

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 4 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861289

研究課題名(和文) がん幹細胞と上皮間葉転換による膀胱上皮内癌のBCG療法抵抗性の解明

研究課題名(英文) The number of cancer stem cell contribute BCG resistance of the urinary CIS

研究代表者

井上 剛志 (Inoue, Takeshi)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30719539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：1) in vitro T24においてはSOX2、OCT3/4、Nanog、TWISTの発現はBCG処理後に低下した。コロニー形成細胞数はUMUC3で著明に多かった。また、SOX2、OCT3/4をノックアウトしてBCG処理を行うと両細胞で著明な抗腫瘍効果を認めた。BCG抵抗性はがん幹細胞数により規定されることが示された。2) in vivo上皮内癌30例を対象とした免疫染色では、SOX2、OCT3/4、Nanog、Snailの発現はBCG抵抗性を示した9例と奏効した21例に有意差を認めなかった。一方、DNAメチル化解析ではSOX2とOCT3/4のDNAメチル化は抵抗例で有意に低かった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish the molecular markers which enables to diagnose the BCG resistant CIS of the bladder, that is focused on cancer stem cell markers or EMT markers. Our in vitro study revealed the number of stem cell marker positive cells prescribed the BCG resistance. On the other hands, in vivo study, we could not find the correlations between BCG resistance and the number of cells which were positive for stem cell markers. However, DNA methylation level of the stem cell genes were significantly low in the BCG resistant cases. These result showed that DNA methylation regulate the expression of stem cell genes.

研究分野：がん幹細胞

キーワード：膀胱癌 上皮内癌 がん幹細胞 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

1)膀胱上皮内癌と遺伝子異常

膀胱上皮内癌に対する標準的な初期治療はBCGの膀胱内注入療法であり、約70%の完全奏効率と約40%の5年非再発率が報告されている。一方、BCG治療後の高頻度再発例やBCG不応例は筋層浸潤癌に移行し、予後不良となる為、BCG療法抵抗症例を早期に見極め、適切な時期で膀胱全摘除術を施行することが必要である。尿路上皮癌多段階発癌過程に生じる遺伝子変化は比較的明確になっている。非筋層浸潤癌でFGFR3点突然変異を有する癌は予後良好であり、第9染色体欠失あるいはTP53変異を有する癌は浸潤癌に移行することが報告されており、これらの遺伝子変化は非筋層浸潤癌の治療において予後予測マーカーとして有用である。しかし、上皮内癌は非筋層浸潤癌でありながら、第9染色体欠失やTP53変異など筋層浸潤癌の形質を有する場合が多いとされてはいるが、上皮内癌の発生、進展に關与する遺伝子変化は明らかになっていない。この原因として、1)上皮内癌は内視鏡で診断することが困難な場合があり、分子生物学的検索の為の試料採取が困難である、2)臨床的には単独発生あるいは隆起性病変に随伴する上皮内癌が存在し、様々な経過をたどり、治療法も経過により変化する為、上皮内癌としての自然史の評価が困難であることが挙げられる。したがって、現時点で、上皮内癌の予後や、BCG療法抵抗性を予測する臨床病理学的因子も存在しない。

2)がん幹細胞、上皮間葉転換と抗癌剤耐性

近年、さまざまな癌種において、抗癌剤耐性や浸潤・転移能の獲得など、癌細胞の形質転換を説明する概念としてがん幹細胞の存在が注目されている。がん幹細胞は未分化性を維持しつつ自己複製能と多分化能を有し、環境の変化に対して癌組織を維持させる役割を担うと考えられている。一方、上皮細胞が炎症、低酸素、酸化ストレス等の環境の変化によって間葉系細胞様に性質が変化し、組織を動的に再構築する過程は上皮間葉転換(EMT)として知られている。癌組織においてはEMT誘導シグナルが増強し、細胞遊走能亢進や足場非依存性細胞増殖を生じ、癌の浸潤・転移を引き起こす機序の一つとして研究が行われてきた。最近の研究ではEMT誘導細胞とがん幹細胞は酷似した遺伝子発現プロファイルを示し、それぞれの維持に關与するシグナル経路も共通であることから、EMTが生じて浸潤転移能が高くなった細胞と転移形成の原因となるがん幹細胞が同一であると考えられている(図1)。

膀胱上皮内癌における分子生物学的な特徴として、プロモータ領域のDNAメチル化異常により細胞間接着因子であるE-Cadherinの発現が低下することが挙げら

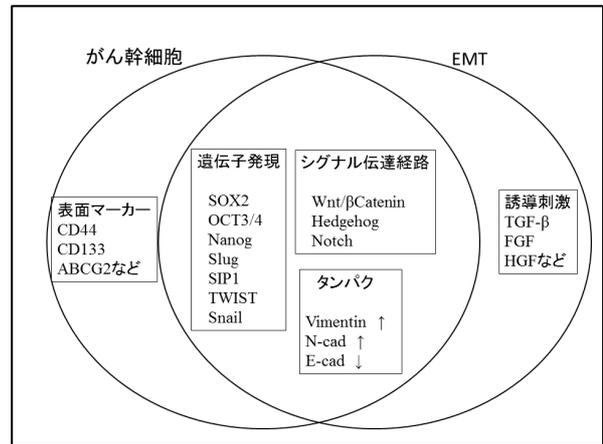


図1. がん幹細胞とEMTのマーカー

れる。E-cadherinの発現低下はEMTを起こした細胞にもっとも特徴的な遺伝子変化であり、がん幹細胞にも生じ得る(図1)。この遺伝子異常のため、上皮内癌細胞は尿中に剥離しやすく、尿細胞診で高頻度に検出されるという臨床的な知見と合致する。以上の知見より、申請者は膀胱上皮内癌のBCG療法抵抗性の機序として、がん幹細胞あるいはEMTが關与するという仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

先行研究として、膀胱上皮内癌に対しBCG療法を施行した症例を対象とし、奏功群(n=20)と治療抵抗群(BCG不応または1年以内の再発症例、n=20)で臨床病理学的因子とがん幹細胞マーカー(OCT3/4)、EMTマーカー(Vimentin、E-Cadherin)の発現について比較検討を行った(表1)。

因子	オッズ比	P値
性別(男性/女性)	0.688	0.667
年齢(75歳以下/76歳以上)	1.074	0.081
原発性/随伴性	1.600	0.420
初発/再発	1.233	0.683
上部尿路癌の有無	1.571	0.530
OCT3/4の発現	4.538	0.002*
Vimentinの発現	1.817	0.029*
E-Cadherinの発現	0.487	0.023*

表1 BCG療法抵抗性と臨床病理学的因子

各マーカーの発現はBCG療法施行前のパラフィン切片を用いた免疫染色によりスコア化して評価した。この結果、臨床病理学的因子は各群間に有意差を認めなかったが、OCT3/4、Vimentinの発現上昇とE-Cadherinの発現低下が有意にBCG療法抵抗性と相関した(表1)。すなわち、がん幹細胞マーカー(OCT3/4)を発現し、EMT形質

(Vimentin 発現上昇、E-Cadherin 発現低下)を示す上皮内癌は BCG 療法抵抗性であることが明らかになった。上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究ではまだ解明されていない BCG 療法抵抗性とがん幹細胞、EMT の関連を明らかにし、膀胱上皮ない癌における BCG 療法抵抗性を予測するマーカーを臨床応用するためにその基盤となる研究を行う。

膀胱上皮内癌の 70%の症例は BCG が奏効する。BCG 療法抵抗性を示す膀胱上皮内癌に対する治療は膀胱全摘除術であるが、膀胱全摘除術は患者の QOL を著しく低下させてしまう。初発時には奏効していたがその後は BCG 療法抵抗性を示すような症例も多々ある。このような理由から膀胱全摘除術のタイミングを決定することは困難な場合が多々ある。また BCG 療法自体も稀に重篤な尿路感染症を引き起こす場合もあり、BCG 療法抵抗性が予測できるのであれば BCG 療法を回避して膀胱全摘除術を第一選択として行うことも可能である。しかし現在、BCG 療法抵抗性を予測するマーカーはないので、本研究によってマーカーを確立できれば、予後予測の根拠をもって膀胱上皮内癌の治療を行うことが可能である。

### 3. 研究の方法

本研究はがん幹細胞、EMT が膀胱上皮内癌の BCG 療法抵抗性の獲得にどのように関与するかを遺伝子、エピジェネティクスの観点から明らかにし、DNA メチル化を指標とした BCG 療法抵抗性を鑑別する尿中マーカーの確立を目指す。下記の手順で研究を進める。

1) BCG 処理による膀胱癌細胞のがん幹細胞および EMT 関連遺伝子群の変化とがん幹細胞の抽出：In vitro の系で膀胱癌細胞株に BCG 処理し、細胞増殖能とがん幹細胞および EMT 関連遺伝子群の変化を比較検討する。解析対象の細胞株は T24(高悪性癌)と UMUC3(EMT 形質を有する)とする。申請者の先行研究では、T24 は BCG 処理により濃度、処理時間依存性に細胞増殖が抑制されたが、UMUC3 は BCG 短時間処理(1 時間)では高濃度でも細胞増殖が抑制されないことが明らかになった。また、UMUC3 においては BCG 長時間処理(72 時間)ではがん幹細胞のマーカーである OCT3/4 と SOX2 の相対発現が未処理に比べて増加した。この結果は BCG 処理によりがん幹細胞以外の細胞は死滅するが、がん幹細胞マーカーを発現する細胞は治療抵抗性となることを示している。本検討では、図 1 に示す遺伝子群について BCG 処理前後の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で定量し、BCG 処理後に発現上昇を認める遺伝子群を治療抵抗性の原因遺伝子として選出する。また、BCG 処理後に残存する細胞をスフェロイドコロニー

法で培養し、膀胱癌細胞のがん幹細胞として抽出する。

2) がん幹細胞、EMT 関連遺伝子群の変化による膀胱癌細胞増殖能と BCG 療法抵抗性の変化(in vitro, in vivo での検討)：1)で BCG 療法抵抗性の原因遺伝子として選出した遺伝子について、cDNA トランスフェクションによる遺伝子導入と siRNA によるノックダウンで遺伝子発現を変化させ、膀胱癌細胞の増殖能の変化、BCG 処理に対する増殖能の変化を観察する。本検討は in vitro とヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いた in vivo の両方で行う。また、1)で抽出したがん幹細胞についても同様の実験を in vitro, in vivo の系で行い、膀胱癌細胞株と比較する。本検討により、1)で選出した遺伝子群が腫瘍増殖能と BCG 療法抵抗性を示す因子となるかどうか、BCG 処理後に残存した細胞のがん幹細胞の性質を有するかどうかを明らかになり、1)のさらなる検証研究となる。

3) 臨床試料を用いた後ろ向き研究による予後予測の検証研究：申請者の所属する奈良県立医大泌尿器科で採取した尿路上皮癌試料で上皮内癌を有する症例を対象とし、上記 1)2)で同定した遺伝子群の発現と BCG 療法抵抗性を比較検討する。遺伝子発現はパラフィン切片を用いた免疫染色法とレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションを用いて上皮内癌より抽出した RNA を用いたリアルタイム PCR 法により解析する。当科では本学医の倫理委員会の承認の下、平成 22 年 7 月より尿路上皮癌手術(TUR-BT)施行時に血液、尿、癌組織と定期的外来受診時の尿の試料採取を行っている。本検討はこれまで採取した試料を対象とする為、速やかに解析に着手でき、

容易に BCG 抵抗性との比較検討ができる。

4) がん幹細胞、EMT 関連遺伝子異常を尿中から検出する定量系の確立：本検討は 1)2)3)で明らかとなる BCG 療法抵抗性に関与する遺伝子異常を尿中から検出し、臨床応用に向けた定量系の確立を目的とする。

尿試料は侵襲なく採取でき、上皮内癌においては癌細胞が尿中に剥離しやすい為、癌に生じる遺伝子変化を検出する試料として優れている。しかし、尿中剥離細胞は微量であり、尿による変性を受ける為、遺伝子変異を的確に検出するのは困難であった。一方、DNA メチル化の検出は尿試料においても簡便、安定して行え、カットオフ値を用いた定量解析により高感度、高特異度で膀胱癌診断が可能である(Chihara et al. BMC Cancer 2013)。また、がん幹細胞、EMT 関連遺伝子群は DNA メチル化等のエピジェネティクスにより発現が変化することが知られており、これらの発現異常を DNA メチル化異常として検出可能である。本検討では膀胱癌細胞株と 3)で対象とした癌組織を用い、がん幹細胞、EMT 関連遺伝子群の発現と DNA メチル化を比較検討し、遺伝子発現異常が DNA メチ

ル化異常に反映される遺伝子群を選出する。DNA メチル化解析はパイロシーケンス法を用いる。さらに上皮内癌症例の手術時の尿と経日の尿を対象とし、前向き、後ろ向きに BCG 療法抵抗性との比較検討を行う。

#### 4. 研究成果

(平成 26 年度)

膀胱上皮内癌の臨床試料(パラフィンブロック)を用いて、幹細胞マーカー(SOX2、OCT3/4、Nanog、Snail)の発現と BCG 治療抵抗性の有無を免疫染色により検討した。1)免疫染色の評価は Allred score を用いた。膀胱上皮内癌 30 例の検討では全症例で、SOX2、OCT3/4、Nanog、Snail の発現は 2-4 点であり、BCG 抵抗性を示した 9 例と、BCG が奏効した 21 例に有意差を認めなかった。2)一方、腫瘍組織から抽出した DNA を用いた DNA メチル化定量解析では、BCG 抵抗例と奏効例で、SOX2 と OCT3/4 の DNA メチル化レベルは BCG 抵抗例で有意に低かった。一方、Nanog と Snail の DNA メチル化レベルには有意差を認めなかった。3)さらに、H3K9m3(DNA ヒストン H3、9 番目のリジンのトリメチル化)の発現を免疫染色にて上記 2 群で比較すると、BCG 抵抗症例では有意に発現が低下していた。これらの結果より、膀胱上皮内癌において、幹細胞マーカーの発現に差は認めなかったが、幹細胞遺伝子発現を促進するエピジェネティック機構が BCG 抵抗例においては正の方向に相関することが示された。一方、上皮間葉転換に関与する遺伝子群はタンパクレベルの発現においても、エピジェネティック遺伝子発現制御機構においても膀胱上皮内癌の BCG 抵抗性のマーカーとして有用でない可能性が示唆された。

(平成 27 年度)

1)BCG 処理によるがん幹細胞および EMT 関連遺伝子群の変化:膀胱癌細胞株 T24(高悪性癌)と UMUC3(EMT 形質)を対象とし、BCG 時間処理後の遺伝子発現を検討した。T24 においては、SOX2、OCT3/4、Nanog、SIP1、TWIST、Snail の発現は BCG 処理後に低下した。UMUC3 においては SOX2、OCT3/4、Nanog、Snnail の発現が上昇した。UMUC3 は T24 と比較し、BCG に対する抵抗性を示すため、BCG 処理後に発現が上昇する遺伝子群から、がん幹細胞の絶対数が多いことが類推される。BCG 処理後に残存する細胞をスフェロイドコロニー法で再培養を行ったところ、コロニー形成細胞は UMUC3 で著明に多かった。しかし、これらの細胞の絶対数が少ないことから、遺伝子発現定量に十分な RNA の抽出は困難であり、上記遺伝子群の発現を直接検討することはできなかった。

2)がん幹細胞、EMT 関連遺伝子群の発現変化と BCG 抵抗性の検討: siRNA を用いて SOX2、

OCT3/4 をノックアウトし、BCG 処理を行うと、T24、UMUC3 の両細胞株で著明な抗腫瘍効果を認めた。この抗腫瘍効果は細胞株による差はなく、BCG72 時間処理ではほぼ死滅した。したがって、がん幹細胞抑制による抗腫瘍効果であるかどうかは確認できなかった。

(平成 28 年度)

##### 1) *in vitro* での検討

膀胱癌細胞株 T24(抗悪性度)と UMUC3(EMT 形質)を対象とし、BCG 処理後のがん幹細胞、EMT 関連遺伝子群の発現を検討した。T24 においては SOX2、OCT3/4、Nanog、TWIST、Snail の発現は BCG 処理後に低下した。UMUC3 においては SOX2、OCT3/4、Snail の発現が上昇した。BCG 処理後に残存する細胞をスフェロイドコロニー法で再培養を行ったところ、コロニー形成細胞数は UMUC3 で著明に多かった。また、siRNA を用いて SOX2、OCT3/4 をノックアウトして BCG 処理を行うと両細胞株で著明な抗腫瘍効果を認めた。これらの結果より BCG は EMT 形質の細胞により抗腫瘍効果をもたらすが、BCG 抵抗性はがん幹細胞数により規定されることが示された。

##### 2) *in vivo* での検討

膀胱上皮内癌のパラフィンブロックを用いて幹細胞マーカーの発現と BCG 治療抵抗性の比較検討を行った。30 例を対象とした免疫染色では、SOX2、OCT3/4、Nanog、Snail の発現は BCG 抵抗性を示した 9 例と奏効した 21 例に有意差を認めなかった。一方、腫瘍組織の DNA を用いた上記遺伝子の DNA メチル化解析では SOX2 と OCT3/4 の DNA メチル化レベルは抵抗例で有意に低かった。しかしながら、同一症例尿中剥離細胞で同様の解析を行うと、メチル化レベルに有意差は認めなかった。

上記結果より、がん幹細胞数と発現は BCG 抵抗性のマーカーとなり得るが、尿からの検出は困難であった。

#### 5. 主な発表論文等

該当事項なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井上剛士 (Inoue Takeshi)  
奈良県立医科大学・泌尿器科・助教  
研究者番号 30719539