

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20122

研究課題名(和文) 尿路上皮癌微小転移に対するAKR1C1を標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) To develop a new therapeutic method targeting AKR1C1 for urothelial carcinoma micrometastasis

研究代表者

松本 隆兎(Matsumoto, Ryuji)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：10762536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：AKR1C1阻害効果のあるフルフェナム酸やメフェナム酸といったフェナム酸系の非ステロイド性抗炎症薬には、膀胱癌細胞のシスプラチン感受性増大効果と細胞浸潤能抑制効果を認めた。臨床検体を用いた検討では、尿路上皮癌転移巣で原発巣に比べAKR1C1は有意に発現亢進しており、AKR1C1阻害剤による転移抑制効果、転移巣に対する抗癌剤治療効果増強が期待される結果であった。現在、マウスに両剤併用投与観察中であり、フェナム酸の適用量を検討している。

研究成果の概要(英文)：The effect of increasing bladder cancer cell cisplatin sensitivity and suppressing cell invasion capacity was observed in fenamic acid type nonsteroidal anti-inflammatory drugs such as flufenamic acid and mefenamic acid which have AKR1C1 inhibitory effect. In the study using clinical specimens, AKR1C1 was significantly increased in urothelial carcinoma metastatic site compared with primary site, and the effect of suppressing metastasis by the AKR1C1 inhibitor and enhancing the anticancer drug therapeutic effect on the metastatic lesion was expected. Currently, it is under observation that cisplatin and fenamic acid are administered to mice, and the application amount of fenamic acid is being studied.

研究分野：泌尿器科

キーワード：尿路上皮癌 転移 薬剤耐性 AKR1C1

1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌は根治的外科切除後も転移・再発率は高く予後不良な疾患である。尿路上皮癌の治療成績向上のために、根治手術においては微小転移の除去を目的とした拡大リンパ節郭清が試みられているが、血行性転移に対する治療効果を上げるためには術前・術後の化学療法を組み合わせる必要がある。膀胱癌に対する術前化学療法で治療成績が向上するという報告があるが、一方で最近では術前化学療法で生存率改善に有意差を認めなかったという報告もあり、術後化学療法については治療的意義が限定的といわれている。以上より、再発の予防も含め、転移および抗癌剤耐性のメカニズムに基づく治療法の開発が喫緊の課題となっている。

申請者は、独自に開発した膀胱癌同所性移植転移モデルから、膀胱癌転移細胞で抗癌剤耐性遺伝子の一つである AKR1C1 が高発現していること、細胞実験からは AKR1C1 が膀胱癌の浸潤・転移に関連していることを見出している。これらの結果より、術前抗癌剤治療に AKR1C1 を標的とした治療を追加することによって、原発巣に対する効果増強のみならず、リンパ行性あるいは血行性微小転移を減らせる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

これまでの申請者の研究から、AKR1C1 の発現を siRNA 法で抑制すると細胞浸潤能が低下すること、AKR1C1 の発現亢進には癌周囲の炎症性サイトカインが関与すること、様々な膀胱癌シスプラチン耐性株で AKR1C1 が発現亢進していること、AKR1C1 が高発現している肝転移細胞・骨転移細胞ではシスプラチンに対する耐性が親株に比べ増していることが判明している。また少数例ではあるが、実際の臨床検体を用いた免疫組織化学染色による AKR1C1 発現の評価で、リンパ節、肺、肝などの転移巣における発現亢進を確認している。これらの結果は、膀胱癌の浸潤・転移・抗癌剤耐性と AKR1C1 発現の関連が示唆されるものである。

AKR1C1 を含む AKR1C 遺伝子は、多くの癌種において抗癌剤耐性遺伝子として知られており、AKR1C 阻害剤による抗癌剤の効果増強についても報告されている。本研究では、適切な AKR1C1 阻害剤の同定と治療効果を in vivo で検証すること、および臨床検体を用いた尿路上皮癌における AKR1C1 発現変化に関する検証を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膀胱癌細胞株における AKR1C1 阻害剤の抗癌剤増強効果

申請者が樹立した膀胱癌肝転移細胞・骨転移細胞は AKR1C1 遺伝子が発現上昇しており、親株に比べシスプラチン耐性能が亢進していたが、AKR1C1 阻害剤であるフルフェナ

ム酸 10 μ M 投与によりシスプラチンの効果は上昇を確認しており、これは転移細胞における抗癌剤耐性能の亢進に AKR1C1 が関与していることを示唆する。まず、7 種類の膀胱癌細胞株の AKR1C1 発現量を確認し、シスプラチン感受性と関連するかを確認する。AKR1C 阻害剤としてフルフェナム酸以外に非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)であるメフェナム酸、インドメタシンなどが報告されているが、これら NSAIDs に膀胱癌細胞株および膀胱癌シスプラチン耐性株に対するシスプラチンとの併用効果について検証し、最も有効な薬剤を明らかにする。また、AKR1C1 は細胞浸潤能を制御していることがこれまでの siRNA 法を用いた研究で判明しており、本検討によって見出した薬剤に細胞浸潤能抑制効果があるかを評価する。方法としては、Matrigel invasion assay を用いて、AKR1C1 阻害剤添加の有無で膀胱癌細胞の浸潤能を比較する。

(2) 尿路上皮癌における AKR1C1 発現変化に関する研究

臨床検体を用いて原発巣とリンパ節・肺・肝・骨転移巣における AKR1C1 発現比較を免疫組織化学染色法で検証し、実際に AKR1C1 が転移巣で有意に発現亢進していることを証明する。また、尿路上皮癌の抗癌剤治療前後での AKR1C1 の発現変化について免疫組織化学染色法で検証し抗癌剤投与の影響について確認するとともに、抗癌剤の効果と AKR1C1 の発現量が相関するかを調べる。

(3) 同所性移植モデルにおけるシスプラチンおよび AKR1C1 阻害剤の投与スケジュールの検討

申請者は luciferase-2 が組み込まれたヒト浸潤性膀胱癌細胞株 UM-UC-3 を用いて、同所性移植マウスモデルによる in vivo 実験系を確立している。本研究においては、シスプラチンと AKR1C1 阻害剤の併用による効果を見出すことを目的としているが、まずそれぞれの薬剤の制癌効果を同所性移植マウスモデルを用いて検証する。具体的には、膀胱癌細胞をヌードマウス膀胱内に接種後 3 週間の時点で、それぞれの薬剤をいくつかの投与量にふってマウスに経口あるいは経腹膜的投与し、その後 4 週間まで毎週 IVIS imaging system を用いて膀胱原発巣の発光を評価することで薬剤効果を検証する。癌細胞接種後 7 週間の時点で全てのマウスを犠牲死させ、循環腫瘍細胞、リンパ節・肺・肝臓の転移について IVIS を用いて評価する。

(4) 同所性移植モデルを用いた AKR1C1 阻害剤併用効果の検討

シスプラチンと AKR1C1 阻害剤の併用による原発巣に対する評価および転移巣の評価をおこなう。投与スケジュールは上記 3) で検討したなかで最適な投与量と予測されるも

のを用いる。

4. 研究成果

(1) 膀胱癌細胞株における AKR1C1 阻害剤の抗癌剤増強効果

7種類 of 膀胱癌細胞株における AKR1C1 発現とシスプラチン感受性に関連は認めなかった。膀胱癌転移細胞と膀胱癌シスプラチン耐性細胞において、AKR1C1 阻害剤であるフルフェナム酸投与によるシスプラチンの効果増強および、マトリゲルインページョンアッセイによって細胞浸潤能を抑制することを確認できた。また、メフェナム酸においても、同様な効果を認めたが、一方他の AKR1C1 阻害剤であるフェノールフタレイン・インドメタシン投与では、シスプラチンの効果増強および細胞浸潤抑制は認めなかった。

(2) 臨床検体を用いた尿路上皮癌における AKR1C1 発現変化に関する検討

尿路上皮癌に対して根治手術を行いリンパ節転移を認めた症例と転移巣切除を施行した症例、計 25 例に免疫組織化学染色による AKR1C1 発現の評価を行った。結果 25 例中 17 例で転移巣での AKR1C1 発現亢進を認め、Mann-Whitney U-test を用いて検討した結果統計学的有意差を認めた。一方、抗癌剤の効果と AKR1C1 の発現量について検討したが、両者に相関を認めなかった。

(3) 同所性移植モデルを用いた抗癌剤と AKR1C1 阻害剤併用効果の検討

Luciferaes-2 が恒常的に発現維持している浸潤性膀胱癌細胞株 UM-UC-3-luc2 をヌードマウスに同所性移植し、膀胱内での増殖を確認し、その後フルフェナム酸あるいはシスプラチンを投与した。フルフェナム酸単剤では、膀胱癌は進行し7週以内に癌死したマウスもいたが、シスプラチン投与群(6mg/kg、週1回投与)では一時的に癌病巣は縮小を示すもののその後再増大を認めた。今後、フルフェナム酸とシスプラチン併用投与による効果の検討を行う予定である。

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)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1) Abe T, Takada N, Kikuchi H, Matsumoto R, Osawa T, Murai S, Miyajima N, Maruyama S, Shinohara N. Perioperative morbidity and mortality of octogenarians treated by radical cystectomy-a multi-institutional retrospective study in Japan. Jpn J Clin Oncol. 2017 Aug 1 (査読有)

2) Abe T, Ishizaki J, Kikuchi H, Minami K, Matsumoto R, Harabayashi T, Sazawa A, Mochizuki T, Chiba S, Akino T, Murakumo M,

Miyajima N, Tsuchiya K, Maruyama S, Murai S, Shinohara N. Outcome of metastatic urothelial carcinoma treated by systemic chemotherapy: Prognostic factors based on real-world clinical practice in Japan. Urol Oncol. 2017 Feb;35 (査読有)

3) Matsumoto R. Editorial Comment to Risk stratification using Bmi-1 and Snail expression is a useful prognostic tool for patients with upper tract urothelial carcinoma. Int J Urol. 2016 Dec;23 (査読無)

4) Abe T, Matsumoto R, Shinohara N: Role of surgical consolidation in metastatic urothelial carcinoma. Curr Opin Urol. 2016 Nov 26 (査読有)

5) Matsumoto R, Tsuda M, Yoshida K, Tanino M, Kimura T, Nishihara H, Abe T, Shinohara N, Nonomura K, Tanaka S. Aldo-keto reductase 1C1 induced by interleukin-1 mediates the invasive potential and drug resistance of metastatic bladder cancer cells. Sci Rep. 2016 Oct 4 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 松本隆児、安部崇重、高田徳容、三浪圭太、原林透、菊地央、大澤崇宏、丸山覚、篠原信雄 上部尿路癌に対する腹腔鏡下腎尿管全摘除術+所属リンパ節郭清の治療成績 第31回日本泌尿器内視鏡学会総会、徳島市、2017/11/17

2) 転移性尿路上皮癌二次化学療法における予後因子の検討
松本隆児、安部崇重、石崎淳司、菊地央、原林透、三浪圭太、佐澤陽、望月端吾、千葉智市、秋野文臣、村雲雅志、宮田遥、大澤崇宏、丸山覚、村井祥代、篠原信雄
第55回日本癌治療学会学術集会 横浜市、2017/10/20

3) 松本隆児、安部崇重、高田徳容、三浪圭太、原林透、永森聡、宮島直人、土屋邦彦、丸山覚、篠原信雄 膀胱全摘術における拡大リンパ節郭清の意義 第104回日本泌尿器科学会総会 シンポジウム：膀胱全摘術：アウトカムの改善に何が必要か?、仙台市、2016/4/24

4) 松本隆児、安部崇重、石崎淳司、大澤崇宏、菊地央、丸山覚、土屋邦彦、宮島直人、篠原信雄 進行性尿路上皮癌の治療戦略～Oligometastasis に対する転移巣切除術 第104回日本泌尿器科学会総会 シンポジウム：進行性尿路上皮癌に対する集学的治療戦略、仙台市、2016/4/25

〔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〕

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本隆児 (MATSUMOTO RYUJI)
北海道大学・医学研究院・助教
研究者番号: 10762536