

令和元年5月23日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16812

研究課題名(和文)膀胱癌における癌幹細胞の制御を標的とした新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) The establishment of new therapeutic strategy for bladder cancer targeting to cancer stem cell

研究代表者

荻原 広一郎 (Ogihara, Koichiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：30626677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：臨床組織切片を用いた免疫染色で癌幹細胞マーカーであるCD44vの発現と生命予後の関係を評価したところ、筋層浸潤性膀胱癌ではCD44vの発現は独立した予後不良因子であった。次に癌幹細胞の制御可能な薬剤であるsulfasalazineを用いて検討を行った。膀胱癌細胞株にsulfasalazineを投与すると濃度依存的な抗腫瘍効果を認め、シスプラチンとの併用でその効果が増強された。最後にマウス膀胱癌同所性モデル及び異所性肺転移モデルを使用した実験でも、in vitro同様sulfasalazineの抗腫瘍効果とシスプラチン増強効果をそれぞれ認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において癌幹細胞マーカーであるCD44vの発現が膀胱癌の独立した予後因子であることを示し、そのCD44vに関連した治療抵抗性膀胱癌に対する新規治療としてsulfasalazineを用いた治療の確立が可能であることが示唆された。

癌幹細胞は膀胱癌だけでなく、消化器癌をはじめとする多くの癌に存在している。本研究の成果は癌研究に及ぼす波及効果はもちろんのこと、他疾患における新規治療の新たな切り口となり得るため、その波及効果は非常に大きいと推測される。

研究成果の概要(英文)：CD44v protein expression was examined immunohistochemically in muscle invasive bladder cancer (MIBC) patients who underwent radical cystectomy. CD44v expression was independently associated with disease recurrence and cancer-specific death in MIBC. Sulfasalazine (SSZ) exerted cytotoxic effects against bladder cancer cells. SSZ in combination with cisplatin (CDDP) appeared to exert strong cytotoxic effects. The inhibitory effects of SSZ with or without CDDP were investigated using murine lung metastatic models. The combination of SSZ with CDDP exerted stronger inhibitory effects on the establishment of lung tumor nodules than SSZ or CDDP alone. The inhibitory effects of SSZ was also investigated using murine orthotopic models. Bladder weight in mice treated with SSZ was significantly lower than that in mice treated with vehicle control.

研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌 癌幹細胞 CD44 sulfasalazine シスプラチン 膀胱内注入療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、癌における治療抵抗性や再発、転移には癌幹細胞の存在が関与すると考えられてきている。この癌幹細胞を分離するために様々な癌腫においてマーカー検索やその特性について研究が行われており、膀胱癌においてもその例外ではない。しかしながら他癌と比較した時に膀胱癌の腔内再発という再発様式の特異性から最も多い膀胱内再発の機序における癌幹細胞の役割について言及した報告は未だにない。様々な癌腫において現在、癌幹細胞を標的とした治療戦略が研究されている中、膀胱内再発の予防においても癌幹細胞が新たな治療の標的となりうるかを評価する上で癌幹細胞に着目した膀胱内再発の機序解明は急務である。膀胱癌の腔内再発は経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TUR-BT) を行い、肉眼的には膀胱癌がない状態から再度発生する。その機序として考えられているのが monoclonal clone が intraluminal seeding されることにより発症するとする説と膀胱癌周囲の粘膜が原発巣と同じ遺伝子変異を来しているとする field defect の二説があるが確定しておらず、その両者が再発には混在するとする考えが主流である。このような特殊な再発様式をとる膀胱癌において再発を癌幹細胞仮説に基づいて説明するには発癌における癌幹細胞の役割についての研究が必要と考える。近年、Ishimoto らの報告で消化器癌において新たな癌幹細胞マーカーとして報告がある CD44 のバリエーションアイソフォーム (CD44v) が癌細胞の Reactive Oxygen Species (ROS) に対する抵抗性を亢進する機能を持ち、癌の治療抵抗性や転移に寄与することが分かった (Ishimoto T et al, Cancer Cell, 2011)。また消化器癌において CD44v 発現が予後に関与することが報告されている (Xia P et al, Oncotarget, 2016)。腎盂尿管癌の臨床摘出検体を対象とし、当教室が行なった免疫組織学的染色による統計学的検討の結果も CD44v 発現が予後に影響する結果であった (Hagiwara M et al, Urol Oncol, 2016)。このように尿路上皮癌においても癌の経過と癌幹細胞との関与が予測される。また現在、様々な癌腫において癌幹細胞を標的とした治療についても検討されている。その一つとして炎症性腸疾患に対する経口治療薬である sulfasalazine がある。sulfasalazine は炎症性腸疾患に対する治療薬として用いられる一方、xCT の阻害剤としての報告がある。Ishimoto らの報告では前述した新規癌幹細胞マーカーである CD44v は xCT の機能を亢進し、細胞内へのシスチンの取り込みを増加させる (Ishimoto T et al, Cancer Cell, 2011)。シスチンは ROS のスカベンジャーの一つであるグルタチオン (GSH) の前駆体であり、CD44v 発現はシスプラチンのような ROS を介した抗腫瘍効果を示す抗癌剤に対する治療抵抗性の原因の一つと考えられる。CD44v-xCT の経路を sulfasalazine により阻害することで癌幹細胞の制御が期待できると考え、本研究を着想し得るに至った (Fig.1)。

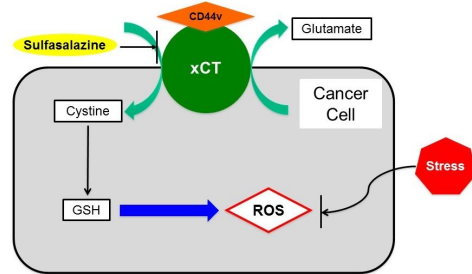


Fig.1 癌幹細胞と CD44v-xCT system

### 2. 研究の目的

筋層非浸潤性膀胱癌の再発及び進展の予防に関しては抗癌剤膀胱内注入と BCG 膀胱内注入療法以外の有効なレジメンが乏しい。BCG 膀胱内注入療法はその強い副作用が大きな問題の一つとされているが、その一方で副作用の少ない抗癌剤膀胱内注入はその弱い再発および進展予防効果が問題となる。故により根治性の高い癌治療の開発は我々に課せられた急務の課題である。一方抗癌剤治療に対する宿主の防御機構、抗癌剤耐性機序の解明は、新規治療戦略の確立に際し重要である。自己複製能を持ち、異なる分化段階の細胞を産生する能力を有する癌幹細胞は既存の化学療法や放射線療法に対し抵抗性を持つことが示唆されている。また抗癌剤耐性を獲得した癌細胞は炎症を伴い、癌進展を加速させる。本研究において癌幹細胞の発現と膀胱癌との予後との関連、癌幹細胞が抗癌剤耐性機序に及ぼす影響、膀胱癌の最も重要なリスク因子である喫煙が抗癌剤耐性獲得や癌幹細胞へ直接与える影響を検討し、さらにシスチントランスポーターの阻害剤として癌幹細胞の制御が期待できる炎症性腸疾患の経口内服薬である sulfasalazine に着目し、これを用いた膀胱癌に対する新規治療戦略の確立を研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

まずは当教室で作成された臨床データベース及び未染のプレパラートを用いて、膀胱癌における CD44v の発現と腫瘍の進展・予後との関連につき臨床的・組織学的検討を行った。当教室は今まで尿路上皮癌のデータ集積を精力的に進めてきており尿路上皮癌の多数の臨床データ及び未染の病理プレパラート (N=250) を所有している。それらすべての病理組織所見は一人の泌尿器病理医により再レビューされ、均一化された一貫性のあるデータベースが存在する。本データベースを用いて当教室では壁内脈管浸潤と癌生存との関連 (Kikuchi E et al, J Urol, 2005)、Snail の発現と転移の関連 (Kosaka T et al, Clin Cancer Res, 2010) をすでに検討した。これらを用いて膀胱癌における CD44v の発現と臨床データとの関連を探った。

続いて膀胱癌細胞株である MBT-2 細胞、MBT-2v 細胞を用いて CD44v、xCT の発現と sulfasalazine 単独投与及びシスプラチンやピラルピシンといった ROS を介して殺細胞効果を示す抗癌剤との併用投与による抗腫瘍効果、CD44v、xCT の発現の変化の解析を行った。

最後に当教室で確立されているモデルであり、マウス由来の膀胱癌細胞である MBT-2 細胞を C3H/HeN マウスの膀胱内へ移植し作成したマウス正所性膀胱腫瘍モデルに sulfasalazine 単独膀胱内注入を行い、抗腫瘍効果を検討した。また、同様に当教室で確立されているモデルであり、マウス由来の膀胱癌細胞である MBT-2v 細胞を C3H/HeN マウスの尾静脈から静注することにより作成したマウス異所性膀胱腫瘍肺転移モデルに sulfasalazine 単独投与ならびにシスプラチン併用投与を行い抗腫瘍効果の解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 臨床組織切片を用いた免疫染色で癌幹細胞マーカーである CD44v の発現と生命予後の関係性を評価した。筋層浸潤性膀胱癌の臨床摘出検体 63 例を対象とし、免疫組織学的染色による統計学的検討を施行した。腫瘍中の CD44v 陽性率が 5%以上の腫瘍を CD44v 高発現、5%未満の腫瘍を CD44v 低発現腫瘍と定義し、予後との関連を検討した所、CD44v 高発現腫瘍では CD44v 低発現腫瘍と比較し有意に再発率及び癌特異的生存率が低かった ( $p=0.001, p=0.003$ , Fig.2)。また、多変量解析では CD44v 高発現は再発及び癌特異的死亡の独立した予後危険因子であった ( $p=0.003, p=0.022$ )。このことより、膀胱癌において CD44v 高発現、すなわち癌幹細胞の存在は予後危険因子であることが示唆された。また、筋層非浸潤性膀胱癌の内、T1G3 の 77 症例を対象に同様の検討を行っているが、現在解析中である。

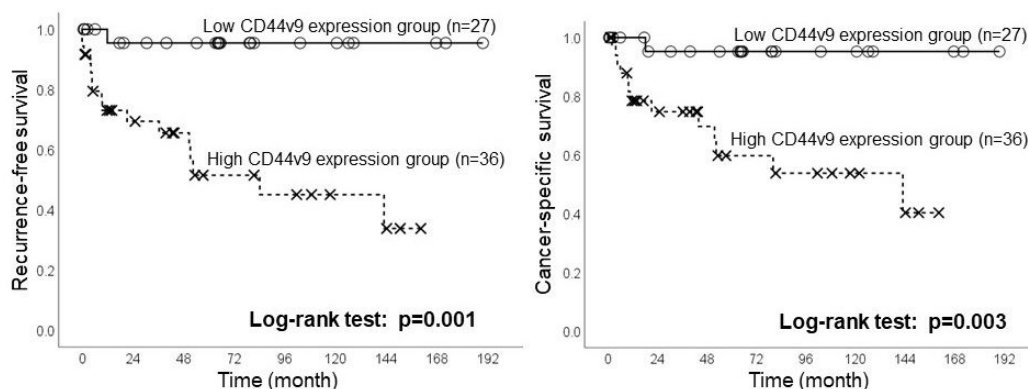


Fig.2 CD44v 発現と再発及び癌特異的生存率の関係

(2) 癌幹細胞を標的とした治療の確立のために sulfasalazine を用いて検討を行った。まず、MBT-2 細胞、MBT-2v 細胞の双方の細胞株で CD44v と xCT が発現していることを Western blot 法にて確認した。続いてこの二つの細胞株に sulfasalazine を投与し cell viability の変化を評価した。評価方法は、sulfasalazine 自体が発色している関係で発光検出による評価を行った。双方の細胞株において、濃度依存的に sulfasalazine の抗腫瘍効果を認めた。MBT-2 細胞では sulfasalazine 100 $\mu$ M で cell viability が 99.2%であったのに対して 200 $\mu$ M で 53.8%であり、MBT-2v 細胞では sulfasalazine 300 $\mu$ M で 96.9%であったのに対して 400 $\mu$ M で 13.5%であった。また、sulfasalazine 投与により細胞内 GSH 濃度の低下と細胞内 ROS レベルの上昇も認めた。さらにこの抗腫瘍効果が sulfasalazine 特異的なものであることを示すために、抗酸化物質である N-acetylcystein (NAC) との併用での評価を行ったところ、NAC と sulfasalazine を併用すると MBT-2 及び MBT-2v 細胞共に細胞死がレスキューされ、sulfasalazine 特異的な抗腫瘍効果であることが示された。最後に ROS を介して抗腫瘍効果を示すシスプラチン (CDDP) との併用効果について検証した。これは MBT-2v 細胞のみで検討を行ったが、単剤ではほとんど抗腫瘍効果を示さない、sulfasalazine 300 $\mu$ M とシスプラチン 10 $\mu$ M を併用すると cell viability が 40.7%となり、その併用効果が示唆された。さらに Western blot 法では、併用療法により CD44v の発現低下やリン酸化 p38 MAPK の発現亢進を認めた。引き続き作用機序解明のために ZEB1、Snail、CD140、IL6、FGF など EMT 関連因子を含めた様々な因子の発現変化とその因子を標的とする薬剤の有用性について現在実験を遂行している。

(3) *in vitro* で sulfasalazine の抗腫瘍効果を認めたため、続いて *in vivo* での検討を行った。マウス膀胱癌正所性モデルを用いての検討では、40 匹に MBT-2 細胞の膀胱内注入を行い、無作為に生食投与群と sulfasalazine 投与群に割り付けした。膀胱内注入日を day0 とし、sulfasalazine (1000mg/kg) と生食を day3、6、9、12、15、18、21、24 の計 8 回投与し、day28 にサクリファイした。マウス膀胱を摘出し、膀胱重量を測定した所、生食投与群 (平均 193.3mg) と比較して sulfasalazine 投与群 (平均 44.3mg) で有意に小さかった。現在、腫瘍細胞中の CD44v の発現変化について検討を行っている。一方で sulfasalazine の濃度をあげると腫瘍重量は減らずにほとんど効果が出ないこともわかった。これについては ROS の産生が腫瘍保護に働いていると考え、現在その機序についても検討を行っている。

また、マウス膀胱癌異所性肺転移モデルを用いての検討では、40 匹に MBT-2v 細胞を尾静注し、無作為に生食投与群、sulfasalazine 投与群、CDDP 投与群、併用療法群の 4 群に 10 匹ずつ割り付けした。Sulfasalazine (500mg/kg) は 2 投 1 休で CDDP (2mg/kg) は 1 投 4 休で腹腔内



投与を行った。肺転移モデル作成日を day0 とし、day15 にサクリファイスした。マウスの肺を摘出し肺転移数をカウントしたところ肺転移数は生食投与群（平均 114.3 個）と比較して、sulfasalazine 投与群（平均 50.6 個）及び CDDP 投与群（平均 69.2 個）で有意に少なく、さらに併用群では単剤群と比較して有意に少なかった（平均 15.5 個）（Fig.3）。腫瘍細胞中の CD44v の発現も併用群で最も少なく sulfasalazine はそれ自体で癌幹細胞に対して抗腫瘍効果を示すだけでなく、CDDP など ROS を介して治療効果を示す薬剤と併用することによりさらなる治療効果が期待できることが示唆された。

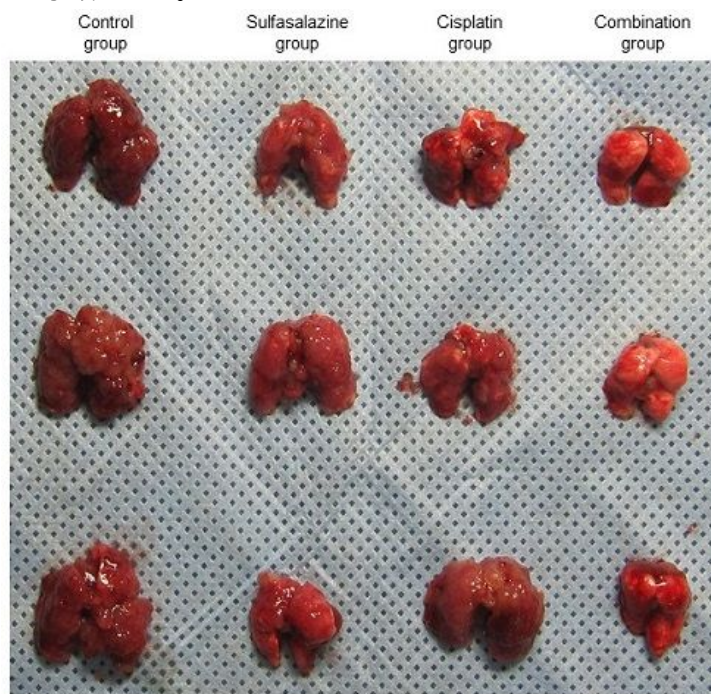


Fig.3 肺転移の変化（左より生食投与群、sulfasalazine 投与群、CDDP 投与群、併用群）

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) [Koichiro Ogihara](#), Eiji Kikuchi, Shogo Okazaki, Masayuki Hagiwara, Toshikazu Takeda, Kazuhiro Matsumoto, Takeo Kosaka, Shuji Mikami, Hideyuki Saya, and Mototsugu Oya: Sulfasalazine could modulate the CD44v9-xCT system and enhance cisplatin-induced cytotoxic effects in metastatic bladder cancer: *Cancer Science*: 110, 2019, 1431-41: 査読あり, doi: 10.1111/cas.13960

### 〔学会発表〕(計 4 件)

(1) [Koichiro Ogihara](#), Eiji Kikuchi, Masayuki Hagiwara, Kazuhiro Matsumoto, Shuji Mikami, Hideyuki Saya, and Mototsugu Oya: CD44 variant 9 expression is a novel indicator for identifying poor survival in patients with invasive urothelial carcinoma: The 114th American Urological Association Annual Meeting: 2019

(2) [Koichiro Ogihara](#), Eiji Kikuchi, Toshikazu Takeda, Takeo Kosaka, Hideyuki Saya, Mototsugu Oya: The therapeutic effect of sulfasalazine for metastatic urothelial carcinoma targeting to cancer stem cell: The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association: 2018

(3) [Koichiro Ogihara](#), Eiji Kikuchi, Shogo Okazaki, Masayuki Hagiwara, Toshikazu Takeda, Takeo Kosaka, Shuji Mikami, Hideyuki Saya, and Mototsugu Oya: The establishment of new therapeutic strategy for metastatic urothelial carcinoma targeting to cancer stem cell: The 16th Urological Association of Asia Congress: 2018

(4) [Koichiro Ogihara](#), Eiji Kikuchi, Masayuki Hagiwara, Takeo Kosaka, Hideyuki Saya, Mototsugu Oya: The effect of sulfasalazine on bladder cancer stem like cells targeting to cystine transporter: The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association: 2017

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計0件）

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：菊地 栄次

ローマ字氏名：KIKUCHI, Eiji

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。