

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861454

研究課題名(和文) CD44を標的とした尿路上皮癌に対する新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) New therapeutic strategy targeting CD44 against urothelial cancer

研究代表者

萩原 正幸 (Hagiwara, Masayuki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70464922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：上部尿路上皮癌に対し手術が行われた症例の検体を対象としCD44vの免疫染色を行った結果、CD44v陽性が独立した術後の予後因子であった。CD44vの発現を有する尿路上皮癌細胞株T24は糖尿病治療薬メトホルミン投与に伴うcell viabilityの有意な減少を認めた。メトホルミンとCDDPの併用によるT24に対する殺細胞効果は単剤と比較し、有意に大きかった。フローサイトメトリーにおいてCD44v陽性細胞の割合がメトホルミン併用に伴い低下した。T24皮下腫瘍モデルを用いてメトホルミン、CDDPとそれらの併用による抗腫瘍効果を確認した結果、腫瘍径が併用群では有意な腫瘍増大の抑制を認めた。

研究成果の概要(英文)：We examined the immunohistochemical expression of CD44v in urothelial cancer (UC) and analyzed its clinical significance in patients treated with nephroureterectomy for invasive UC. Multivariate analysis showed that CD44v expression was the independent risk factors for cancer-specific mortality. Metformin markedly reduced the viability of the highly CD44v-expressing T24 cells in a dose-dependent manner. Cell growth inhibition was significantly higher in the combination therapy compared to metformin or cisplatin alone in T24 cells. Flow cytometry revealed that metformin selectively reduced the proportion of highly CD44v-expressing tumor cells. Combination therapy showed marked suppression of tumor growth compared with control, and metformin and CDDP monotherapy groups in xenograft model.

研究分野：尿路上皮癌

キーワード：尿路上皮癌 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

進行・転移性尿路上皮癌における化学療法はシスプラチン(CDDP)を中心とした多剤併用化学療法が広く使用されているが、その効果は一時的であり、その後治療抵抗性を有する症例が多い。放射線療法や抗癌剤の多くは癌細胞に活性酸素(ROS)を発生させることにより、抗腫瘍効果を示すことで知られているが、癌組織中に数%程度存在し、自己複製能を持ち、異なる分化段階の細胞を産生する能力を有する癌幹細胞は、同じ癌組織中に存在するその他の癌細胞よりも、ROSの除去能が高く、既存の化学療法や放射線治療に対し、抵抗性を持つことが近年、乳癌において報告され、再発や転移の原因となると考えられている。乳癌、膵臓癌、胃癌など様々な固形癌においてCD44が癌幹細胞における主要な表面マーカーの一つであることが報告されている。尿路上皮癌においても、これまでCD44の発現が再発や予後などの臨床経過との関連についての報告は散見され、慶應義塾大学病院で施行した腎盂尿管癌の臨床摘出検体を用いた免疫組織学的染色による統計学的検討の結果も、CD44発現が予後に影響する結果であったが、尿路上皮癌におけるCD44の機能や発現機序について確認し言及した報告はこれまでにない。

最近、Ishimotoらの報告で消化器癌においてCD44のバリエーションアイソフォーム(CD44v)が癌細胞のROSに対する抵抗性を亢進する機能を持ち、癌の治療抵抗性に寄与することが分かった。CDDPのようなROSを大量に癌細胞に暴露させるような抗癌剤をもってしても生着し続ける尿路上皮癌が存在する背景にもCD44によって制御されるROSへの抵抗性の存在が関与していることが予想される。CD44は癌細胞が抗癌剤に対して抵抗性を示す一つのメカニズムと考えられ、CD44の発現を有する癌細胞に対する治療が尿路上皮癌における新しい治療戦略の確立につながると考える。

2. 研究の目的

様々な癌において治療標的としてCD44が注目をされる中、未だにCD44陽性癌細胞を特異的に標的とする薬剤は開発されていない。しかし近年、2型糖尿病に対する経口糖尿病治療薬として使用されているMetforminが乳癌における癌幹細胞(CD44+/CD24-)に対し、より強い抗腫瘍効果を示すことが報告され、今回、我々はCD44発現の尿路上皮癌細胞を標的とした治療戦略を立てる上で、Metforminに着目した。

3. 研究の方法

(1)ヒト膀胱癌細胞株T24を用いてMetformin投与による抗腫瘍効果および細胞表面マーカーの発現の検討

T24における細胞表面マーカーCD44vについてWestern Blot法およびフローサイトメトリーにより確認。

WST cell viability assayを用いてT24およびT24PRに対するMetforminの抗腫瘍効果を評価する。

Metformin投与に伴うで、細胞表面マーカーCD44vをWestern Blot法およびフローサイトメトリーにより評価する。

(2) マウス皮下腫瘍モデルを用いたMetforminの抗腫瘍効果の検討

ヒト膀胱癌細胞株T24を用いてMetforminの抗腫瘍効果を確認。

皮下腫瘍モデルを下記の通り4群に分ける。

- 1) コントロール
- 2) Metformin投与群
- 3) CDDP投与群
- 4) Metformin + CDDP併用投与群

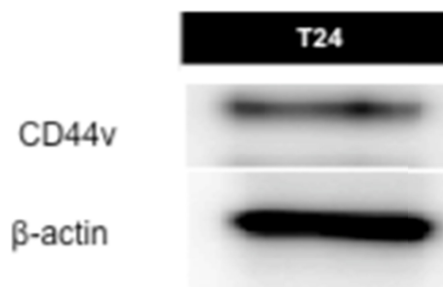
体重および腫瘍体積をプロットし、4群間での腫瘍増大速度を比較し、Metforminの抗腫瘍効果、CDDP併用時の相乗効果について評価する。

皮下腫瘍検体から蛋白を抽出し、CD44vの発現の変化についてWestern Blot法を用いて検討する。

4. 研究成果

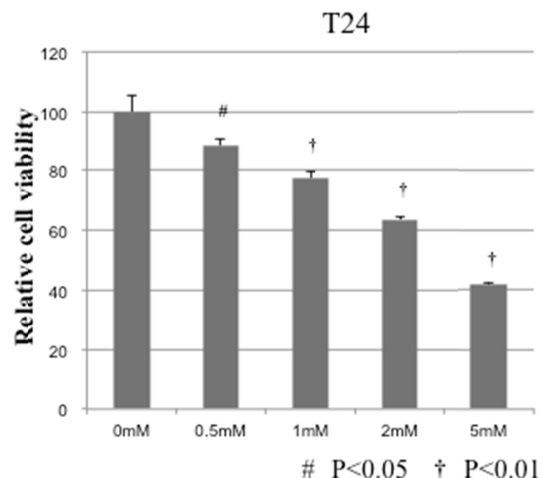
(1) Western Blot法

ヒト膀胱癌細胞株T24においてCD44vの発現を確認した。

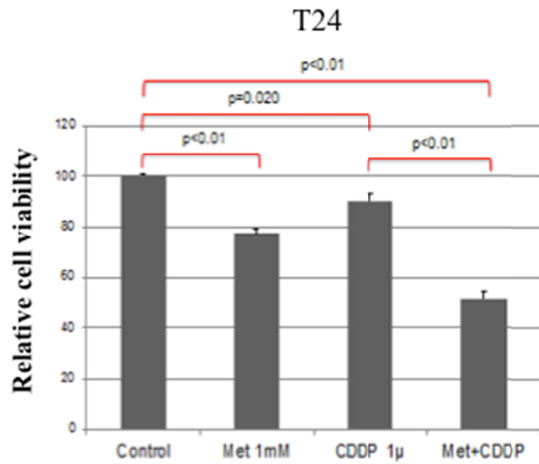


(2) WST cell viability assay

T24においてMetformin投与に伴う有意な殺細胞効果を認めた。

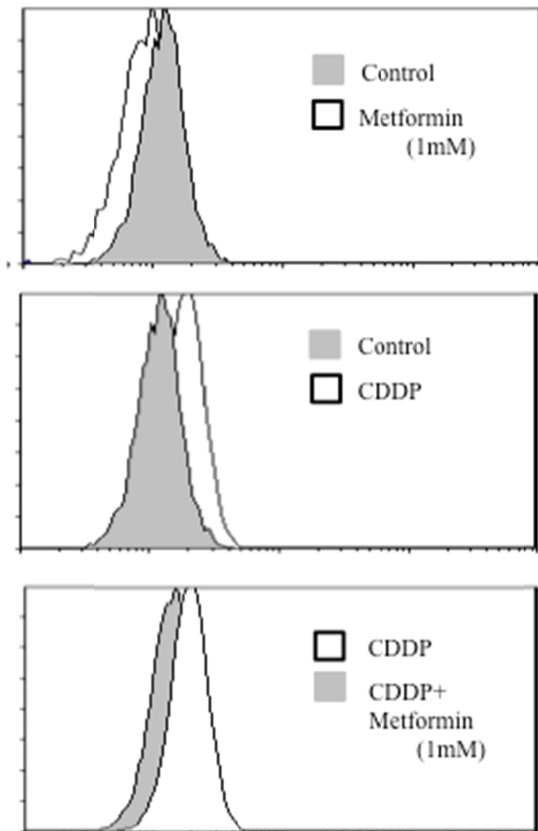


(3) T24においてMetformin+シスプラチンの併用による相乗効果を認めた。



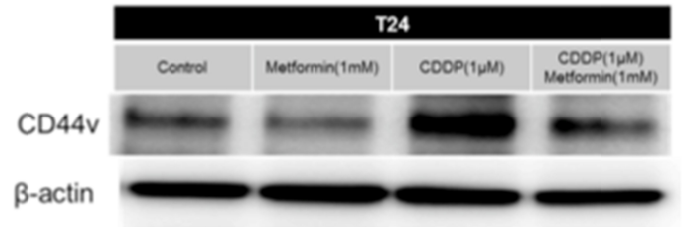
(4) Flow cytometry

Metformin 投与によりCD44v 陽性細胞の割合は減少することを確認した。一方、CDDP 投与により CD44v 陽性細胞の割合は増加認め、Metformin 併用によりその割合は低下した。

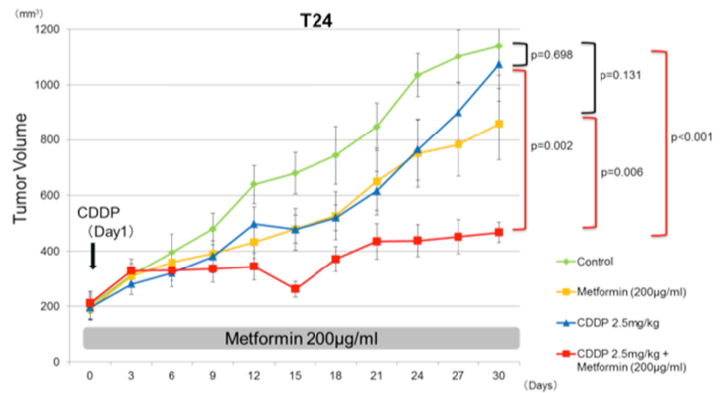


(5) Western Blot 法

Metformin およびシスプラチン投与により Flow cytometry と同様な CD44v 発現の変化を確認した。

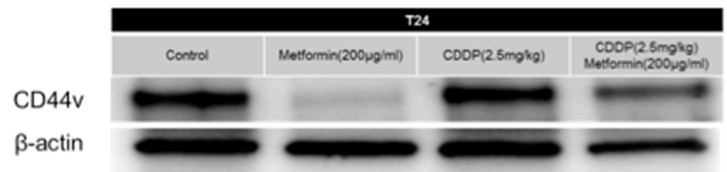


(6) マウス皮下腫瘍モデルを用いた Metformin の抗腫瘍効果



(7) Western Blot 法

皮下腫瘍から抽出した蛋白中の CD44v 発現の変化を確認した結果、Vitro での結果と同様の結果であることを確認した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 萩原 正幸, 「尿路上皮癌における CD44v の予後との関連およびメトホルミンを用いた CD44v 制御による治療効果の検証」、日本泌尿器科学会総会、2015 年 4 月 18 日、ANA クラウンプラザ ホテル金沢(石川県金沢市)
- (2) Masayuki Hagiwara, 「Metformin is a new therapeutic strategy for targeting CD44 variant in bladder cancer」、AUA annual meeting、2014 年 5 月 18 日、Orland, USA
- (3) 萩原 正幸, 「Metformin in combination with cisplatin inhibits bladder cancer in vitro and in vivo xenograft」、日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- (4) 萩原 正幸, 「膀胱癌細胞に対する経口 2 型糖尿病治療薬メトホルミンの殺細胞効果の検討」、日本がん分子標的治療学会学術集会、2013 年 6 月 13 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 正幸(HAGIWARA MASAYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号:70464922