

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592045

研究課題名（和文）表在性膀胱癌の再発関連分子の同定とそれを標的にした新規治療法の開発
 研究課題名（英文）Identification of molecules associated with intravesical recurrence of non-muscle invasive bladder cancer and the development of novel therapeutic strategy based on the molecular mechanism

研究代表者

三宅 秀明（MIYAKE HIDEAKI）

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60379435

研究成果の概要（和文）：細胞周期，細胞接着および EMT 関連分子に焦点を当てた解析を施行し，表在性膀胱癌の再発予測モデルを提唱した．また，これらの所見を踏まえ幾つかの分子を標的にした新規治療による表在性膀胱癌の再発予防の有用性を示した．

研究成果の概要（英文）：Through the evaluation of molecules associated with cell cycle, cell adherence and EMT, we developed predictive systems for intravesical recurrence of non-muscle invasive bladder cancer. In addition, we suggested the usefulness of novel therapeutic strategy targeting these molecules for preventing intravesical recurrence of non-muscle invasive bladder cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：表在性膀胱癌，再発，細胞周期，細胞接着，EMT，siRNA，HSP70

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は，その進達度により表在性あるいは浸潤性癌に大別される．大多数の表在性膀胱癌症例は，経尿道的内視鏡的手術により腫瘍の完全切除が可能であり，その予後は良好である．しかし，表在性膀胱癌は内視鏡手術による完全切除施行後であっても高率に再発をきたすことが知られている．その頻度は報告により様々であるが，約半数の症例に膀胱

内再発を認めるとの報告が多く，しかも再発症例の 5～10%に再発を繰り返す過程で，筋層内浸潤病変の出現を認め膀胱全摘除術等のより侵襲的な治療を余儀なくされることがある．従って，表在性膀胱癌切除後の膀胱内再発を如何に制御するかが臨床上の大きな課題の一つとなっている．

2. 研究の目的

研究代表者は今日まで膀胱癌の臨床データを詳細に解析してきたが、その過程で表在性膀胱癌を含む尿路上皮癌の易再発性を再認識し、そのメカニズムの解明およびそれに基づく新たな治療戦略の確立の必要性を痛感してきた。しかし、表在性膀胱癌に対する分子標的治療の開発は、大きく立ち遅れている感を否めない。これには、以下に示す幾つかの理由が考えられる。まず、表在性膀胱癌を含む尿路上皮癌が頻繁に多発性再発をきたす様式として、多中心性発生および腔内播種の二つが提唱されていることから伺えるように、分子レベルでの尿路上皮癌の再発メカニズムの解明が十分ではなく、適切な分子標的が同定されるに至っていないことが挙げられる。また、表在性膀胱癌を対象とした場合、従来の分子標的薬とは異なり、膀胱内への局所投与を前提とし、薬剤の尿中成分への暴露も考慮しなければならないことも、分子標的薬開発への障害であると考えられる。しかし、逆にこれらの諸問題を解決することが可能であるならば、我々が過去に携わってきた核酸関連医薬開発の経験を駆使することにより、表在性膀胱癌に対する分子標的治療の開発も十分可能であるものと考え本研究の申請を行うに至った次第である。

3. 研究の方法

表在性膀胱癌の再発に関与する分子マーカー発現レベルの免疫組織化学染色による検討：予備的検証にて細胞接着因子の発現様式が表在性膀胱癌の再発と極めて密接な相関を示した結果を踏まえ、**cadherin family** 以外の **integrin family** 等の細胞接着因子の発現様式の解析を追加した上で、これら分子マーカー発現レベルと各種臨床病理学的因子の関連を評価する。次いで、分子マーカー発現レベルと臨床病理学的諸因子の表在性膀

胱癌の再発予知因子としての意義を多変量解析にて評価し、膀胱内再発に独立した相関を有する因子を同定する。

表在性膀胱癌における再発の有無別の網羅的遺伝子発現レベル解析：再発無し症例および複数回の再発経験症例から、それぞれ 10 例程度の症例を選び、各症例の腫瘍組織から得た mRNA を cDNA microarray による網羅的遺伝子発現解析に供する。これにより、表在性膀胱癌の再発の有無別に、その発現レベルが顕著に増減する遺伝子の同定を行う。

治療標的候補遺伝子の選定：免疫組織化学染色および網羅的遺伝子解析により選定された遺伝子が、実際に想定通り、つまり表在性膀胱癌の再発に重要な働きをしているか否かを解析する。選定された遺伝子が既知の遺伝子か未知の遺伝子か、あるいは既知の遺伝子であってもその機能解析がどこまで進んでいるか等により機能解析を行うアプローチが異なってくるが、基本的には選定された各遺伝子を膀胱癌細胞に導入し、その遺伝子を強制発現させた細胞株を作製することにより評価する。

表在性膀胱癌の再発予防に対する分子標的治療の確立：決定される治療標的遺伝子に対して如何なる手段を用いた分子標的治療を開発するかであるが、具体的には、中和抗体、アンチセンスオリゴおよび siRNA 等が候補として考えられる。しかし、尿への暴露が不可避の閉鎖腔への投与を考慮すると、薬剤の安定性を重視する必要がある。これに加え、経済性、我々の過去の経験および臨床応用の可能性等を勘案すると、アンチセンスオリゴを用いた分子標的治療開発が本研究には適切な戦略であると考えられる。

アンチセンスオリゴを含む多剤併用療法の検討：アンチセンスオリゴに、実際の膀胱内注入療法においても頻用される抗癌剤を中

心とした各種治療を併用したレジメの有効性を検討する。このため、アンチセンスオリゴ療法を基本に複数の抗癌剤の併用効果を検討する予定である。また、抗癌剤以外にも、我々が以前に開発した clusterin, bcl-2, bcl-xL, IGFBP-2, IGFBP-5 および HSP27 等の遺伝子を標的にしたアンチセンスオリゴや他の異なる分子標的治療との併用効果の検討も興味深いものとする。

尿への暴露がアンチセンスオリゴの安定性に及ぼす影響の検討：膀胱療法に最も適したオリゴの種類を決定するために、生体内での安定性が飛躍的に向上する 2'-MOE 化学修飾を施したオリゴを初めとする数種類の第 2 世代オリゴの尿暴露後の安定性を capillary gel electrophoresis 法により評価する。

4. 研究成果

・表在性膀胱癌の再発に関与する可能性のある分子マーカーの発現を、免疫組織化学染色にて検索した。我々は、特に細胞周期関連蛋白および細胞接着関連蛋白に焦点を絞り、それぞれ 7 種類および 8 種類の蛋白の発現レベルを評価した結果、細胞周期関連蛋白では p27 の、細胞接着関連蛋白では $\beta 4$ integrin の発現レベルと表在性膀胱癌の再発が独立して相関することを明らかにし、臨床病理学的な古典的パラメーターとこれら分子マーカーを組み合わせることで、信頼性の高い再発予測モデルを構築した。

・ $\beta 4$ integrin を介して抗腫瘍効果を発現する化学物質を同定し、現在前立腺癌細胞を用いて、その分子機構を明らかにした。また、上記の $\beta 4$ integrin の発現レベルと表在性膀胱癌の再発との所見を考慮し、その物質と表在性膀胱癌に対する抗腫瘍効果および再発予防効果を解析中である。

・上記所見を発展させて、表在性膀胱癌の再

発といわゆる epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) との関係解析し、表在性膀胱癌の再発そのものに加え、上部尿路癌の術後膀胱内再発にも、代表的な EMT マーカーである E-cadherin および N-cadherin が重要な役割を果たしていることを初めて明らかにした。

・表在性膀胱癌の再発における血管新生因子の役割の検討を行い、経口抗癌剤の一種である UFT が、血管新生阻害作用を介して表在性膀胱癌の再発予防効果を有する可能性を明らかにした。UFT により古典的な血管新生因子の分泌レベルは影響を受けなかったが、血管新生阻害作用を有する GBL が UFT により誘導されることが示された。

・Heat shock protein 70 (HSP70) を標的とした siRNA が、膀胱癌細胞の抗癌剤感受性を亢進させることを明らかにした。また、その機序として caspase 依存性のアポトーシス誘導が関与していることを示した。

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 6 件)

① Harada K, Miyake H, Terakawa TI, Fujisawa M. Significance of uracil/tegafur for preventing intravesical recurrence of non-muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder. Current Urology, in press

② Behnsawy HM, Miyake H, Kusuda Y, Fujisawa M. Small interfering RNA targeting heat shock protein 70 enhances chemosensitivity in human bladder cancer cells. Urologic Oncology, in press

③Muramaki M, Miyake H, Terakawa T, Kumano M, Sakai I, Fujisawa M. Expression profile of E-cadherin and N-cadherin in non-muscle invasive bladder cancer as a novel predictor of intravesical recurrence following transurethral resection. Urologic Oncology, in press

④Muramaki M, Miyake H, Terakawa T, Kusuda Y, Fujisawa M. Expression profile of E-cadherin and N-cadherin in urothelial carcinoma of the upper urinary tract is associated with disease recurrence in patients undergoing nephroureterectomy. Urology, 2011; 78: 1443.e7-1443.e12

⑤Behnsawy HM, Miyake H, Abdalla MA, Sayed MA, Ahmed AI, Fujisawa M. Expression of integrin proteins in non-muscle invasive bladder cancer: significance of intravesical recurrence following transurethral resection. BJU International, 2011; 107: 240-246

⑥Behnsawy HM, Miyake H, Abdalla MA, Sayed MA, Ahmed AI, Fujisawa M. Expression of cell cycle-associated proteins in non-muscle invasive bladder cancer: correlation with intravesical recurrence following transurethral resection. Urologic Oncology, 2011; 29: 495-501

[学会発表] (計 3 件)

①第 27 回 EAU Annual Meeting (2012, Paris)
Expression of cell cycle-associated proteins in non-muscle invasive bladder cancer: Correlation with intravesical recurrence

following transurethral resection. Hideaki Miyake, Hosny M Behnsaway, Masato Fujisawa

②第 70 回 日本癌学会 (2011, 名古屋)
Induction of angiogenic inhibitor, GBL in patients with non-muscle invasive bladder cancer following treatment with UFT. Hideaki Miyake, Tomoaki Terakawa, Iori Sakai, Junya Furukawa, ken-ichi Harada, Yuji Kusuda, Mototsugu Muramaki, Masato Fujisawa

第 69 回 日本癌学会 (2010, 大阪)

③ Growth inhibition and chemosensitization in human bladder cancer KoTCC-1 cells by siRNA targeting heat shock protein-70. Hideaki Miyake, Tomoaki Terakawa, Iori Sakai, Junya Furukawa, Yuji Kusuda, Mototsugu Muramaki, Atsushi Takenaka, Masato Fujisawa

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 秀明 (MIYAKE HIDEAKI)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 60379435

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者