となりうる可能性が示唆された。

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)

Prognostic significance of Bcl-xL expression and efficacy of Bcl-xL targeting therapy in urothelial carcinoma.

Shunsuke Yoshimine, Eiji Kikuchi, Takeo Kosaka, Shuji Mikami, Akira Miyajima, Yasunori Okada, Mototsugu Oya.

British Journal of Cancer (2013), 1-9 | doi: 10.1038/bjc.2013.216

(査読あり)

[学会発表] (計2件)

(1) 上部尿路上皮癌における Bcl-xL の発現と予後との関連の検討

第100回 日本泌尿器科学会総会 2012年4月22日 横浜

吉峰 俊輔、菊地 栄次、小坂 威雄、宮嶋 哲、大家 基嗣

(2) Prognostic significance of Bcl-xL protein expression on survival in patents with upper tract urothelial carcinoma treated with radical nephroureterectomy. Annual Meeting of the American Urological Association. 2013年5月5日
SAN DIEGO CA USA, San Diego Convention Center

Shunsuke Yoshimine, Eiji Kikuchi, Takeo Kosaka, Shuji Mikami, Akira Miyajima, Yasunori Okada, Mototsugu Oya

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉峰 俊輔 (YOSHIMINE SHUNSUKE)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70445245