

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20110

研究課題名(和文)尿路上皮癌における抗がん剤耐性下の癌微小環境変化の解明

研究課題名(英文)The importance of regulation of the tumor microenvironment in cisplatin-resistant urothelial carcinoma

研究代表者

丹羽 直也(Niwa, Naoya)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40626743

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)：尿路上皮癌細胞株5637とCDDP耐性尿路上皮癌細胞株5637PRにTNF- $\alpha$  induced protein (TNFAIP2)をノックダウン・過剰発現させたところ、TNFAIP2の発現上昇・低下に伴い上皮間葉転換関連因子の発現抑制・亢進が認められた。上部尿路上皮癌の臨床検体を用いてTNFAIP2の免疫組織学的評価では、TNFAIP2の高発現は有意に予後と関連していた。更にTNFAIP2の発現上昇・低下に伴い*in vitro*において癌細胞の浸潤能が亢進・抑制されることが確認され、TNFAIP2を介した癌微小環境の制御の重要性並びに新規治療標的となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Knockdown and overexpression of TNF- $\alpha$  induced protein 2 (TNFAIP2) in 5637 and its subline 5637PR with acquired platinum resistance resulted in suppression and overexpression of epithelial-mesenchymal transition related proteins, respectively. Immunohistochemical analysis in surgical specimens revealed that the expression of TNFAIP2 is significantly associated with oncologic outcome in patients with urothelial carcinoma. Moreover, overexpression and suppression of TNFAIP2 resulted in promotion and inhibition of cancer cells, respectively. These results suggested the importance of the regulation of the tumor microenvironment by targeting TNFAIP2 and its potential as a new therapeutic target.

研究分野：尿路悪性腫瘍

キーワード：尿路上皮癌 癌微小環境 上皮間葉転換 シスプラチン 抗癌剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

転移・再発性尿路上皮癌に対する初回治療はシスプラチン(CDDP)を基盤とした多剤併用化学療法である。しかしこれらファーストラインの治療効果は限定的であり、一時的な奏功を認めた場合であっても、その後進行する。セカンドラインとして他の抗がん剤あるいは分子標的薬を用いたレジメンが開発され、第三相試験が行われてきたが、いまだ確立したエビデンスを持つ治療法はない。このCDDP抵抗性尿路上皮癌は、現代の癌医療において対策が急務とされる、難治性癌の一つと考えられる。

近年、癌の治療標的として血管新生や上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)を中心とした癌微小環境が注目されており、当教室でも泌尿器科癌において検討を重ねてきた。我々は今回、特にCDDP治療によって誘導される癌微小環境の変化とその誘導因子に着目し、これらの分子的基盤を解明し、癌微小環境を制御することが、CDDP耐性尿路上皮癌の克服に繋がると考えた。

## 2. 研究の目的

尿路上皮癌細胞株 5637 と当教室で独自に樹立した CDDP 耐性尿路上皮癌細胞株 5637PR を、マイクロアレイ解析を用いて網羅的に遺伝子発現を解析したところ、CDDP 耐性獲得に伴い発現が変化する遺伝子を抽出し、その中で TNF-誘導タンパクである TNF- $\alpha$  induced protein 2 (TNFAIP2) が CDDP 耐性獲得に伴い発現上昇していることに注目した。

予備検討において、Western-blots 法を用いて 5637 と 5637PR における蛋白発現を比較したところ、5637PR において TNFAIP2 の有意な蛋白発現上昇が確認された。また細胞染色においても、5637PR において TNFAIP2 の発現上昇が確認された。更には尿路上皮癌手術検体を用いた免疫組織学的染色においても、

High grade/stage 症例において TNFAIP2 の発現が高い可能性が示唆された。本研究は、CDDP 耐性化における TNFAIP2 の発現上昇を介した癌微小環境の変化の分子的基盤の解明が目的である。

## 3. 研究の方法

H27 年度：慶應義塾大学病院における尿路上皮癌のデータベースを基に、尿路上皮癌臨床検体を用いて TNFAIP2 およびその他の血管新生・EMT 関連マーカーの発現に関して免疫組織化学的染色を用いて評価した。予備的検討からは臨床検体数を大幅に増加させ、術後再発や予後との相関に関して既存の臨床病理学的因子を含めて詳細な検討を行った。また 5637 および 5637PR 細胞において TNFAIP2 をノックダウン並びに過剰発現させ、血管新生並びに EMT 関連因子の発現との関係性を評価した。

H28 年度：慶應義塾大学病院における尿路上皮癌のデータベースを基に、術前化学療法を施行された症例を抽出、化学療法前後の臨床検体を用いて免疫組織化学的に TNFAIP2 および他の EMT 関連マーカーの発現の変化について評価した。また 5637 と 5637PR に TNFAIP2 ノックダウン・過剰発現を行い、実際に細胞の形質変化の一つとして浸潤能の変化について Matrigel invasion assay を用いて検討した。

## 4. 研究成果

H27 年度：最終的に 150 例を超える上部尿路上皮癌の臨床検体を用いて TNFAIP2 の免疫組織学的染色・評価を行った。予備的検討と同様に、High grade/stage 尿路上皮癌では TNFAIP2 の発現が有意に高いことが確認された。更に TNFAIP2 の発現の程度に注目した後ろ向き解析では、TNFAIP2 の高発現は術後再発や癌特異的生存率と関連していた。既存の臨床病理組織学的因子を加えた多変量解析

では、TNFAIP2 の高発現は術後再発や癌特異的生存率に関連する独立した危険因子であった。5637 と 5637PR に TNFAIP2 をノックダウン・過剰発現させたところ、TNFAIP2 の発現上昇・低下に伴い EMT 関連因子の発現抑制・亢進が確認された。

H28 年度：術前化学療法前後の尿路上皮癌臨床検体を用いて、化学療法前後の TNFAIP2 の発現変化を免疫組織化学染色で評価したところ、CDDP 治療後では残存腫瘍において TNFAIP2 の発現が上昇する傾向を認めた。一方、E-cadherin は低下傾向であり、CDDP 治療後の残存腫瘍における EMT 誘導が示唆された。Matrigel invasion assay では TNFAIP2 の発現上昇・低下に伴い In vitro において癌細胞の浸潤能が亢進・抑制されることが確認された。即ち、TNFAIP2 の発現を制御することで癌の浸潤を抑制できる可能性があり、TNFAIP2 を介した癌微小環境の制御の重要性並びに CDDP 治療後の再発転移性尿路上皮癌の新規治療標的となりうる可能性が示唆された。

#### 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 1 件 )

(1) Niwa N, Matsumoto K, Hayakawa N, Ito Y, Maeda T, Akatsuka S, Masuda T, Nakamura S, Tanaka N. Comparison of outcomes between ultrasonography and cystoscopy in the surveillance of patients with initially diagnosed TaG1-2 bladder cancers: A matched-pair analysis. Urol Oncol. 2015;33(9):386.e15-21. 査読有 doi: 10.1016/j.urolonc.2015.04.018.

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

(1) Niwa N, Matsumoto K, Tanaka N, Hayakawa N, Ito Y, Maeda T, Akatsuka S, Masuda T, Nakamura S, Oya M. Comparison of outcomes

between ultrasonography and cystoscopy in the surveillance of patients with low- or intermediate-risk non-muscle invasive bladder cancers. 2016 年米国泌尿器科学会, サンディエゴ(USA), 2016/5/7

(2) Niwa N, Kikuchi E, Matsushima M, Tanaka N, Nishiyama T, Miyajima A, Saito S, Oya M. Are calculated formulas for estimating renal function adequate for administered cisplatin-based chemotherapy in solitary renal patients after nephroureterectomy for upper urinary tract urothelial carcinoma? 2016 年米国泌尿器科学会, サンディエゴ(USA), 2016/5/7

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 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 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www.keio-urology.jp>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

丹羽 直也 ( NIWA NAOYA )

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40626743