

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462502

研究課題名(和文)炎症性免疫応答の制御を介する新規NF B阻害剤による泌尿器系癌の治療戦略の確立

研究課題名(英文) Treatment strategies of urological cancers through the regulation of inflammatory immune response by novel NFkappaB inhibitors

研究代表者

中島 淳 (NAKASHIMA, Jun)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10167546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：新しいNF B阻害剤は当初アポトーシス誘導能は弱かったがその後の合成薬は膀胱癌(BC)や腎細胞癌(RCC)、前立腺癌(PC)培養細胞株に対して著明な殺細胞効果を示した。免疫・炎症に関与するとされる legumainはPC細胞において発現しており、その存在様式が前立腺癌の悪性度や再発率と関連することが示された。低酸素状態等ではlegumainの発現に変化がなかった。進行性BCや去勢抵抗性前立腺癌、転移性RCCではNLRやサルコペニア、CRPなど炎症マーカーが予後因子であり、表在性BCでは膿尿が膀胱内再発の予測因子であり、泌尿器系癌の増殖、進展に炎症性免疫応答の関与の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Novel NF B inhibitors showed significant cytotoxicity on our cell lines derived from bladder cancer (BC), renal cell cancer (RCC) and prostate cancer (PC). Although some compounds failed to show a significant induction of apoptosis in PC cells, newly developed compounds showed significant cytotoxic effects on DU145 and PC3 cells. The expression of legumain was confirmed at the mRNA and protein levels in our PC cell lines. The immunochemical-staining patterns of legumain in prostatectomy specimens were significantly associated with unfavorable pathology and prognosis. However, hypoxia and so on did not regulate the expression of legumain. Sarcopenia, NLR and CRP were significantly associated with prognosis in patients with invasive BC, CRPC and advanced RCC and pyuria was an independent prognostic factor for intravesical recurrence in patients with superficial BC, which suggest that inflammatory immune response may play a key role in the disease progression in urological malignancies.

研究分野：医学、泌尿器科学

キーワード：urological cancers NFkappaB cytotoxicity inflammation prognosis

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を抱えるわが国においては癌医療の比重は極めて重く、泌尿器系癌の診療の根幹には根治性ととも、治療の侵襲性、QOLの維持が重要な診療指針である。癌の根治性や低侵襲を目指した高度な先進医療の提供と再発、再燃癌におけるQOLを重視した緩和医療は現在の癌医療の両輪である。事実わが国の医療政策において、癌の根治性・予後の改善を目指した専門的かつ集学的治療は癌拠点病院の設置と癌治療認定医制度などによる施策でインフラが充実しつつある。一方では、再発、再燃癌における緩和医療においては癌診療に携わる医師のための緩和ケア研修会などでの教育や緩和ケアチームの結成、在宅医療の充実により、良質な終末期医療の実践や癌の在宅医療が目指されている。進行膀胱癌におけるCDDPに次ぐゲムシタピン、去勢抵抗性前立腺癌に対するドセタキセルなどの新規抗癌剤の登場は泌尿器科の臨床において一定の光明をもたらしたが、その3ヶ月の生存延長効果などには到底満足できるものではなく、現実はおも厳しいといわざるを得ない。また、DICや悪液質などの腫瘍随伴症候群は限られた人生の質を悪化させる。一方これまで我々は、一連の研究により転写因子であるNFκBが進行性泌尿器系癌の増殖・進展や悪液質、腫瘍随伴症候群の病態生理において重要な役割を担っていることを見出してきた。進行癌においては、有効な抗腫瘍効果により癌を克服し、副作用を最小限に抑制することによりこれまでのQOLを保った社会生活を維持し、外来ベースで継続的に長期間にわたって施行できる、患者に優しい新規の次世代の癌医療の開発が国家的施策と相まって求められており、泌尿器科実臨床の場で難治性進行癌に対する包括的な治療戦略の確立が急務である。

2. 研究の目的

NFκBは炎症や免疫に関与する転写因子として知られており、legumainはタンパク質を分解するプロテアーゼとして知られている。Legumainはアスパラギン残基のC末端側を特異的に切断するプロテアーゼとされるが、免疫炎症応答への関与等が示唆されている。本研究では炎症性応答に関与するとされるNFκBやlegumainの泌尿器系癌の病態生理への関与や癌のaggressivenessにおける役割を検討するとともに、それらを標的とした新規治療の可能性を探る。また、進行性前立腺癌や膀胱癌などにおいて、炎症反応の病態生理への関与や予後に及ぼす影響などについても検討する。我々がこれまでNFκB阻害剤であるdehydroxymethylepoxyquinomicin(DHMEQ)に着目してきたが、今回それとは異なった新たに開発した抗炎症剤が泌尿器系癌におけるNFκB活性の阻害などを通じて炎症性免疫応答を制御し、前立腺癌のみならず、膀胱癌、腎癌に至るまで泌尿器系癌における抗腫瘍効果や腫瘍随伴症候群に対する効果を有することを検証し、さらにはアポトーシスの関与など作用機序についても検討する。動物実験において体重減少や貧血などの悪液質の改善など腫瘍随伴症候群の抑止を検討する。新たに開発した抗炎症剤を骨格として新規に誘導体を合成し、スクリーニングにより最も強力な抗腫瘍効果を有する誘導体を選別し、泌尿器系癌に対する新規治療の開発を目指す。

3. 研究の方法

泌尿器系癌由来培養細胞株を用いて、新規NFκB阻害剤などの抗腫瘍効果を測定し、アポトーシスの関与などその作用機序についても検討する。前立腺癌細胞株であるDU145, JCA-1, LNCAP, PC-3、腎癌由来であるKU2, Caki, 膀胱癌細胞株であるKU1, KU7, T24などを96well microplateに10(4)個の細胞

を播種し、24時間 preincubation 行う。新規 NF B 阻害剤 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ M を作用させ経時的に殺細胞効果を測定する。更にはこの新規 NF B 阻害剤を骨格として新たに誘導体を合成し、そのライブラリーの中からより強力な誘導体を in vitro にてスクリーニングする。上記泌尿器系癌樹立細胞を 10(7)個を BALB/c ノードマウス(6週雄)の背部皮下に移植し、腫瘍を認めた時点で薬剤を腹腔内に連日投与する。経時的に腫瘍径や体重を測定する。泌尿器系癌における炎症性免疫応答の病態生理学的意義を検討するため、去勢抵抗性前立腺癌や進行性膀胱癌、転移性腎癌において炎症マーカーである neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR)や CRP ならびに sarcopenia の臨床的意義を検討する。Sarcopenia は CT scan にて L3 レベルでの筋肉の範囲を SYNAPSE VINCENT を用いて測定しそれを身長²で除した skeletal muscle index (SMI)を計算し sarcopenia を判定する。legumain の実験では RNA を型のごとく抽出し、20 ng の cDNA を含んだ total PCR volume 20 microL を検体として、legumain の primer を用いて、legumain の発現を測定する。また、抽出した蛋白 20 μ g を goat anti-human legumain antibody を用いた Western blot により legumain の蛋白発現も検討する。また低酸素刺激下などで legumain の発現の変化を調べる。免疫組織化学的手法を用いて前立腺摘除検体における legumain の染色態度や局在と臨床所見との関連性を検討する。

4 . 研究成果

本研究では、泌尿器系癌における免疫・炎症性応答の重要性を解明するとともに治療への応用を目指している。前立腺癌における legumain の発現を蛋白レベルならびに mRNA で検討したところ、ともに前立腺癌由来培養細胞である LNCap, PC3, DU-145, C4-2 において発現していることが示された。前立腺組織

における legumain の局在を免疫組織化学的に検討したところ、前立腺の癌部ならびに非癌部ともに legumain の局在が認められたが、非癌部では腺空に向かって vesicular pattern を示すのに対して癌部では vesicular pattern もしくは diffuse pattern で cytoplasm 全体に存在が認められた。Vesicular pattern を示す症例では diffuse cytoplasmic pattern を示す症例に比べて病理学的病期、Gleason score, などが進行しており、腫瘍径が大きく、5年非生化学的再発率 (52% vs 79%) は有意に低かった。これらの結果は免疫炎症応答に関与していると最近示唆されている legumain の存在様式が前立腺癌の invasiveness や aggressiveness に関与していることを示唆するものと考えられる。一方、PSA など術前因子と legumain の発現 pattern との間に関連性は認められなかった。低酸素などの刺激下に legumain の発現増強を検討したが低酸素下で発現の増強などは認められず、低酸素条件や TNF, LPS などの刺激下での実験が望まれる。

我々が今回開発した NF B 阻害剤のひとつを in vitro にて濃度 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ M で 48 時間、膀胱癌培養細胞株である KU-1 細胞に作用させたところ生存率は 99.2%, 85.2%, 37.5%, 19.4%, 19.6%, 19.6% であり、KU19-19 細胞では 69.4%, 69%, 41.3%, 10.9%, 10.2%, 10.6% であり膀胱癌細胞において濃度依存性に細胞障害が認められた。腎癌培養細胞株である KU-2 細胞において生存率はそれぞれ 85.2%, 54.2%, 15.3%, 10.7%, 10.9%, 11.2% であり、KU19-20 細胞では 79.9%, 70.3%, 33.4%, 13.4%, 12.7%, 12.7%, Renca 細胞では 98%, 73.9%, 27.2%, 24.4%, 24.3%, 24.6% であり、同様に濃度依存性に生存率が低下した。また、6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ M の濃度で前立腺癌培養細胞株である PC3 細胞に作用させたところ、細胞の生存率はそれぞれ 93.8%, 96.1%, 48.2%, 15.8%, 15.0%, 15.6% と濃度依存性に生存率が低下し、

DU145細胞では85.3%、89.3%、66.4%、15.5%、15.1%、15.1%であり、同様の結果であった。その後、これまでの薬剤に改良を加えた新規阻害剤の50 μM以下でのPC3細胞に対する抗腫瘍効果は50%以下であり、APO-BRDU Kitを用いたアポトーシス検出も5%と低値であった。さらに4番目ならびに5番目、6番目に改良を加えた新規阻害剤を6.25, 12.5, 25, 50 μM濃度でJCA1に作用させたところ、生存率はそれぞれ111%, 97%, 67%, 89%ならびに112%, 99%, 86%, 105%、そして92%, 93%, 71%, 19%であり後者に有意な殺細胞効果が認められた。DU145細胞10(7)個をヌードマウスに移植し、腫瘍を認めた時点で新規NFκB阻害剤を腹腔内に投与し、経時的に体重を測定したところ、7週目の体重はコントロール群では30.24±0.61g、8mg/kg注射群で31.54±1.27gであり、コントロール群の方が低値ではあるものの7週目では有意な差を認めなかった。我々は前立腺癌の病態生理において炎症性サイトカインであるIL-6が関与しており、IL-6が進行性前立腺癌の予後と関連していることを見出しており、また血清CRPがIL-6により制御されていることが知られている。Docetaxel治療が施行された去勢抵抗性前立腺癌患者においてPSAが50%以上低下（PSA response）する症例は予後が良好であり、PSA responseを示す症例は有意に血清CRPが低値であり、血清CRPが上昇している症例ならびにNLRが上昇している症例では有意に予後が不良であることを見出した。さらには多変量解析により貧血や疼痛の存在、performance statusの低下とともにCRPとNLRが独立した予後因子であることも示された。それらを組み合わせて予後の層別化が可能であった。さらには非筋層浸潤膀胱癌において、膿尿が237例のうち116例（49%）に認められ、年齢、細胞診陽性、多発性、腫瘍の大きさ、形態、病理学的Gradeなどと有意な関連性を示し、さらには膿尿を示す症例は有意に再発率が高かった。これら

は炎症性反応と前立腺癌や膀胱癌の aggressivenessとの関連を示唆するものと考えられる。我々は以前より泌尿器系癌において悪液質が炎症性免疫応答と関連し、予後不良と直結する症候であることを見出しているが、骨格筋の著明な減少を示すサルコペニアは癌悪液質の中でも重要な症候であると考えている。進行性膀胱癌において、CT scanにてskeletal muscle index (SMI)をより正確に客観的に測定したところ、サルコペニア群では約41%死亡したのに対して非サルコペニア群では20%であり、前者で有意に癌特異的生存期間が短かった。既存の予後因子を含めた多変量解析にてサルコペニアは臨床病期、NLRとともに有意な予後因子であり、それらを用いて術前の予後予測ノモグラムを構築した。さらには転移性腎細胞癌においてもNLRが予後因子であることが示された。これらの結果は進行性泌尿器系癌において炎症性反応が予後と深く関連していることを示すものである。

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 11件)

- 1 . Satake N, Ohno Y, Nakashima J, Ohori M, Tachibana M. Prognostic value of preoperative pyuria in patients with non-muscle-invasive bladder cancer. Int J Urol. 査読有 2015;22(7):645-9
- 2 . Hamada R, Nakashima J, Ohori M, Ohno Y, Komori O, Yoshioka K, Tachibana M. Preoperative predictive factors and further risk stratification of biochemical recurrence in clinically localized high-risk prostate cancer. Int J Clin Oncol. 査読有 2015 Nov 19. [Epub ahead of print] DOI

10.1007/s10147-015-0923-3

- 3 . Hashimoto T, Ohno Y, Nakashima J, Gondo T, Nakagami Y, Namiki K, Horiguchi Y, Yoshioka K, Ohori M, Tachibana M. Prediction of renal function after nephroureterectomy in patients with upper tract urothelial carcinoma. Jpn J Clin Oncol. 査読有 2015 ;45(11):1064-
- 4 . Hashimoto T, Nakashima J, Inoue R, Gondo T, Ohno Y, Tachibana M. Prognostic implication of infiltrative growth pattern and establishment of novel risk stratification model for survival in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. Int J Clin Oncol. 査読有 2014 ;19(2):373-8.
- 5 . Ohno Y, Nakashima J, Ohori M, Tanaka A, Hashimoto T, Gondo T, Hatano T, Tachibana M. Clinical variables for predicting metastatic renal cell carcinoma patients who might not benefit from cytoreductive nephrectomy: neutrophil-to-lymphocyte ratio and performance status. Int J Clin Oncol. 査読有 2014 ;19(1):139-45
- 6 . Ohno Y, Nakashima J, Izumi M, Ohori M, Hashimoto T, Tachibana M. Association of legumain expression pattern with prostate cancer invasiveness and aggressiveness. World J Urol. 査読有 2013;31(2):359-64
- 7 . Hashimoto T, Ohno Y, Nakashima J, Gondo T, Ohori M, Tachibana M. Clinical significance of preoperative peripheral blood neutrophil count in patients with non-metastatic upper urinary tract carcinoma. World J Urol. 査読有 2013; 31(4):953-8.

〔学会発表〕(計 10件)

1. Yosuke Hirasawa, Jun Nakashima, Tatsuo Gondo, Yuto Shimizu, Naoto Tokuyama, Shimodaira Kenji, Yoshihiro Nakagami, Yutaka Horiguchi, Yoshio Ohno, Kazunori Namiki, Makoto Ohori, and Masaaki Tachibana. Sarcopenia as a novel preoperative prognostic predictor for survival in patients with bladder cancer undergoing radical cystectomy, European Association of Urology (EAU) annual congress, 2016. 3. 11-3. 15 Munich, Germany
2. Yoshihiro Nakagami, Jun Nakashima, Yoshio Ohno, Ohori Makoto, Masaaki Tachibana. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and establishment of novel risk stratification model in castration-resistant prostate cancer patients treated with docetaxel chemotherapy American Urological Association annual meeting 2015/5/15 ~ 19 New Orleans, LA, USA
3. Tatsuo Gondo, Jun Nakashima, Rie Inoue, Takeshi Hashimoto, Yoshio Ohno, Makoto Ohori, Toshitaka Nagao, Masaaki Tachibana Clinical value of immunohistochemically detected lymphovascular invasion in transurethral bladder tumor resection specimen for bladder cancer staging before radical cystectomy American Urological Association annual meeting 2015/ 5/15 ~ 19 New Orleans, LA, USA

4. Yoshio Ohno, Jun Nakashima,
Makoto Ohori, Naoya Satake,
Tatsuo Gondo, Yoshihiro
Nakagami, Masaaki Tachibana
Clinical significance of nutritional
prognostic index in patients with
clear cell renal cell carcinoma
American Urological Association
annual meeting 2015 /5/15 ~ 19
New Orleans, LA, USA
5. 黄和吉、中島淳、中神義弘、大堀
理、大野芳正、堀口裕、並木一典、
吉岡邦彦、橘政昭 去勢抵抗前立
腺癌に対しドセタキセル治療を施
行した症例の PSA 値の変化と臨床
所見の比較検討 第 102 回日本泌
尿器科学会総会 2014 年 4 月 24
日から 27 日 神戸
6. 中神義弘、中島淳、黄和吉、橋本剛、佐
竹直哉、濱田理宇、大野芳正、堀口裕、
並木一典、吉岡邦彦、大堀理、橘政昭 去
勢抵抗性前立腺癌に対するドセタキセル
療法における予後因子の検討 第 51 回
日本癌治療学会 京都
2013/10/24-10/26
7. Ohno Y., Nakashima J., Nakagami Y,
Satake N, Hamada R, Hashimoto T.,
Takizawa I, Sawada Y, Hatano T,
Tachibana M. Gender-Related
Differences in the Prognostic Value of
Body Mass Index in Patients with Renal
Cell Carcinoma 33rd Congress of The
Societe Internationale D`Urologie
Vancouver Canada 2013/9/10

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中島 淳 (NAKASHIMA Jun)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 10167546

(2)研究分担者

橘 政昭 (TACHIBANA Masaaki)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 70129526

大野 芳正 (OHNO Yoshio)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 40266482

堀口 裕 (HORIGUCHI Yutaka)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 60229234

橋本 剛 (HASHIMOTO TAKESHI)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 10421033

権藤 立男 (GONDO Tatsuo)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 90408097

平澤 陽介 (HIRASAWA Yosuke)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 10725310