

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：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462497

研究課題名(和文)ポリエチレングリコールによる多核細胞形成を介した膀胱腫瘍増殖抑制効果の検討

研究課題名(英文) Examination of the growth depression effect of bladder tumor through the multinucleated cell formation by the polyethylene glycol

研究代表者

福田 勝洋 (Fukuta, Katsuhiko)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30468251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌細胞(PC-3)をターゲットとしたPEGによる多角巨細胞の発現とアポトーシスの誘導、さらにはin vivoへと発展させた研究を基礎として、本研究は膀胱癌をターゲットとし前立腺がんと同様の結果を導き出すことを目的とした。しかし、膀胱癌細胞株では期待した結果は得られなかった。組織学的に膀胱は「尿路上皮がん」であり前立腺がんの性質が違ふと考えた。「腺癌」であるヒト胃がん細胞を用いたところ、多角巨細胞の出現とアポトーシスの誘導が示唆された。本研究期間でin vivoまでは実施することはできなかった。今後、細胞学的に「腺癌」「尿路上皮癌」に差異によるPEGの作用を研究したい。

研究成果の概要(英文)：The background of the study is based on PEG has the feature as a chemotherapeutic agent through the induction of multinucleated cell formation and apoptosis induction in PC-3 prostate cancer cells. The aim of this study is to evaluate this effect of PEG for bladder cancer cells. However, in this study using the bladder cancer cell line, the expected results were not indicated. The bladder cancer was "urothelial cancer" histologically. The bladder cancer was thought to be different from prostate cancer which was "adenocarcinoma" histologically in a property. In the study using the human gastric cancer cells "NCI-N87" which were "adenocarcinoma", PEG suggested the effort of itself for "NCI-N87" cancer cells. We could not perform in vivo study in this study period. We are going to examine effects of the PEG by the cytological difference for "adenocarcinoma" "urothelial carcinoma" in future. By the results, we identify the carcinoma with responsibility.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：polyethylene glycol 多角巨細胞 アポトーシス 前立腺癌 膀胱癌 腺癌 尿路上皮癌

1. 研究開始当初の背景

私は、国立がんセンター研究所で前立腺癌の新たな治療法の確立を目指し研究を行ってきた。PC-3 皮下移植モデルにおいて PEG を注入することにより多核細胞有意にアポトーシスが誘導され、その腫瘍抑制効果が得られた。私たちは PEG の fusogen としての性質に注目し、腫瘍部に PEG を局所注入することにより、多核細胞形成を介したアポトーシス誘導および抗腫瘍抑制効果が得られることを発見した。この発見は国内で高く評価され、特許を取得するに至った¹。現在、この発見を前立腺癌に対する新しい治療法として臨床応用したいと考えている。本研究では PEG を用いた知見を、膀胱 CIS の新規治療法の確立へ応用することを目的とした。膀胱 CIS では、膀胱内腔側に存在する膀胱被蓋細胞が脱落しており、膀胱内腔に癌細胞が露出した状態で存在している。そのため膀胱内へ PEG を注入することにより、効率よく PEG が癌細胞へ接着することが想定される。これにより効率よく癌細胞へ多核細胞形成を介したアポトーシスの誘導を引き起こすことができると考えた。さらに PEG で誘導した多核細胞がアポトーシスに至る経緯において、ゲノムの不安定化が影響しているのではないかと推測した。

2. 研究の目的

膀胱上皮内癌(CIS)に対して BCG 膀胱内注入療法に代わる新規膀胱内注入療法を開発する目的で私たちは CIS の病態を研究してきた。そのなかで、膀胱発癌モデルの CIS において遺伝子変化やゲノムの不安定化が引き起こされることを発見した。また、ポリエチレングリコール(PEG)が多核細胞形成を介したアポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果をもつことを発見し²、特許を取得した¹。PEG は細胞と接着してアポトーシスを誘導することから、癌細胞が膀胱内腔に露出している CIS に対して有効と考えられる。これらの成果を踏まえ、本研究では PEG の癌細胞での遺伝子変化やゲノムの不安定性に着目し、抗腫瘍効果のメカニズムを明らかにすることによって、CIS の PEG 膀胱内注入療法を開発することを目的とする。

- (1) ヒト膀胱癌細胞株における PEG の多核細胞形成を介したゲノムの不安定性誘導機序
- (2) アポトーシス誘導への影響の解明

ヒト膀胱癌細胞株に様々な濃度で PEG を添加し、多核細胞を誘導させる。その多核細胞におけるゲノムの不安定性を検討する。さらにゲノムの不安定性が、アポトーシス誘導にどのように影響するかを検討する。

- (3) PEG の膀胱内注入における抗腫瘍効果と安全性についての検討
- (4) PEG 膀胱内注入療法の臨床応用

倫理審査委員会を通し、PEG 膀胱内注入療法の臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒト膀胱癌細胞株における PEG の多核細胞形成を介したゲノムの不安定性誘導

ヒト膀胱癌培養細胞は T-24、RT-4、5637 を用いた。

T-24、RT-4、5637 を 37 °C 10%CO₂ インキュベーターにて培養する。数回継代した後、プレート(カバーガラスをのせた)に細胞をまき、培養する。プレート上に 70~80% の割合で生着したことを確認してから実験に用いる。プレートに PEG(最終濃度が 0.5、1.0%になるように)を添加する。上澄を除去し、さらに PBS で 3 回細胞を洗浄する。この際 PEG 作用時間(10、60 分)についても検討を行う。培養液を加えて 37 °C 10%CO₂ インキュベーターにて培養する。6、24、30 時間後カバーガラスを取り出し、H.E 染色を行う。

【HE 染色手順】

PBS 洗浄後、
95%アルコール 2 分、80%アルコール 2 分、
70%アルコール 2 分
水洗 5 分、ヘマトキシリン 4 分
水洗 5 分、95%アルコール 1 分
エオジン 4 分、95%アルコール 15 秒 × 2
100%アルコール 2 分 × 3、キシレン 3 分 × 3、Entellan にて封入

(2) PEG の多核細胞形成を介したアポトーシス誘導能の解析

PEG で処理した細胞をセルスクレーパーで回収する。DAPI により染色した標本を蛍光顕微鏡を用いて核の濃染像の有無を検討する。

【DAPI 染色】

PBS 洗浄後、

4%PFA/PBS RT15 分固定

PBS リンス後 5 分洗浄

1/5000 DAPI solution RT30-40 分

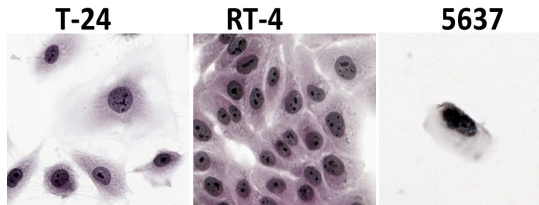
PBS リンス後、RO 水洗浄 5 分 × 2

Fluoromount/plus にて封入

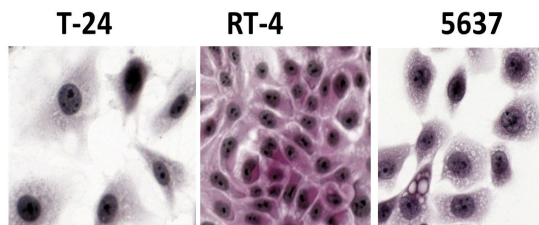
4. 研究成果

(1) ヒト膀胱癌細胞株における PEG の多核細胞形成を介したゲノムの不安定性誘導

1.0%PEG 60 分作用後 6 時間の膀胱癌細胞の HE 染色である。T-24, RT-4, 5637 いずれも多核巨細胞化は認められなかった。

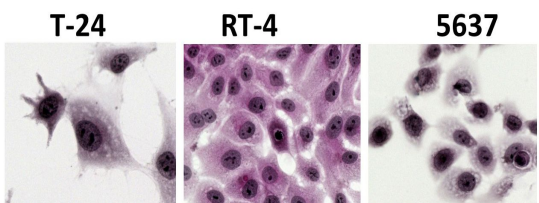


1.0%PEG 60 分作用後 24 時間の膀胱癌細胞の HE 染色である。



T-24, RT-4, 5637 いずれも多核巨細胞化は認められなかった。

1.0%PEG 60 分作用後 30 時間の膀胱癌細胞の HE 染色である。



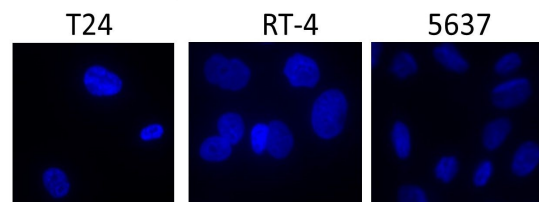
T-24, RT-4, 5637 いずれも多核巨細胞化は認められなかった。

(2) PEG の多核細胞形成を介したアポトーシス誘導能の解析

DAP1 により染色した標本を蛍光顕微鏡を用いて核の濃染像の有無を検討した。

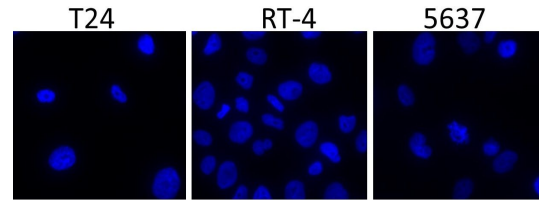
1.0%PEG 60 分作用後 6 時間の膀胱癌細胞の DAP1 染色標本を蛍光顕微鏡で観察した像である。

1.0%PEG 60 分作用後 6 時間の膀胱癌細胞の HE 染色である。



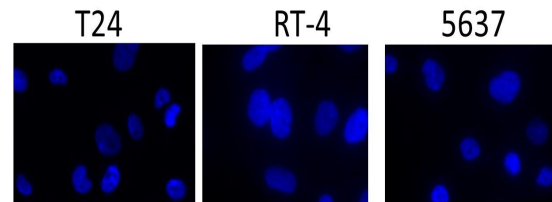
T-24, RT-4, 5637 いずれも核断裂というアポトーシス所見は認められなかった。

1.0%PEG 60 分作用後 24 時間の膀胱癌細胞の DAP1 染色標本を蛍光顕微鏡で観察した像である。



T-24, RT-4, 5637 いずれも核断裂というアポトーシス所見は認められなかった。

1.0%PEG 60 分作用後 30 時間の膀胱癌細胞の DAP1 染色標本を蛍光顕微鏡で観察した像である。



T-24, RT-4, 5637 いずれも核断裂というアポトーシス所見は認められなかった。

膀胱癌細胞株に対して PEG を作用させ多核細胞形成をさせるアポトーシス誘導を確認することが本研究を完成させる最初の条件であった。

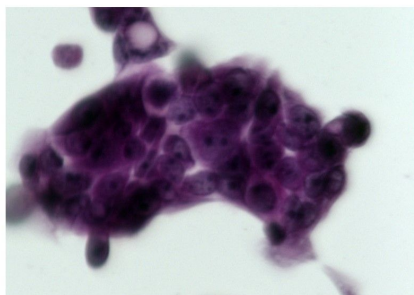
しかし、PEG1.0%を 60 分ヒト膀胱癌細胞株 T-24, RT-4, 5637 に作用しても、反応後 6 時間、24 時間、30 時間後で確認しても多核巨細胞の形成は認められなかった。また核断裂も認められず、アポトーシス誘導も確認できなかった。

本研究は前立腺癌細胞をターゲットとして特許取得に値する研究成果が得られたので、泌尿器系癌のもう一つの代表的な癌である「膀胱癌」をターゲットとして PEG による多核巨細胞発現からアポトーシスの誘導、最終的には「膀胱癌」治療の特有の膀胱内注入療法に応用することを目的とした研究であった。私たちが泌尿器科医であるので、泌尿器系癌にこだわったが、癌腫によって期待する結果が得られるもの、得られないものがあるのは自明の理である。前立腺癌が泌尿器系癌であり、次に膀胱癌という発想であったが、細胞学的には前立腺癌は「腺癌」であり、膀胱癌は「尿路上皮癌（移行上皮癌）」で、別の癌である。In vitro で膀胱癌細胞において期待する結果がでなかったため、細胞学的な「腺癌」に着目し、ヒト胃がん細胞「NCI-N87」で、再検討することとした。

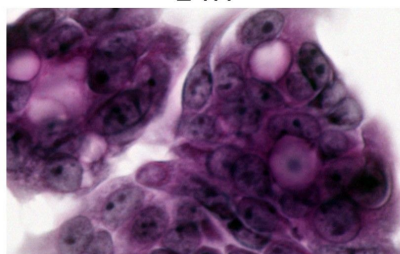
(3) ヒト胃癌細胞株 NCI-N87 における PEG の多核細胞形成を介したゲノムの不安定性誘導

実験内容は T-24, RT-4m 5637 と同様に行った。

6H



24H



30H

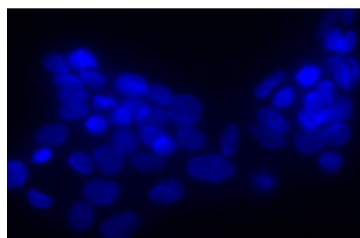


6H, 24H では多核巨細胞は認められなかったが、30H で多核巨細胞を認めた (赤矢印)。

(4) PEG の多核細胞形成を介したアポトーシス誘導能の解析

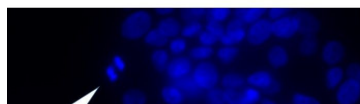
実験内容は T-24, RT-4m 5637 と同様に行った。

6H

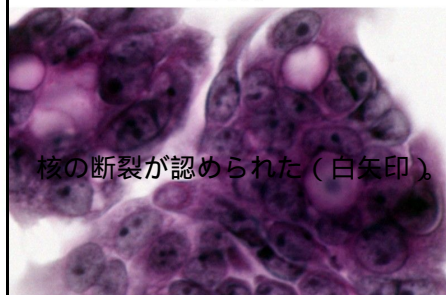


核の断裂は認められなかった。

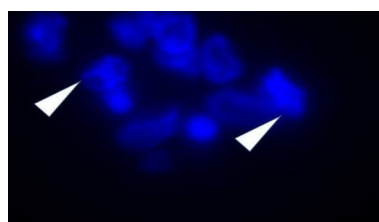
24H



24H



核の断裂が認められた (白矢印)。



核の断裂が認められた (白矢印)。

ヒト胃癌細胞 NCI-N87 では、ヒト膀胱癌細胞 T-24, RT-4, 5673 では認められなかった PEG の処理による多核巨細胞の出現とアポトーシスの誘導が認められた。

しかし、より効率的に多核巨細胞の出現とアポトーシスの誘導を引き起こす PEG 濃度、PEG の処理時間や反応時間について十分な検討はできなかった。

(5) PEG の膀胱内注入における抗腫瘍効果と安全性についての検討

本研究においては *In vitro* で膀胱癌細胞についての PEG の作用が認められなかったため、膀胱内注入における抗腫瘍効果と安全性の検討については実施できなかった。

(6) PEG 膀胱内注入療法の臨床応用

In vivo 実験も実施できていないので、臨床応用は検討の余地もなかった。

<引用文献>

1. 福田 勝洋ら 特許識別番 110000109.
2. Fukuta K, Kohri K, Fukuda H, et al. Induction of multinucleated cells and apoptosis in the PC-3 prostate cancer cell line by low concentrations of polyethylene glycol 1000. *Cancer Sci.* 2008 ;99:1055-62.

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. 河合 憲康: 去勢抵抗性前立腺癌に対する治療戦略。第14回知多前立腺研究会、2015.3.14、セントレア会議室(愛知県常滑市)

2. 河合 憲康: ロボット支援 腎・膀胱手術について。The 6th Tokai Robotic Urology Symposium、2015.3.6、名古屋マリオットアソシアホテル(愛知県名古屋市)

〔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

福田 勝洋 (FUKUTA Katsuhiko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号: 30468251

(2) 研究分担者

河合 憲康 (KAWAI Noriyasu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 20254279

郡 健二郎 (KOHRI Kenjiro)

名古屋市立大学・学長

研究者番号: 30122047

戸澤 啓一 (TOZAWA Keiichi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 40264733

内木 拓 (NAIKI Taku)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 50551272