

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20085

研究課題名(和文) 転移巣に注目した治療抵抗性尿路上皮癌に対する新規治療標的因子の探索

研究課題名(英文) Identification of new therapeutic items for drug resistant metastatic urothelial carcinoma

研究代表者

河嶋 厚成 (Kawashima, Atsunari)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：50746568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：網羅的遺伝子発現解析より、転移を有し死亡に至る症例において細胞周期や転写に関与する遺伝子群が有意に上昇している結果を見出した。同サンプルから癌組織内リンパ球を抽出し、細胞表面分子発現に基づいて免疫状態の分類を行ったところ、転移を認めない症例では細胞表面分子発現がその他の2群と比較して有意に低い結果となった。膀胱癌ではgenome instabilityを有しているといわれており、我々の解析結果でも癌組織内免疫担当細胞の発現様式に影響を及ぼしていることが判明した。現在膀胱癌においても抗PD-1抗体を始めとする新規免疫療法が有効な治療法とされており、今後更なる解析が必要であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Microarray analysis showed that several genes correlated with cell cycle and transcription were up-regulated in the metastatic urothelial carcinoma with poor prognosis. Moreover, immunological classification in the tumor micro environment was classified into two groups significantly correlated with prognosis and tumor grade. Especially, some genes, which were reported to induce genome instability in urothelial carcinoma, was significantly correlated with prognosis and immunological classification. This result showed that new immunological agents such as anti PD-1 antibody was ideal agents in some metastatic urothelial carcinoma patients.

研究分野：泌尿器科

キーワード：尿路上皮癌

1. 研究開始当初の背景

局所浸潤性膀胱癌や転移を伴う進行性膀胱癌は、尿路上皮癌である膀胱癌の中でも予後不良群に位置づけられており、根治的局所治療に加え化学療法を用いた集学的治療が必要とされる。現在では、原発巣に対して術前補助化学療法併用膀胱全摘除術もしくは抗癌剤併用放射線療法を、転移巣に対しては抗癌剤治療を初期治療として行う。

近年、膀胱癌の臨床検体を使用した包括的なデータ解析から膀胱癌発癌のメカニズムや浸潤性膀胱癌における分子機構が明らかになりつつあり、乳癌と類似した3タイプの遺伝子発現群に層別化されることが報告されている。その中でも乳癌の Luminal type に分類される遺伝子群は、膀胱癌において予後不良とされる浸潤性膀胱癌症例 (Gui Y. et al. Nat Gene 2011, TCGA Research Network. Nature 2014) や、術前補助化学療法に対する治療効果が低い症例 (Damrauer JS. PNAS 2014, Chi W. Cancer Cell 2014) において高発現が認められることが報告されており、網羅的な遺伝子発現解析による層別化が予後予測因子や治療効果予測因子の同定に必要である。

一方、転移巣に対する抗癌剤治療は5割から6割で一定の治療効果は認めるものの、完全治癒は期待できず、予後不良である。二次治療以降の新規薬剤として分子標的薬をはじめとする様々な治療薬が使用されているものの、過去10年間治療成績は変わっておらず新規治療標的因子の探索が必要である。通常、転移巣は多発性であり、転移部位において抗癌剤による治療効果が異なることが一般的であり、癌における Tumor heterogeneity は、治療戦略を考える上で非常に重要なポイントとなる。前立腺癌では、転移巣病変は monoclonal origin の可能性があるものの、原発巣とは必ずし

も一致しない (Liu W. Nature Medicine 2009) ことや、腎細胞癌において転移巣は原発巣の一部の病変部位のみと同じ遺伝子発現を示すことが報告されており (Gerlinger M. N Engl J Med. 2012)、転移病変を治療する上で、原発巣の遺伝子発現解析を用いた治療標的因子の探索や予後予測因子の同定は信頼性に欠けると考えられる。転移症例を治療するに当たって、転移巣切除や生検が必須の検査として行われていない尿路上皮癌において、転移巣を用いた包括的な遺伝子解析は現在まで認めておらず、転移巣に注目した網羅的遺伝子解析が重要である。

2. 研究の目的

浸潤性膀胱癌を始めとする有転移性尿路上皮癌に対して化学療法を施行した患者群の中で、転移巣切除術を施行した患者に注目し、同一患者から治療前原発巣、治療後原発巣および治療後の転移巣を抽出し、組織形態を確認のうえ、トランスクリプトーム包括的解析およびターゲットシーケンスを行い、その遺伝子発現状況から、新規治療標的因子の探索を行う。

3. 研究の方法

(方法)

未治療原発巣 化学療法施行後原発巣 化学療法施行後転移巣の FFPE 標本から mRNA および DNA を抽出する。

(解析方法)

mRNA よりトランスクリプトームの包括解析、および DNA よりターゲット次世代シーケンスを行う。上記の結果から得られた候補遺伝子に対して、

1)膀胱癌細胞株、マウス異所性移植モデルを使用した遺伝子機能解析と新規治療標的因子の探索

2)Bioinformatics を使用した Network Analysis による各病変におけるクローン解析を行い、標的因子を有した新規治療標的因子の探索を行う。

4 . 研究成果

解析サンプルの選択及び DNA・RNA 抽出。14 サンプル(原発巣 10 例・リンパ節転移 4 例) から total RNA を抽出し、 の解析を行った。

上記についてマイクロアレイ解析を行ったところ、転移およびその後の再発を認めない症例(n=3)、転移を有する症例(n=4)、転移を有し死亡に至った症例(n=3)での発現比較を行うことが可能であった。その結果、細胞周期や転写に関与する遺伝子群が有意な変化を認めていた。

また、同時に同サンプルから癌組織内リンパ球を抽出し、細胞表面分子発現に基づいて免疫状態の分類を行った。評価した項目は CD4, CD8,免疫チェックポイント分子である PD-1,Tim-3, 免疫共役分子である ICOS, 4-1BB, OX40 の 7 項目を一度のフローサイトメトリーで解析した。その結果、腫瘍組織内では各表面マーカーの発現が、血液内や正常組織内と比較して有意に上昇していること、腫瘍の悪性度と相関して、CD8+Tim-3+の発現および CD4+4-1BB+及び CD8 + 4-1BB+の発現が上昇することが示された。また、これらのマーカーを元にクラスター解析を行ったところ、表面マーカーの発現が高い群と低い群の 2 群に大別され、この群間と相関する臨床項目として腫瘍の悪性度が得られた。一方、原発巣と一致したリンパ節転移症例についても、同様の解析を行ったところ、リンパ節転移を有する症例のリンパ節とリンパ節転移を有しない症例のリンパ節における表面マーカー発現パターンは大きく異なり、リンパ節転移陽性症例では、腫瘍局所内におけるリンパ球

表面分子発現パターンと酷似していることが判明した。原発巣局所内のリンパ球発現パターンについては、リンパ節転移を認めない症例ではリンパ球細胞表面分子発現がその他の 2 群と比較して有意に低い結果となった。膀胱癌では、遺伝子発現に基づいて乳がんと同様に 4 群に大別されると報告されており、特にその中で SCC like や p53 関連について FOXM1 や PLK1 の発現で代表される genome instability を有しているといわれている。今回の我々の解析結果でも、転移を有し死亡に至った症例は FOXM1 の発現が高いことから、癌細胞の genome instability が癌組織内免疫担当細胞の発現様式に影響を及ぼしていること、又転移巣においても癌微小環境におけるリンパ球発現が原発巣と類似していることが判明した。現在膀胱癌においても抗 PD-1 抗体を始めとする新規免疫療法が有効な治療法とされており、今後更なる解析が必要であると考えている。

DNA に対する膀胱癌に特徴的な遺伝子をターゲットとした次世代シーケンス。TCGA Research Network のデータベースより特に p53 の mutation の割合が高いことに注目し、genome instability との関係を明らかにするため、ターゲットシーケンスを施行予定としている。

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)

[学会発表](計 1 件)

河嶋厚成他 尿路上皮癌における腫瘍浸潤 T 細胞サブセット解析 泌尿器分子細胞研究会 2017.3.10 大分全労済ソレイユ(大分)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河嶋 厚成 (Atsunari Kawashima)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：50746568