

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861294

研究課題名(和文) アポトーシスマーカーをターゲットとした尿路上皮癌細胞株での治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of the treatment strategy in the urothelial carcinoma cell lines which targeted the apoptotic marker.

研究代表者

吉峰 俊輔 (Yoshimine, Shunsuke)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：70445245

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)：アポトーシス関連タンパクBcl-2/Bcl-xL に対する阻害剤であるABT-737は、尿路上皮癌細胞株に対する細胞傷害効果ならびにmigration抑制効果をもたらし、抗癌剤との併用効果を示した。上部尿路上皮癌術後、膀胱内再発患者におけるアポトーシス関連タンパクの発現が予後悪化因子であることを示した。したがって、ABT-737は尿路上皮癌に対する新規の治療選択肢になりうる可能性を示唆できた。

研究成果の概要(英文)：ABT-737 which was a repressor for apoptotic protein Bcl-2/Bcl-xL showed cell injury effect and migration suppressant effect and the combination effect with the anticancer agent on urothelial carcinoma cell lines. The expression of apoptotic related protein was shown to be the poor prognostic factor for the intravesical relapsed patient after upper urinary tract urothelial carcinoma treatment. Therefore, it is suggested that ABT-737 could become the new treatment choice for urothelial carcinoma.

研究分野：尿路上皮癌

キーワード：アポトーシス 抗癌剤 予後因子

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は尿路（腎盂、尿管、膀胱、尿道）に発生する悪性腫瘍の中ではもっとも頻度が高い腫瘍であり、現在も漸増傾向を示している。わが国において、2007年における膀胱癌の死亡数は男性が4271人であり、全癌の死亡数の2.1%にあたる。女性においても死亡数は1903人であり全癌死亡数の1.4%にあたる。年齢調整死亡率は1975年2.2、2007年2.1とほぼ横ばいであり、治療法の改善が進んでいないことが示唆される。

浸潤性膀胱癌に対する手術療法は現在標準的治療であるものの、その再発率は高率であり、全身的な化学療法を必要とすることが多い。再発性尿路上皮癌・転移性尿路上皮癌の治療として、シスプラチンをベースとした化学療法の奏功率は約70%とされているが、生存予後の改善にあまり寄与せず、その副作用も強い。したがって、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、BCG膀胱内注入療法を越える再発予防治療は存在せず、さらにその再発率、浸潤癌への進展率は高く、新規膀胱内注入抗癌治療の確立が必至である。

2. 研究の目的

近年、分子標的治療がさまざまな癌腫で治療応用されており、泌尿器科領域に関してもこの分野の発展が目覚ましい。アポトーシス関連タンパクに関してこれまでさまざまな分子標的治療としての small molecule の研究が行われているが、今回 Bcl-2/Bcl-xL に対する新規の有効な阻害剤である ABT-737 に着目した研究を行った。この分子は抗アポトーシスタンパクである Bcl-2/Bcl-xL の機能を阻害し、アポトーシスを誘導することが肝細胞癌、大腸・直腸癌、前立腺癌等で報告されており、抗癌剤との併用に伴う作用増強効果等の報告も散見される。これらの報告を

総合して、尿路上皮癌でのアポトーシス関連タンパク、とりわけ Bcl-xL をターゲットとした腫瘍細胞での抗腫瘍効果の検討・治療戦略の確立を目的とした。

さらに、上記方法で得られた知見により、表在性、浸潤性尿路上皮癌患者の臨床検体・データ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、尿路上皮癌患者での予後因子に結びつく因子の解明と、臨床応用への可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

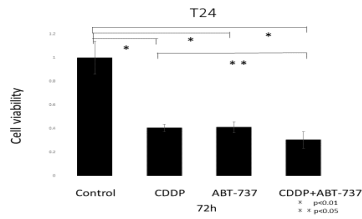
研究方法として、薬剤を使用することによる尿路上皮癌細胞株（T24、5637）に対する細胞傷害効果の検討を行う。尿路上皮癌治療でのキードラッグであるシスプラチンを用い、その細胞傷害効果、今回使用する ABT-737 の細胞傷害効果やその併用による相互作用を検討する。

シスプラチンや ABT-737 を投与したことに伴うアポトーシス関連タンパクや、その転写因子分子の発現や誘導が引き起こされるかの検討をウエスタンブロット法にて行う。また、転移能の評価のため、尿路上皮癌細胞株の migration assay を行い、薬剤を使用することに伴う転移抑制効果の検討を行う。

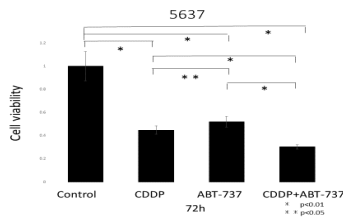
上記方法で得られた知見により、表在性、浸潤性尿路上皮癌患者の臨床検体・データを用いて免疫組織学的検討と臨床経過のプロファイルを統合させ、疾患特異的生存期間・無増悪生存期間の検討、臨床応用への可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) シスプラチン、ABT-737 による尿路上皮癌細胞株に対する細胞傷害効果の検討：



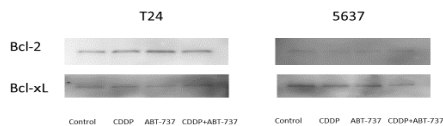
T24 尿路上皮癌細胞株に対し、シスプラチン、ABT-737、シスプラチン+ABT-737 投与群でそれぞれ、72 時間でコントロール群に対し有意に細胞傷害効果を認めた。また、シスプラチン+ABT-737 投与群はシスプラチン単剤投与群に対しても、有意に細胞傷害効果を認めた。



5637 尿路上皮癌細胞株に対し、シスプラチン、ABT-737、シスプラチン+ABT-737 投与群でそれぞれ、72 時間でコントロール群に対し有意に細胞傷害効果を認めた。また、シスプラチン+ABT-737 投与群はシスプラチン単剤投与群、ABT-737 単剤投与群に対しても、有意に細胞傷害効果を認めた。

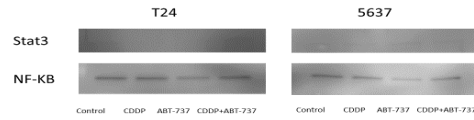
(2) シスプラチン、ABT-737 投与によるアポトーシス関連タンパクの発現の検討：

T24、5637 尿路上皮癌細胞株に対し、シスプラチン、ABT-737、シスプラチン+ABT-737 投与群 Bcl-2/Bcl-xL タンパクの発現量の変化をウエスタンブロット法で検討した。



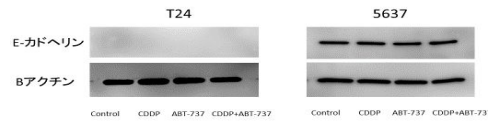
検討の結果、Bcl-2/Bcl-xL タンパクの発現量自体の変化は認められなかった。

次に、Bcl-xL の転写因子である Stat3 や NF- κ B の誘導効果を検討した。



Stat3、NF- κ B タンパクの発現量自体の変化は認められず、薬剤投与に伴った転写因子の誘導は起こさなかったと考えられた。

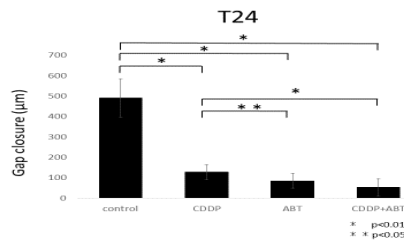
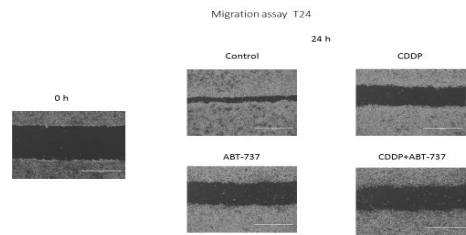
次に、再発、転移に関連する E-カドヘリンの発現について検討した。



検討の結果、5637 細胞株で E-カドヘリンタンパクの発現量自体の変化は認められなかったものの、T24 細胞株では E-カドヘリンの発現自体が認められなかった。

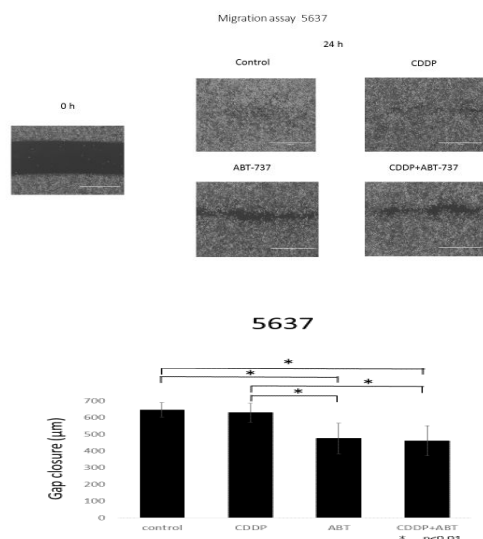
(3) シスプラチン、ABT-737 投与による migration assay の検討：

浸潤・転移に関する因子としての migration ability の検討を、シスプラチン、ABT-737、シスプラチン+ABT-737 投与群で行った。



T24 尿路上皮癌細胞株に対し、24 時間で migration 抑制効果をコントロール群に対し有意に認めた。さらに、ABT-737 単剤投与群、シスプラチン+ABT-737 投与群は、シスプラチ

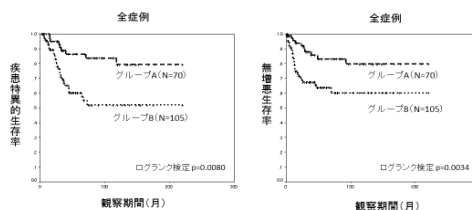
単剤投与群と比較し有意に migration 抑制効果を認めた。



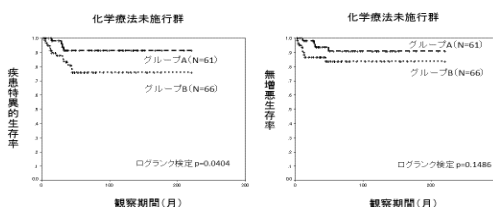
5637 尿路上皮癌細胞株に対し、ABT-737、シスプラチン+ABT-737 投与群でそれぞれ、コントロール群と比較し 24 時間で有意に migration 抑制効果を認めた。さらに、5637 細胞株でも ABT-737 単剤投与群、シスプラチン+ABT-737 投与群は、シスプラチン単剤投与群と比較し有意に migration 抑制効果を認めた。

(4) 上部尿路上皮癌患者の臨床的経過との関連の検討：

ABT-737 は Bcl-2/Bcl-xL 阻害剤であるが、抗癌剤抵抗性は Bcl-xL が Bcl-2 と比較し 10 倍程度であるといった報告もあるため、ABT-737 の key target は Bcl-xL と考えられる。このため、免疫組織学的に上部尿路上皮癌摘出腫瘍検体を Bcl-xL 染色を行い、その染色範囲と染色強度に応じ(0-12 ポイント)グループ分けを行い評価した。0-5 ポイント：グループ A (低発現群)(N=70)、6-12 ポイント：グループ B (中～高発現群)(N=105) 0-8 ポイント：グループ C (低～中発現群)(N=126)、9-12 ポイント：グループ D (高発現群)(N=49) とした。

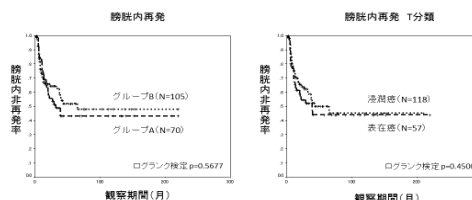


カプランマイヤー法による生存分析の結果、グループ B がグループ A と比較して、有意に疾患特異的生存率の低下 ($p=0.0080$) と、無増悪生存率の低下 ($p=0.0034$) を認めた。また、グループ B がグループ A と比較し、転移をおこすまで期間が有意に短い結果であった ($P=0.002$)。グループ A: 平均(月) 68.27 ± 6.95 、グループ B: 平均(月) 41.65 ± 4.36 。



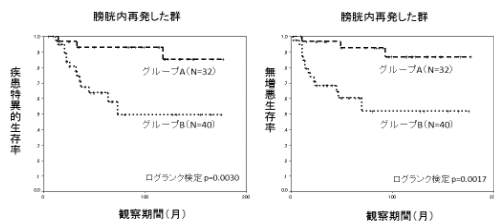
次に、術後シスプラチンベースの化学療法を行っていない群での検討では、グループ B がグループ A と比較して、疾患特異的生存率の有意な低下 ($p=0.0404$) を認めた。

次に、上部尿路上皮癌で特徴的な術後膀胱内再発の検討を行った。膀胱再発を発症するまでの期間は平均(月) 14.29 (2-65) であった。

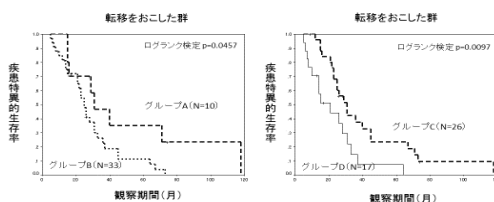


カプランマイヤー法での生存分析の結果、グループ A、グループ B 間で膀胱内再発に関して有意差は認められなかった。また、グループ間で膀胱再発までの期間に有意差はなかった。さらに、摘出検体での表在癌、浸潤

癌間での有意差も膀胱内再発に関して認められなかった。



しかしながら、膀胱内再発をおこした群での検討を行った結果、グループBがグループAと比較して、有意に疾患特異的生存率の低下 ($p=0.0030$) と、無増悪生存率の低下 ($p=0.0017$) を認め、膀胱内再発をおこした群では、予後に影響する因子であることを認めた。



さらに、経過中転移をおこした群での検討を行った結果、グループBがグループAと比較して、有意に疾患特異的生存率の低下 ($p=0.0457$) を認め、加えて高発現群であるグループDがグループCと比較し、疾患特異的生存率の有意な低下を認めた ($p=0.0097$)。

(5) 臨床データの多変量解析の検討：

膀胱内再発した群での検討の結果、グループBがグループAと比較して、疾患特異的生存率と無増悪生存率において独立した予後因子であった。

変数	疾患特異的生存率			無増悪生存率		
	単変量解析 p	多変量解析 HR (95% CI)	p	単変量解析 p	多変量解析 HR (95% CI)	p
性別(男/女)	0.004		N.S.	0.006		N.S.
年齢(65以上/65未満)	0.002		N.S.	0.202		N.S.
深達度(T2以上/T2未満)	0.057		N.S.	0.017		N.S.
グレード(High/Low)	0.012		N.S.	0.005	5.605 (1.253-25.598)	0.024
アジュバント化学療法(あり/なし)	0.387		N.S.	0.112		N.S.
腫瘍部位(尿管/腎盂)	0.160		N.S.	0.278		N.S.
グループ(B/A)	0.008	5.565 (1.570-19.732)	0.008	0.005	3.784 (1.048-13.607)	0.042

HR: Hazard ratio, CI: Confidence Interval, N.S.: Not significant.

また、転移をおこした群で検討した結果、グループDがグループCと比較して、疾患特

異的生存率において独立した予後因子であった。

変数	疾患特異的生存率		p
	単変量解析 p	多変量解析 HR (95% CI)	
性別(男/女)	0.296		N.S.
年齢(65以上/65未満)	0.328		N.S.
深達度(T2以上/T2未満)	0.046		N.S.
グレード(High/Low)	0.167		N.S.
アジュバント化学療法(あり/なし)	0.198		N.S.
腫瘍部位(尿管/腎盂)	0.409		N.S.
グループ(D/C)	0.014	2.400 (1.196-4.818)	0.014

HR: Hazard ratio, CI: Confidence Interval, N.S.: Not significant.

以上の結果より、尿路上皮癌細胞株 T24、5637 に対する ABT-737 投与による有意な抗腫瘍効果を認め、さらにシスプラチンの併用効果を認めた。これによって ABT-737 投与の有効性を示した。

ABT-737 は、Bcl-2/Bcl-xL の発現レベルや転写因子の発現レベルの変化を起こさなかったが、T24 細胞株と 5637 細胞株では E-カドヘリンタンパクの発現レベルの差を認めた。

migration assay の結果、T24、5637 細胞株ともに ABT-737 投与による有意な gap closure 抑制効果を認めたが、E-カドヘリンの発現レベルの差が gap closure 抑制効果に変化に影響を及ぼすことを示した。したがって、ABT-737 投与は E-カドヘリン発現の低下した転移能の高い細胞株により抗腫瘍効果を期待できる可能性を示すことができた。

上部尿路上皮癌患者での臨床データとの検討の結果、Bcl-xL 染色ポイントの高いグループが疾患特異的生存率、無増悪生存率ともに有意な低下を認めた。膀胱内再発の検討では、膀胱内再発を発症した群を層別化した結果、染色ポイントの高いグループが疾患特異的生存率、無増悪生存率ともに有意な低下を認めた。これによって、膀胱内再発症例では高染色ポイントグループは予後に悪影響を与えることを示した。膀胱内再発例での多変量解析の結果、高染色ポイントグループは疾患特異的生存率・無増悪生存率において予後因子であることを示した。また、転移をおこした群で層別化し検討した結果、より染色ポ

イントの高いグループは疾患特異的生存率の有意な低下を認め、独立した予後因子であることを示した。したがって、上部尿路上皮癌術後に膀胱内再発した群ならびに術後転移をおこした群において Bcl-xL 染色は有用な予後予測診断ツールであることを示した。以上より、アポトーシス関連タンパクは尿路上皮癌患者において予後予測因子であり、Bcl-2/Bcl-xL 阻害剤である ABT-737 は尿路上皮癌患者に対する有用な新規抗癌剤となり得る可能性を示唆することができた。今後、今回得られたデータをまとめ、学会報告・論文投稿予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

吉峰 俊輔 (YOSHIMINE SHUNSUKE)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：70445245