

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23501266

研究課題名(和文)膀胱癌の転移/治療耐性における p63 蛋白の役割

研究課題名(英文)Role of p63 in metastasis and therapeutic resistance of bladder cancer

研究代表者

古賀 文隆 (Koga, Fumitaka)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：10285851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌幹細胞は進行期の膀胱癌に使用される抗がん剤であるシスプラチンに対し抵抗性を示すこと、膀胱癌幹細胞はp63の発現が消失することを示し報告した。この結果からはp63の発現消失がシスプラチン抵抗性と関連する可能性が示唆される。一方で、膀胱癌に対し少ない量のシスプラチンを併用した放射線療法(化学放射線療法)の治療効果とp63の発現との間には有意な関連性を見いだせなかった。そこで化学放射線療法治療抵抗性に関連するバイオマーカーの探索を行ったところ、erbB2 の過剰発現が化学放射線療法の治療抵抗性および膀胱癌死のリスクと有意に関連することを見出し報告した。

研究成果の概要(英文)：The following findings were obtained in the present study series and reported in international medical journals. (1) Bladder cancer stem cells are resistant to cisplatin and they lose expression of p63 protein, suggesting that loss of p63 is associated with cisplatin resistance. (2) No significant association was obtained between chemoradiation resistance and p63 expression profile in muscle-invasive bladder cancer. (3) Overexpression of erbB2 in bladder cancer is significantly associated with resistance to chemoradiation and bladder cancer death.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：膀胱癌 転移 治療抵抗性 p63

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は、臨床病理学的に、(1) 分化型乳頭状非浸潤癌と、(2) 浸潤癌の2つの表現型に大別される。膀胱癌は臨床病理学的表現型により生物学的悪性度が大きく異なるため、治療法も大きく異なってくる。分化型乳頭状非浸潤癌は膀胱腔内に高頻度に再発を来すものの浸潤・転移の危険性が低いため、経尿道的腫瘍切除や膀胱内注入療法などの保存的局所治療で多くの症例がコントロール可能である。一方、浸潤癌は高率に所属リンパ節転移や遠隔転移を来すため、標準的治療法として、根治的膀胱全摘除+尿路変向が行われ、しばしば補助療法として全身化学療法が併用される。

p63 は癌抑制遺伝子 p53 の類縁遺伝子として同定されたが、p63 の生理的機能はいわゆる癌抑制遺伝子としてではなく、尿路上皮を含む重層化上皮の発生および多層構造の維持にある。申請者はこれまで“膀胱癌における p63 の意義”について検討し、p63 の発現消失が膀胱癌の高い生物学的悪性度と関連することを報告してきた (Koga et al. *Br J Cancer* 2003; Koga et al. *Clin Cancer Res* 2003)。また、H21~22 年度科学研究費補助(若手研究 B: 課題番号 21791490) を受け、p63 発現消失が膀胱癌細胞の上皮間葉転換 (EMT) を引き起こし浸潤能を亢進すること、およびその背景にある分子生物学的機序を解明した (Fukushima, Koga et al. *Cancer Res* 2009)。

2. 研究の目的

膀胱癌の転移/治療耐性における p63 蛋白の役割の解析と、その背景にある分子生物学的機序の解明を目的とする。さらに、膀胱癌幹細胞の生物学的特性という視点からも解析を進めていく。

3. 研究の方法

p63 の治療耐性における役割

(1) 浸潤癌症例コホートでの p63 発現プロファイルと化学放射線療法治療抵抗性との関連の解析。

(2) p63 ノックダウン系/p63 強制発現系膀胱癌細胞における化学/放射線治療感受性の解析とその分子生物学的機序の解析。

p63 の転移における役割

(1) p63 欠失膀胱癌細胞マウス肺転移モデルにおける p63 遺伝子導入膀胱癌細胞とコントロール間との肺転移形成能の比較。

(2) 転移の各プロセス(細胞接着、接着後の増殖能、血管新生など)における p63 蛋白の役割の系統的解析とその分子生物学的機序の解析(特に接着後の間葉上皮転換における p63 の役割について)。

膀胱癌幹細胞の生物学的特性からみた転移/治療耐性における p63 蛋白の役割の解析

4. 研究成果

転移のある膀胱癌患者に対する治療は、シスプラチン主体の多剤併用全身化学療法が標準的に行われる。全身化学療法により、約 7 割の患者が良好な腫瘍縮小効果を示すが、殆どの症例で治療継続にもかかわらず病勢が進行し癌死に至る。近年、「癌には高い腫瘍形成能を有すごく少数の癌幹細胞が存在し、癌幹細胞が腫瘍形成の根源である」とする癌幹細胞理論が提唱されており、様々な癌腫で癌幹細胞の存在が報告されている。癌幹細胞理論に基づくと、上述の現象は、「膀胱癌の大部分を占める非幹細胞成分はシスプラチン主体の化学療法に反応するものの、治療耐性を有す少数の癌幹細胞集団が腫瘍再増大の元となり、患者を死に至らしめる」と考えることができる。ヒト膀胱癌細胞株から癌幹細胞の条件を満たす細胞を同定・分離し、膀胱癌幹細胞のシスプラチン耐性を確認し、その分子生物学的背景を解析の後、耐性克服の可能性を検討した。また、p63 発現との関連を見た。

結果：

- ・CD44 陽性ヒト膀胱癌細胞(5637 細胞)は、癌幹細胞の要件である 1) 球状コロニー形成能、2) マウス皮下での高い腫瘍形性能、3) 自己複製能、を満たす細胞集団であった。親細胞株が p63 蛋白を強発現するのに対し、CD44 陽性膀胱癌細胞集団はその p63 発現が消失していた。

- ・膀胱癌幹細胞(CD44 陽性膀胱癌細胞)は、非癌幹細胞(CD44 陰性細胞)と比較して、高いシスプラチン耐性を示した。

- ・膀胱癌幹細胞の治療耐性関連蛋白の発現プロファイルをみると、非癌幹細胞と比較して、著明に高い Akt および Erk 活性を示し、シスプラチン治療耐性の一因と考えられた。

- ・ヒートショックプロテイン 90 (Hsp90) 阻害剤は、in vitro, in vivo とともに、膀胱癌幹細胞のシスプラチン感受性を増大させた。

一方で、膀胱温存を主目的に化学放射線療法を受けた筋層浸潤性膀胱癌患者の膀胱癌組織の p63 発現と治療効果との関連を見たが、有意な関連を見出せなかった。したがって、p63 の化学放射線療法治療感受性における分子生物学的機序の検討は行っていない。

次に、化学放射線療法治療抵抗性に関連するバイオマーカーの探索を行ったところ、receptor tyrosine kinase である erbB2 の過剰発現が化学放射線療法の治療抵抗性および膀胱癌死のリスクと有意に関連することを見出した。また、化学放射線療法前の膀胱癌切除標本において、尿路上皮癌以外に

腺癌あるいは微小乳頭状癌の成分が混在すること、リンパ管・脈管侵襲があること、臨床病期 T3-4 であること、が独立危険因子であることを見出した。

転移能との関連についての基礎実験は、研究期間と重なって当施設の動物実験舎改修工事があったこと、および研究代表者が主研究施設から転勤したことなどの理由で完遂できなかった。

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 7 件) 全て査読あり

1. Inoue M, Koga F, Yoshida S, Tamura T, Fujii Y, Ito E, Kihara K. Significance of ERBB2 Overexpression in Therapeutic Resistance and Cancer-Specific Survival in Muscle-Invasive Bladder Cancer Patients Treated With Chemoradiation-Based Selective Bladder-Sparing Approach. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 90:303-11, 2014.
2. Koga F, Numao N, Saito K, Masuda H, Fujii Y, Kawakami S, Kihara K. Sensitivity to chemoradiation predicts development of metastasis in muscle-invasive bladder cancer patients. *Urol Oncol* 7:1270-5, 2013.
3. Tatokoro M, Koga F, Yoshida S, Kawakami S, Fujii Y, Neckers L, Kihara K. Potential role of Hsp90 inhibitors in overcoming cisplatin resistance of bladder cancer-initiating cells. *Int J Cancer* 131:987-96, 2012.
4. Yoshida S, Koga F, Kobayashi S, Ishii C, Tanaka H, Tanaka H, Komai Y, Saito K, Masuda H, Fujii Y, Kawakami S, Kihara K. Role of diffusion-weighted magnetic resonance imaging in predicting sensitivity to chemoradiotherapy in muscle-invasive bladder cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 83:e21-7, 2012.
5. Koga F, Fujii Y, Masuda H, Numao N, Yokoyama M, Ishioka J, Saito K, Kawakami S, Kihara K. Pathology-based risk stratification of muscle-invasive bladder cancer patients undergoing cystectomy for persistent disease after induction chemoradiotherapy in bladder-sparing approaches. *BJU Int* 110:E203-8, 2012.
6. Koga F, Kihara K. Selective Bladder Preservation with Curative Intent for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Contemporary Review. *Int J Urol* 19:388-401, 2012.

7. Koga F, Kihara K, Yoshida S, Yokoyama M, Saito K, Masuda H, Fujii Y, Kawakami S. Selective bladder-sparing protocol consisting of induction low-dose chemoradiotherapy plus partial cystectomy with pelvic lymph node dissection against muscle-invasive bladder cancer: Oncological outcomes of the initial 46 cases. *BJU Int* 109:860-6, 2012.

[学会発表](計 4 件)

1. 古賀文隆、井上雅晴、木島敏樹、吉田宗一郎、石岡淳一郎、松岡陽、沼尾昇、齋藤一隆、増田均、藤井靖久、木原和徳。低用量化学放射線治療による導入療法を施行した筋層浸潤性膀胱癌患者の治療前因子によるリスク評価。第102回日本泌尿器科学会総会、神戸、2014.4.25.
2. Koga F, Inoue M, Kijima T, Yoshida S, Ishioka J, Matsuoka Y, Numao N, Saito K, Masuda H, Fujii Y, Kihara K. Pre-therapeutic risk stratification of muscle-invasive bladder cancer patients treated with chemoradiation-based selective bladder-sparing approach. 29th annual EAU congress, Stockholm, 2014.4.14.
3. Koga F, Yoshida S, Kobayashi S, Ishii C, Tanaka Hiroshi, Fujii Y, Tanaka Hajime, Masuda H, Saito K, Komai Y, Kawakami S, Kihara K. Diffusion-weighted MRI predicts sensitivity to chemoradiation in muscle-invasive bladder cancer. 27th annual EAU congress, Paris, 2012.2.25.
4. Koga F, Tatokoro M, Kijima T, Sakura M, Saito K, Masuda H, Fujii Y, Kawakami S, Kihara K. Sensitivity to chemoradiation predicts development of metastasis in muscle-invasive bladder cancer patients. AUA 2011 annual meeting. Washington DC, 2011.5.17.

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 文隆 (KOGA Fumi taka)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研
究科・非常勤講師
研究者番号：10285851

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：