

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10609

研究課題名(和文)尿路上皮癌の進展におけるケモカインの発現制御と機能解析

研究課題名(英文)Role of chemokine in urothelial cancer progression

研究代表者

宮嶋 哲 (MIYAJIMA, Akira)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90245572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：尿路上皮癌と腎癌の臨床検体におけるMCP-1、新生血管の発現ならびにアンギオテンシン受容体(AT1R)の発現について免疫組織染色を施行し、その予後との相関を確認した。さらに、シスプラチン耐性細胞を用いた検討ではEMT誘導にユビキチンリガーゼであるFBX032の発現が深く関わっていることが明らかとなった。臨床的には喫煙歴のある尿路上皮癌患者ならびに去勢抵抗性前立腺癌患者において、治療前の血球動態が予後予測因子として有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemical staining of MCP-1, expression of angiogenesis and angiotensin receptor (AT1R) in clinical specimens of urothelial carcinoma was performed, and correlation with its prognosis was confirmed. In addition, it was revealed that the expression of FBX032, a ubiquitin ligase, is deeply involved in induction of EMT in the study using cisplatin resistant bladder cancer cells. Clinically it was shown that the hemocyte dynamics before treatment is useful as a prognostic predictor in patients with urothelial carcinoma patients with history of smoking as well as for patients with castration resistant prostate cancer.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：尿路上皮癌 耐性機序 血管新生 ケモカイン

### 1. 研究開始当初の背景

癌の進展、転移のプロセスに様々なケモカインが関与していることが報告されているものの、尿路上皮癌の進展においては十分に解明されていない点が多い。これまで我々は前立腺癌においてケモカイン MCP-1 が治療の予後因子である点や癌の進展への関与を見出してきた。

### 2. 研究の目的

癌の進展、転移の過程にケモカイン MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) が関与するという知見が集積されつつある。しかし尿路上皮癌の進展における MCP-1 の関与について十分に検討はなされていない。MCP-1 を含めた多くのケモカインは良性の炎症性疾患でアンジオテンシン II (AngII) 1 型受容体 (AT1R) の制御を受けると報告され、既にこの制御機構は臨床応用されている。

これまで申請者は前立腺癌と膀胱癌において降圧剤である AT1R 阻害剤 (ARB) の血管新生抑制を介する抗腫瘍効果を見出し、AT1R の発現と予後との関連について示してきた。本研究では実験モデルと臨床検体で尿路上皮癌における MCP-1 の動向とその後の進展との関連性を解析し、尿路上皮癌での AT1R 発現の観点から MCP-1 制御機構について検討を進める。

### 3. 研究の方法

(1) *in vitro* における MCP-1/CCR2 の発現ならびにその調節機構の検討  
各種膀胱癌細胞株 (T24, T24PR, 5637, 5637PR, UMUC-3, KU19-19) における MCP-1 ならびに CCR2 の発現を western blot 法にて比較検討する。また、これら細胞株を低酸素環境下 (酸素コントローラーを用いて FiO<sub>2</sub>: 5-10% を作製) や AngII type1 受容体 (AT1R) 阻害剤 (ARB), AngII 投与下で培養を続け、MCP-1/CCR2 の発現、PKC 等各種リン酸化酵素、AT1R、p53 等アポトーシス関連蛋白の変化を定量し、各種条件が MCP-1/CCR2 発現調節に与える影響に

ついて検討を行う。WST assay や TUNEL 法を用いて各種条件下における cell viability についても検討を行う。

(2) *in vivo* における MCP-1/CCR2 の発現の検討

各種膀胱癌細胞株によって MCP-1/CCR2 発現を検討した結果、典型的な培養株を選別し、ヌードマウスを用いた皮下腫瘍モデルを誘導する。皮下腫瘍誘導後、2 週から 4 週にかけてヌードマウスから皮下腫瘍を採取し、ホルマリン固定パラフィン包埋標本ならびに凍結標本を作製する。これら皮下腫瘍における MCP-1/CCR2 の発現を免疫組織染色ならびに western blot 法にて検討を行う。なお、AngII 1 型受容体阻害剤 (ARB: オルメサルタン) や DHMEQ (NF- $\kappa$ B 活性阻害剤) をこれら *in vivo* model に投与し、非投与群との腫瘍径の変化を比較検討する。最終的にはこれらの薬剤の皮下腫瘍に対する影響を調べるべく、免疫組織染色を行う。

(3) 膀胱癌、尿管癌、腎盂癌の個々の症例における MCP-1/CCR2 ならびに腫瘍関連マクロファージの発現を免疫組織染色にて検討を行う。また、剖検検体から採取された部位の MCP-1/CCR2 発現と腫瘍関連マクロファージの発現を免疫組織学的に検討し、原発巣との比較検討を行う。臨床検体ならびに剖検検体から採取されたホルマリン固定パラフィン包埋標本 (尿路上皮癌 271 例) を当研究室は保有しており、これに一致した病理組織所見、臨床所見はデータベース化されており、MCP-1/CCR2 発現との関連を統計解析することは可能と考えている。また、MCP-1/CCR2 の発現と転移能との相関が示唆されており、転移巣と原発巣で MCP-1/CCR2 発現を比較することや、転移の有無で原発巣における MCP-1/CCR2 の発現を比較することは意義の高いものと考えられる。

これまで申請者は前立腺癌の臨床検体を対象に MCP-1 の発現を免疫組織染色で調べ、泌尿

器病理医による評価を得て、MCP-1 の発現の高い前立腺癌術後は再発率が高いという結論を得た。本研究においても、同様の手法を用いて検討を進めていく予定である。

本研究の対象となる MCP-1 はケモカインとして、膀胱癌における微小環境において腫瘍免疫に関連し、研究結果を修飾する可能性がある。近年、免疫を抑制するための免疫チェックポイントを担う分子 PD1(Programmed death1)/PD-L1 などを標的にした免疫チェックポイント阻害薬 PD-1 抗体がヒト臨床応用に成功し注目されてきている。本年の米国臨床腫瘍学会(ASCO)において、シスプラチンを中心としたレジメンの化学療法後の転移性・進行性膀胱癌に対する第 1 相試験の中間成績が報告され、大変有望視される結果が報告された。PD-1 抗体は、活性化された T 細胞の抑制の解除により、腫瘍免疫を発揮し、抗腫瘍効果をもたらすと考えられているが、このような宿主の免疫学的要因が本実験系に関連する可能性があるため、研究が当初計画どおりに進まない時は、マウス膀胱癌モデルにおいて MBT2 を使用して、腫瘍免疫と MCP-1 の関連や MCP-1 と免疫チェックポイントとの関連について解析することで打開を図ることも計画している。

#### 4 . 研究成果

- 喫煙歴のある筋層非浸潤性膀胱癌患者では、術前の NLR (好中球、リンパ球比) が予後予測因子であることを明らかにした。
- 喫煙歴のある患者では、尿 ph が低いほど腎尿管全摘術後の膀胱内再発が高いことが明らかになった。
- シスプラチン耐性獲得後の膀胱癌の EMT 誘導には、ユビキチンリガーゼである FBX032 の発現抑制が深く関わっていることが明らかとなった。
- 去勢抵抗性前立腺癌患者では、単球の数値が予後因子として有用であることが示さ

れた。

- 尿路上皮癌の臨床検体における MCP-1、新生血管の発現ならびにアンジオテンシン受容体(AT1R)の発現について免疫組織染色を施行し、その予後との関連を確認した。
- シスプラチン耐性細胞を用いた検討では EMT 誘導にユビキチンリガーゼである FBX032 の発現が深く関わっていることが明らかとなった。

#### 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 10 件)

Kobayashi H, Kosaka T, Mikami S, Miyazaki Y, Matsumoto K, Kikuchi E, Miyajima A, Kameyama K, Sato Y, Oya M. Vasohibin-1 as a novel microenvironmental biomarker for patient risk reclassification in low risk prostate cancer. *Oncotarget*. 9: 10203-10210, 2017. 査読有り

Daimon T, Kosaka T, Kikuchi E, Mikami S, Miyazaki Y, Hashimoto A, Hashimoto S, Mizuno R, Miyajima A, Okada Y, Sabe H, Oya M. Urol Oncol. Prognostic significance of erythrocyte protein band 4.1-like5 expression in upper urinary tract urothelial carcinoma. 35: 543.e17-543.e24, 2017. 査読有り

Kosaka T, Hongo H, Miyazaki Y, Nishimoto K, Miyajima A, Oya M. Reactive oxygen species induction by cabazitaxel through inhibiting Sestrin-3 in castration resistant prostate cancer. *Oncotarget*. 8: 87675-87683, 2017. 査読有り

Kim H, Inomoto C, Uchida T, Furuya H, Komiyama T, Kajiwara H, Kobayashi H,

Nakamura N, Miyajima A. Verification of the International Society of Urological Pathology recommendations in Japanese patients with clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol*. 52: 1139-1148, 2017. 査読有り

Ogihara K, Kikuchi E, Yuge K, Yanai Y, Matsumoto K, Miyajima A, Asakura H, Oya M. The Preoperative Neutrophil-to-lymphocyte Ratio is a Novel Biomarker for Predicting Worse Clinical Outcomes in Non-muscle Invasive Bladder Cancer Patients with a Previous History of Smoking. *Ann Surg Oncol*. 23: 1039-1047, 2016. 査読有り

Ide H, Kikuchi E, Hagiwara M, Hayakawa N, Hongo H, Miyajima A, Oya M. Urinary pH Levels are Strongly Associated with Bladder Recurrence After Nephroureterectomy in Upper Tract Urothelial Carcinoma Patients with a Smoking History. *Ann Surg Oncol*. 23: 1029-1038, 2016. 査読有り

Shigeta K, Kosaka T, Kitano S, Yasumizu Y, Miyazaki Y, Mizuno R, Shinojima T, Kikuchi E, Miyajima A, Tanoguchi H, Hasegawa S, Oya M. High Absolute Monocyte Count Predicts Poor Clinical Outcome in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer Treated with Docetaxel Chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 23: 4115-4122, 2016. 査読有り

Tanaka N, Kosaka T, Miyazaki Y, Mikami S, Niwa N, Otsuka Y, Minamishima YA, Mizuno R, Kikuchi E, Miyajima A, Sabe H, Okada Y, Uhl P, Suematsu M, Oya M. Acquired platinum resistance involves epithelial to mesenchymal

transition through ubiquitin ligase FBX032 dysregulation. *JCI Insight*. 1: e83654, 2016. 査読有り

Miyajima A, Kosaka T, Kikuchi E, Oya M. Renin-angiotensin system blockade: Its contribution and controversy. *Int J Urol*. 22: 721-730, 2015. 査読有り

Miyajima A, Yazawa S, Kosaka T, Tanaka N, Shirotake S, Mizuno R, Kikuchi E, Oya M. Prognostic Impact of Renin-Angiotensin System Blockade on Renal Cell Carcinoma After Surgery. *Ann Surg Oncol*. 22: 3751-3759, 2015. 査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

宮嶋 哲 加齢に伴う腎泌尿器疾患における RAS 阻害。第 9 回眼抗加齢医学研究会講習会(招待講演)2015.

〔図書〕(計 2 件)

宮嶋 哲 系統看護学講座専門分野 II 成人看護学 8 第 14 版 腎・泌尿器：尿路性器の腫瘍；医学書院 2017, 12 ページ (p.175-186)。

宮嶋 哲 Urologic Surgery Next 腹腔鏡手術 第 1 版 単孔式腹腔鏡下手術のコツ メヂカルビュー社 2018, 5 ページ (p.73-77)。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://uro.med.u-tokai.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮嶋 哲 (MIYAJIMA, Akira)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90245572

(2)研究分担者

菊地 栄二 (KIKUCHI, Eiji)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：10286552

小坂 威雄 (KOSAKA, Takeo)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30445407

松本 一宏 (MATSUMOTO, Kazuhiro)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80366153

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし