

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 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：26861296

研究課題名(和文) 尿路上皮癌におけるAxlリン酸化阻害薬の抗腫瘍効果に関する検討

研究課題名(英文) Investigation of anti-tumor effect of Axl kinase inhibitor in urothelial carcinoma.

研究代表者

服部 盛也(Hattori, Seiya)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80464907

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)：UMUC3、及びHT1376細胞株を用いて解析を行った。細胞免疫染色、並びにWestern blotting法を用いて確認した。結果、HT1376株はAxlの発現の弱い細胞株であり、UMUC3細胞株はAxlの発現の強い細胞株である事が確認された。

腎尿管全摘除術・膀胱部分切除術が施行されたUTUC症例の摘出検体を用いて免疫組織学的染色を行いAxl及びGas6の蛋白発現の評価を行った。Axl・Gas6の蛋白発現は互いに関連を持ち、尚且つUTUCの癌特異的生存を予測する独立した因子である事が示唆された。特にT2 stage以上のUTUCにおいて、蛋白発現の強弱が癌特異的生存と関連する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed Axl-Gas6 signal cascade using both UMUC3 and HT1376 cell lines, which are commercially purchasable UC cell lines. We used Western blotting analysis and immune-staining analysis. HT1376 is weak Axl-staining cell line and UMUC3 is a weak Axl-staining cell line. Commercially purchasable Axl kinase inhibitor, R428, had no cytotoxic ability in itself, but it blocks invasive capacity store-dependently in UMUC3 cell line. The protein expression of Axl and Gas6 by immunohistochemistry and its correlation with clinicopathologic features were investigated in surgical specimens obtained from patients who had been surgically treated for UTUC. Axl protein expression and its ligand Gas6 protein expression associate with each other, and both of them highly associated with worse prognosis of UTUC patients treated by radical nephroureterectomy.

研究分野：腫瘍学

キーワード：Axl Gas6 Urothelial carcinoma

1. 研究開始当初の背景

転移性尿路上皮癌に対する新規抗癌治療戦略の開発は我々に課せられた急務である。AxI は様々な癌細胞種に於いて cell survival、growth、EMT、metastatis に関与する事が報告されているが、尿路上皮癌に関する検討は極めて稀であり、また AxI リン酸化を阻害する薬剤についても報告が極めて少ない。当研究では第一三共株式会社提供の新規 AxI リン酸化阻害薬を使用し、ユニークな膀胱癌肺転移モデルを用いて in vivo 研究を進める。最終的には尿路上皮癌の治療効果向上を目指し、抗癌剤に AxI リン酸化阻害薬を併用した新規治療戦略の確立を目指す。

2. 研究の目的

(1) 転移性、再発性尿路上皮癌 (UC) は予後不良である。治療法は化学・放射線療法併用の集学的治療で、治療効果は不十分であり、またその副作用も決して無視できない。治療成績の向上の為には転移・浸潤のメカニズムの解明、治療標的の同定、抗癌剤治療に対する癌細胞、あるいは宿主の防御機構の解明は、抗癌剤を用いた新規治療戦略の確立が重要である。AxI は Receptor tyrosin kinase の一種であり、vitamin K 依存性蛋白である Gas-6(growth arrest-specific 6) をリガンドとする。様々な他癌細胞種 (乳癌、肺癌、急性骨髄性白血病等) に於いて VEGF-A 依存性の PI3K-Akt pathway を含むシグナル経路を通して cell survival、growth、上皮間葉転換 (EMT)、metastatis に関与する事が報告されてきている。AxI は乳癌、胆管癌等でその発現が転移、疾患特異的生存率、全生存率に関与する事が報告されている。AxI は原発巣に比べて転移巣での発現の増強 (Craven, Int J Cancer 1995、Gierdrum, Proc Natl Acad Sci 2010) が報告されており、またマウスの in vivo の実験においても、AxI

の knockdown により乳癌同所性転移モデルにおいて転移巣を強く抑制するなど、腫瘍の転移と強い関係がある事が報告されてきている。一方で AxI は抗癌剤耐性とも強い関係がある事が報告されている。AML 細胞株において、CDDP 及び ADM 投与による AxI の mRNA の発現増強が報告されている (Cancer Letters, 2008, 268, 314)。選択的 AxI リン酸化阻害薬の報告は少ないが、これまでに乳癌に於いて CDDP との併用による阻害薬投与はマウス乳癌同所性転移モデルにおいて CDDP 単剤に比べ肝転移を抑制したと報告されている (Holland, Cancer Research, 2010)。他方、UC に関する AxI についての報告は殆ど無い。UC に於ける AxI 発現のシグナル伝達についての検証は不十分で、転移との関連性についての検索や抗癌剤耐性についても報告が無い状況である。この度応募者は UC における AxI の阻害が腫瘍転移、抗癌剤耐性獲得の制御につながり、ひいては癌進展のメカニズムの解明と新しい治療の開発に寄与すると仮定し、本研究の立案に至った。AxI を阻害する薬剤については臨床応用可能な阻害剤が開発されていなかったが、最近ピリジン誘導体で、選択的に AxI のリン酸化を阻害する事で AxI のシグナル経路を阻害する新規 AxI リン酸化阻害薬 (DS-A) が合成された。当研究では AxI の制御にこの化合物を使用する。DS-A は AxI 高発現の乳癌細胞株に於いて強力に AxI のリン酸化を抑制する事が示されている。

我々はヒト UC における AxI の発現とその機能解明に既に着手している。ヒト UC 細胞 T24、HT1376、J82、5637、UMUC3 について Western blotting 法を用いて AxI 発現の有無を確認した。結果 HT1376 株については AxI の発現が極めて弱く、他の 4 種の細胞株については発現が強いという結果であった。この事から UC 細胞株における AxI の発現が確認されたので、引き続き臨床検体における AxI 発現について

の検討を行った。我々は比較的稀な疾患である上部尿路上皮癌においては多数の臨床データ及び未染の病理プレパラート (N=350) を所持している。それら全ての病理組織は一人の泌尿器病理医により再レビューされ、均一化された一貫性のあるデータベースが存在する。本データベースを用い、応募者らは分子マーカーである Snail, Kiss-1, vasohibin-1, Bcl-xL と予後との関連を既に検討し、論文化している (Clim Cancer Res 2010,16,5814; Mol Cancer Ther 2012,11,853; Clin Cancer Res 2012,18,4145; Br J Cancer 2013, 112, E28)。我々はまず AxI に関する免疫染色の条件設定についての予備的検討を行い、それに準じて免疫染色を行った。60例について免疫染色を行い、Kaplan-Meier 法を用いて疾患特異的生存率に対して統計学的に AxI 発現が有意であるかを検討した。AxI 発現の強弱は疾患特異的生存率と相関 (log-rank test : p=0.002) し、またその発現が転移の有無と統計学的に有意に相関していた。この様に AxI の発現が尿路上皮癌の予後因子の可能性を示唆しており、特に転移と関与する可能性が高いと応募者は考えた。

(2)この度我々は AxI リン酸化と UC での転移を初めとする癌進展における役割を検討し、抗癌剤耐性に AxI のリン酸化が関連しているのかを検証した上で、抗癌剤に AxI リン酸化阻害薬を組み合わせた新規治療戦略の確立を目的とした。応募者はまず AxI リン酸化阻害薬の抗腫瘍効果について in vitro、及び nude マウス皮下腫瘍モデルを用いた in vivo での検討を行い、次いで CDDP を初めとする抗癌剤投与と新規 AxI リン酸化阻害薬の相加効果、相乗効果の有無につき検討を行う。更に UC における転移のメカニズムの解明の為、ユニークな膀胱癌肺転移モデルを用いた検討を予定する。膀胱癌の転移モデルにおける AxI 阻害の有用性を検討した報告はこれまで

存在しない。転移性膀胱癌モデルとして MBT-2variant 膀胱腫瘍転移モデルを用いる。これは高率に肺転移を起こすモデルであり、当教室では安定したモデルの作成が可能である (Horinaga,Urology,2005)。本免疫応答を有するマウス肺転移モデルを用いて投与経路、投与期間、投与量を調整しながら AxI リン酸化阻害薬、並びに抗癌剤併用での転移抑制効果を検討する事を期間内の目標とする。

(3)UCに於ける AxI リン酸化阻害薬を用いた報告は存在しない。応募者はこの度新規 AxI リン酸化阻害薬である DS-A を第一三共株式会社より MTA 契約に基づき供与される。DS-A を用いる事でシグナル伝達経路の解明、及び AxI 発現の抗癌剤耐性との関連性の解明、抗癌剤との相加相乗効果の有無について解析を行う事を目的とするが、これらを研究した報告はこれまで存在しない。膀胱癌肺転移モデルについても免疫応答を有するマウスにおける転移モデルであり、転移抑制効果の in vivo での検討を可能にする、当教室で作成可能なユニークなモデルである。

3. 研究の方法

(1)UC株における AxI リン酸化のシグナル経路についての検討

尿路上皮癌細胞株の内、AxI 強発現が確認されている UMUC3 細胞株、及び弱発現が確認されている HT1376 細胞株について、AxI リガンドとして知られている市販の human Gas-6、及び第一三共株式会社より供与された AxI リン酸化阻害薬を使用し、Western blot 法を用いて尿路上皮細胞株におけるシグナル伝達経路について検索を行う (EGFR, PI3K, Akt, RAS, RAF, MAPK, ERK1/2 等)。

Western blot 法は 10%FBS にて培養しその後、human Gas-6 及び DS-A それぞれを加えた群、そして併用群を、PBS にて 3 回洗浄後 100 μ l の 250mM スクロース含有 Tris - HCL にて固定する。この細胞混濁液をホモジナイザーにて

処理をする。遠心後 SDS-PAGE、Wester blot 法を行う。

(2)UC 株 UMUC3 を用いた *in vitro* における CDDP・DS-A 併用療法による抗腫瘍効果の検討 RPMI 培地に 10%牛胎児血清 (fetal bovine serum) を加え、さらに 100 U/ml ペニシリン G、100 U/ml ストレプトマイシンを加えた 10%FBS 培地にて培養したものをを用いる。10%FBS 培地にて培養した上記細胞株を 1×10^5 /ml に調整し、96 穴タイタープレートにそれぞれ 100 μ l ずつ播種する。コントロール群、DS-A 単独投与群 (10-9M-10-7M)、CDDP 単独投与群 (0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M)、併用投与群に分け、24、48、72 時間 37、5%CO₂ 下で培養を行う。培養終了後に分光光度計にて計測する。以上より尿路上皮癌細胞 T24 における DS-A/CDDP 単独投与群と併用投与群との *in vitro* での抗腫瘍効果を比較する。

(3)上部尿路上皮癌についての AxI 発現と疾患特異的生存率に関する検討 (免疫染色) 応募者らは比較的稀な疾患である上部尿路上皮癌においては多数の臨床データ及び未染の病理プレパラート (N=350) を所持している。これらについて免疫組織染色を行い、AxI の発現と UC の予後に関する検討を行う。現段階で予備的検討ではあるが 60 例について染色を行い、AxI は疾患特異的生存と転移の有無に統計学的に有意に相関する事を事前に我々は検討している。他の再発予後因子 (Grade, Tstage, metastasis 等) との相関についても検討を行うと共に、p-AxI についても免疫染色を行いその意義について検討を予定する。

(4)膀胱腫瘍肺転移モデルを用いた AxI リン酸化阻害と転移抑制についての検討 マウス膀胱腫瘍肺転移モデルを用い検討を行う。DS-A を投与した群/非投与群に分け、肺転移・リンパ節転移数を計測し、マウスの体重変化を観察する。摘出した肺の転移巣よ

り蛋白を抽出し、AxI のシグナル経路の検討として pAkt, pS6, pERK、また EMT に関与する蛋白として slug, snail, twist 等の蛋白発現を検討する。また採取した腫瘍をホルマリン固定としパラフィン包埋し、4 μ m の切片を作成し、上記蛋白の発現についてリン酸化も考慮して検討を行う。

4. 研究成果

尿路上皮癌における AxI-Gas6 経路についての解析を行った。尿路上皮癌細胞の 1 つであり、商業的に入手可能な細胞株である UMUC3、及び HT1376 細胞株を用いて解析を行った。UMUC3 細胞株、及び HT1376 細胞株に関する AxI の発現を細胞免疫染色、並びに Western blotting 法を用いて確認した。結果、HT1376 株は AxI の発現の弱い細胞株であり、UMUC3 細胞株は AxI の発現の強い細胞株である事が確認された。そのリン酸化物質である p-AxI、についても同様に評価を行ったが、p-AxI が非常に不安定な物質であり、試行回数を重ね、また手法を変えても安定した結果を出す事が困難であった。第一三共株式会社より提供の DS-A に関しては動物への投与時の副作用が明らかとなった為に使用が困難となり、代わりに商業的に入手可能な AxI リン酸化阻害薬である R428 を購入して研究を試みたが、やはり p-AxI の不安定性の為にリン酸化経路の評価が困難であり、現時点で有用な成果が得られていない。この為現在手法を変えて評価を行っている最中である。

AxI リン酸化阻害薬の抗腫瘍効果に関する検討を目的として、xCelligence System を用いて、また試薬としては AxI リン酸化阻害薬である R428 を用いて検討を行った。細胞株としては AxI 陽性 UC 細胞株である UMUC3 を用いた。結果として R428 は *in vitro* で、直接の抗腫瘍効果を持たない事が示唆された。また、同じく xCelligence System を用いて R428 の浸潤抑制の有無について検討を行った所、浸潤能の関しては容量依存性に著明に抑制

されることが示唆された。

腎尿管全摘除術・膀胱部分切除術が施行された多数例の UTUC 症例の摘出検体を用いて免疫組織学的染色を行うことで AxI 及び Gas6 の蛋白発現の評価を行った。その結果、AxI 及び Gas6 の蛋白発現は互いに関連を持ち、尚且つ UTUC の癌特異的生存を予測する独立した因子である事が示唆された。特に T2 stage 以上の UTUC において、これら蛋白発現の強弱が癌特異的生存と強く関連する事が示唆され、最終的に独自のリスク分類を作成し報告を行った。(2015年5月 AUA2015 ポスター発表 ("Best of Posters" Award) 2016年2月 Annals of surgical oncology 論文掲載: 下記 Fig.1 Fig.3)

Figure 1-A AxI IHC

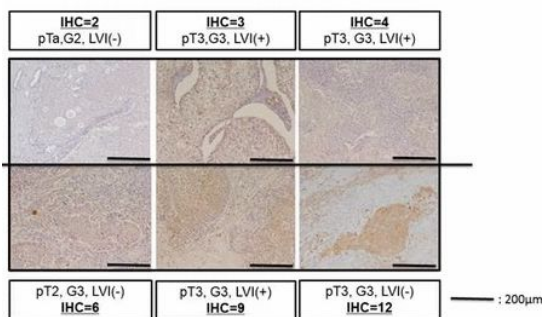


Figure 1-B Gas6 IHC

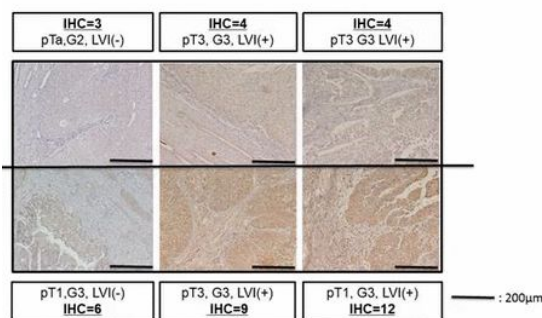
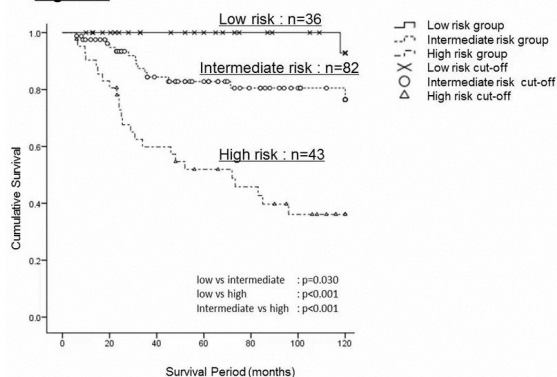


Figure 3



当院所持の肺転移モデルにて使用されるマウス MBT2v 細胞株について AxI の発現を検索した所、発現が認められなかった。この為当初予定していたマウス尾静注による肺転移モデルを用いた、in vitro における転移抑制の有無に関する評価は困難であり、断念した。現在は他の in vivo モデルの作成を検討中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

1. Ann Surg Oncol. 2016 Feb;23(2):663-70.
doi: 10.1245/s10434-015-4848-x

Relationship Between Increased Expression of the AxI/Gas6 Signal Cascade and Prognosis of Patients with Upper Tract Urothelial Carcinoma.

Hattori S, Kikuchi E, Kosaka T, Miyazaki Y, Tanaka N, Miyajima A, Mikami S, Oya M.

[学会発表](計3件)

1. 2015年5月 AUA2015 (ニューオリンズ、米国)

Relationship between increased expression of AxI-Gas6 signal cascade and prognosis in upper urinary tract urothelial carcinoma

2. 2015年4月 日本泌尿器科学会総会
石川県立音楽堂(石川県、金沢)

AxI-Gas6 カスケード亢進と上部尿路上皮癌術後の予後との関連

3. 2014年5月 AUA2014 (オランダ、米国)
AxI is a novel prognostic marker in upper urinary tract urothelial carcinoma.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

服部 盛也(Seiya Hattori)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：80464907

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし