

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390416

研究課題名(和文) 中心体複製異常を指標とした新しい膀胱癌の診断治療方針決定システムの確立をめざして

研究課題名(英文)

Investigation aimed for establishment of novel bladder cancer detection and treatment strategy system using centrosome amplification

研究代表者

松山 豪泰 (MATSUYAMA HIDEYASU)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70209667

研究成果の概要(和文)：

【目的】本研究の目的は(1)膀胱洗浄液細胞診検体を用いた中心体複製異常検索による膀胱癌予後診断の可能性を探ること、(2)array-CGH法を用いたゲノム網羅的解析により中心体複製異常症例に特異的なゲノム変異を検索同定すること、(3)中心体複製異常とtaxane系抗癌剤感受性との関連を明らかにすることである。

【対象、方法、結果】(1)ヒト筋層非浸潤性膀胱癌検体85例を用いた検討では中心体過剰複製は50例(59%)、腫瘍進展は15例(18%)に認められ、多変量解析にて腫瘍進展の唯一の独立予後予測因子($p=0.0098$)であった。膀胱洗浄液を用いた検討では生検検体との一致率は95%であり、膀胱洗浄液検体を持ちいて同複製異常を同定しうることが示唆された。(2)array-CGHによるゲノム変異検索では中心体過剰複製症例は非過剰複製症例より、有意にゲノムコピー数異常の総和、染色体不安定性が高く、特に5p15.2 gain、20p12.2 gain、2q37.3 loss、8p22 loss、17p12 lossを多く認めた。(3)膀胱癌継代培養細胞株6株を用いた検討では中心体正常株2株はすべてpaclitaxelに対する感受性を認めたが、異常株4株中3株は抵抗株であった。

【結論】膀胱癌における中心体複製異常は尿路上皮癌の分子生物学的biomarkerとなる可能性が示唆された。さらにtaxane系抗癌剤耐性克服への応用が期待された。

研究成果の概要(英文)：

Objectives:

The aims of this study are (1) to testify the role of centrosome amplification (CA) using bladder washing cytology specimen for the prediction of tumor recurrence and progression in non muscle-invasive bladder cancer, (2) to explore the specific genomic alterations (deletion, amplification) regarding CA, and (3) to identify the relation of CA to anticancer drug sensitivity to taxanes by comparing the status of CA with drug sensitivity using six established bladder cancer cell lines.

Materials & Methods:

(1) An immune-fluorescent staining for anti-pericentrin was applied to bladder washing cytology specimens as well as corresponding touch biopsy specimens obtained both from 85 human non muscle-invasive bladder cancers. CA was defined as cases with having more than 5% fraction of cells with three or more centrosome per cell. (2) An array-CGH (comparative genomic hybridization) using 4030 AC crone chip (MacArray) was applied to tumor genomic DNAs extracted from 70 human urothelial cancers, and compared the copy number of entire chromosomes between DNA from cases with CA and those without CA. (3) Paclitaxel (final conc.: 0.1, 1, 10nM/ml) was continuously exposed to six human established bladder cancer cell lines (CA cell line: T24, EJ-1, 5637, J-82, TCC-sup, non-CA cell line: KK47, RT-4) in vitro, and compared CA status with drug sensitivity to paclitaxel.

Results:

(1) Out of 85 cases examined, CA and tumor progression was observed in 50 (59%) and 15 (18%) cases, respectively. A multivariate analysis by Cox-proportional hazard model revealed CA was a sole independent prognostic factor predicting for tumor progression ($p=0.0098$, Relative risk: 3.69, 95% CI: 1.28-13.44). CA detection using bladder washing specimens was successful in 20 out of 25 cased (80%), and correspondence rate between cytology and touch specimens was 95%. (2) High throughput genomic analysis demonstrated that cases with CA were significantly higher accumulated variant copy number, higher chromosome instability (CIN), and shorter period to tumor progression than those without CA. Specific chromosomal region with copy number aberrations included gains for 5p15.2,20p12.2, and losses for 2q37.3, 8p22, and 17p12, respectively. (3) All cell lines without CA demonstrated dose-response drug sensitivity to paclitaxel, while three of four cell lines with CA showed resistant to the drug.

Conclusions:

A serial experiments regarding CA demonstrated that (1) CA detection using bladder washing cytology specimens may become a non-invasive diagnostic tool for predicting tumor progression, (2) urothelial cancer including bladder may be biologically categorized by CA status, (3) CA status may predict clinical efficacy of anti-cancer chemotherapy using paclitaxel.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 4,900,000 | 1,470,000 | 6,370,000 |
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 6,900,000 | 2,070,000 | 8,970,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：中心体複製異常、膀胱癌、ゲノム変異、染色体不安定性

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は尿路生殖器腫瘍のなかでも最も発生頻度が高い腫瘍の一つであるが、非浸潤性膀胱癌（癌の浸潤が粘膜下層までにとどまる）が全体の約70%をしめる。非浸潤性膀胱癌は経尿道的腫瘍切除術などの膀胱温存治療が可能であるが2年間で約50%が再発をきたし、再発時その約1/3が進展、浸潤傾向を獲得する。腫瘍進展症例では治療方針の変更を余儀なくされ、早急な集学的な治療が必要となるが現在再発、腫瘍進展を予測する確実なマーカーはない。中心体は細胞分裂時2つの紡錘体極を形成する構造物でその複製は厳密に制御されているが種々の癌で中心体複製異常（3個以上の中心体を有する細胞が出現）が報告されている。われわれはこれまで中心体複製がNucleophosminのリン酸化を介して制御されていること、*p53*遺伝子変異培養細胞株では中心体複製異常が

BubR1の発現によりコントロールされていること、ヒト膀胱癌において中心体複製異常が約60%の症例に認められ、これが染色体異数体異常を通してCINを誘導し、腫瘍再発や進展に強い影響を与えていることを報告してきた。

また浸潤性進行性膀胱癌に対するtaxane系抗癌剤を含む多剤併用化学療法が広く普及してきたが、中心体複製異常がすでにみられる膀胱癌症例における抗腫瘍効果は意見の分かれるところである。とくに中心体複製異常発現の中心的役割をはたすSTK15/Aurora-A mRNAが高発現している場合、docetaxel耐性となることが膵臓癌、乳癌において報告されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は1)膀胱洗浄液細胞診検体を用いた中心体複製異常の判定をおこない、

予後との関連を検討することにより、同検体を用いた膀胱癌予後診断の可能性を探ること、2) ヒト膀胱癌臨床検体を用いて中心体複製異常症例に特異的なゲノム変異を認められた領域遺伝子の欠失および増幅を検討し、真に中心体複製異常と関連のある遺伝子を同定すること、3) ヒト継代膀胱癌細胞株(複製異常株と非複製異常株)を用いて taxane 系抗癌剤に対する感受性と複製異常との関連を明らかにし、臨床の現場におけるテーラーメイド医療の実践に役立てることである。

3. 研究の方法

(1) 中心体複製異常を用いた予後診断

対象：ヒト筋層非浸潤性膀胱癌検体 85 例

方法：

- ① ヒト膀胱癌手術時に採取した腫瘍タッチ生検および膀胱洗浄液細胞診検体を用いて中心体複製異常の有無を蛍光抗体法(抗体:抗ペリセントリン抗体)にて検討する。複製異常症例の定義は既報のごとく1細胞当たり3個以上の中心体を認める細胞の割合が計測した細胞全体の5%以上とする。
- ② 洗浄細胞診検体とタッチ生検検体との間で中心体複製異常細胞の割合や複製異常と判定された症例の相関性を比較する。
- ③ 手術後の経過を観察し、その後の腫瘍再発、腫瘍進展(再発時筋層浸潤または遠隔転移を認める)と複製異常との関連を検討する。
- ④ 洗浄細胞診検体を用いた中心体複製異常の検索が膀胱癌予後診断に有用であるかいなかを検証する。

(2) 中心体特異的ゲノム変異検索

対象：ヒト尿路上皮癌検体 70 例

方法：

- ① ヒト膀胱癌臨床検体よりゲノム DNA を抽出し 4030 の BAC clone チップ (MacArray 社) を用いたゲノム array-CGH をおこない、ゲノム全体を網羅的に解析する。
- ② (1) で判定した中心体複製異常の有無で症例を 2 群に分け、両群間でゲノムコピー数に有意差のある領域を pick up する。

(3) 中心体複製異常と taxane 系抗癌剤感受性との関連

対象：ヒト継代培養膀胱癌株 6 株 (中心体複製異常株: T24, EJ-1, 5637, J-82, TCC-sup, SCaBER, 正常株: KK47, RT-4)

方法：

- ① 10^5 cells/dish に調整した上記細胞株を 60mm dish (Falcon 社) に播種後 paclitaxel (最終濃度 1, 10, 100nM/ml の 3 条件) を持続接触にて、培養 (4%CO₂, 37°C, Heraeus 社) をおこなう。
- ② 接触後 3, 5, 7 日目に dish より細胞を単離、トリパンブルー染色後細胞数血球算

定板をもちいてカウントし、対照群との比較をおこない、各細胞株各濃度の dose-response curve を作成する。

- ③ 上記より各細胞株の IC₅₀ 値を求め、中心体複製異常株と正常株の間で感受性を比較検討する。
- ④ ①で検討した遺伝子変異の有無と IC₅₀ 値との比較をおこない、どの遺伝子変異が感受性に影響しているかを同定する。なお 1) で変異が認められない場合は 6) により感受性規定遺伝子の検索をおこなう。
- ⑤ array CGH 法によって同定された遺伝子コピー数の変化と IC₅₀ 値との比較をおこない、感受性に影響を及ぼす遺伝子の同定をおこなう。

4. 研究成果

(1) 中心体複製異常を用いた予後診断

臨床検体 85 例の背景因子は男/女: 68/17、平均年齢 69 歳、grade 1/2/3/5/53/27、pTa/T1:25/60 であり、これらの症例の予後との比較をおこなった(術後観察期間中央値:43ヶ月)。また膀胱洗浄液を用いた中心体複製異常を 25 例で検討した。中心体過剰複製は 50 例 (59%)、腫瘍進展は 15 例 (18%) に認められ、多変量解析にて中心体過剰複製は腫瘍進展の唯一の独立予後予測因子(p=0.0098, Relative risk: 3.69, 95% CI:1.28-13.44) であった。膀胱洗浄液を用いた検討では 25 例中 20 例 (80%) で中心体を同定可能で、生検検体との一致率は 95% だった。これらの結果より非浸潤性膀胱癌における中心体過剰複製は、腫瘍進展予測の分子マーカーとなり、膀胱洗浄液検体をもちいて同複製異常を同定しうることが示唆された。これらの結果は第 102 回米国泌尿器科学会、第 24 回欧州泌尿器科学会総会、第 96 回、97 回日本泌尿器科学会総会および第 47 回日本癌治療学会学術集会で発表した。

また付随研究として中心体数と染色体コピー数が相関して増加することを明らかにし、とくに中心体数が偶数の場合、染色体コピー数も偶数であるという規則性を見出し、このような場合の中心体複製異常は Aurora-A キナーゼタンパクの過剰発現による cytokinesis failure (細胞質分離異常) が原因であることを明らかにし、論文とした (Yamamoto, Y. Cancer Genet. Cytogenet. 191:38-42, 2009)。

さらに 5-ALA (5-アミノレブリン酸) を用いた膀胱癌 PDD (光力学診断) にて偽陽性と診断された赤色蛍光部位に 9 番染色体不安定性があることを報告 (Matsuyama, H. Oncology. 76:118-25, 2009) したが、赤色蛍光部位における 9 番染色体不安定性は中心体複製異常とは関連がなかった。この結果は先に報告した中心体数と 9 番染色体数と有意の相

関性がなかった結果と一致しており、膀胱癌発生および再発進展に関して中心体複製異常を介した染色体不安定性を介する経路と9番染色体コピー数異常を介する経路(Kawauchi, S. Hum Pathol. 40: 1783-9, 2009)が独立して存在する可能性が示唆された。

現在洗浄細胞診検体を増やし、経過観察期間を延長することにより、予後診断としての有用性を確認のうえ、論文とする予定である。

(2) 中心体特異的ゲノム変異検索

中心体過剰複製症例では非過剰複製症例より、有意にゲノムコピー数異常の総和、染色体不安定性が高く、腫瘍再発、進展までの期間が短かった。病理組織診断による high grade 症例では low grade 症例より、有意にゲノムコピー数異常の総和、染色体不安定性が多かったが、*P* 値は中心体過剰複製の方が低かった。また、中心体過剰複製症例では、有意に 20p12.2 gain、5p15.2 gain、17p12 loss、8p22 loss、2q37.3 loss を多く認めた。これらの結果より中心体過剰複製は尿路上皮癌をゲノムコピー数異常によって2つに分類でき、尿路上皮癌の分子生物学的 biomarker となる可能性が示唆された。これらの結果は第48回日本癌治療学会学術集会で発表予定であり、現在論文執筆中である。また各領域の変異については現在解析中である。

(3) 中心体複製異常と taxane 系抗癌剤感受性との関連

中心体複製異常と Taxane 系抗癌剤感受性との関連では6つの膀胱癌継代培養細胞株(中心体複製異常株: 4、正常株: 2)を用いて検討した結果、正常株2株はすべて paclitaxel に対する感受性を認めたが、異常株4株中3株は抵抗株であった。今後 taxane 系抗がん剤を用いた抗がん化学療法施行例の効果と中心体複製異常との関連性を検討し、Taxane 系抗癌剤耐性克服の基礎検討および治療予測への応用を検討予定である。

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 Hiraoka, H., Minami, K., Kaneko, N., Miyama, T., Mizuno, T. and Okuda, M. Molecular cloning of the canine fragile histidine triad (FHIT) gene and Fhit protein expression in canine peripheral blood mononuclear cells. J Vet Med Sci., 71: 645-9, 2009. (査読あり)
- ② Hiraoka, H., Minami, K., Kaneko, N., Miyama, T., Mizuno, T. and Okuda, M. Aberrations of the FHIT gene and the Fhit protein in canine lymphoma cell. J Vet Med Sci., 71: 769-77, 2009. (査読あり)

- ③ Yamamoto, Y., Eguchi, S., Akao, J., Furuya, T., Oga, A., Kawauchi, S., Sasaki, K., Matsuyama, H. Intracellular Centrosome Number is correlated with Copy Number of Chromosome in Bladder Cancer. Cancer Genet. Cytogenet. 191:38-42, 2009. (査読あり)
- ④ Matsuyama, H., Yamamoto, Y., Nagao, K., Ohmi, C., Sakano, S., Sasaki, K. Cytogenetic analysis of false-positive mucosa by photodynamic diagnosis using 5-aminolevulinic acid - possible existence of premalignant genomic alterations examined by in vitro experiment. Oncology. 76:118-25, 2009. (査読あり)
- ⑤ Kawauchi, S., Sakai, H., Ikemoto, K., Eguchi, S., Nakao, M., Takihara, H., Shimabukuro, T., Furuya, T., Oga, A., Matsuyama, H., Takahashi, M., Sasaki, K. 9p21 index as estimated by dual-color fluorescence in situ hybridization is useful to predict urothelial carcinoma recurrence in bladder washing cytology. Hum Pathol. 40: 1783-9, 2009. (査読あり)

[学会発表] (計7件)

- ① 宮近義浩、松山豪泰、山本義明、坂野 滋、原 貴彦、長尾一公、伊藤英昭、三角 拓、西嶋 淳。膀胱癌における中心体複製異常の検討。第47回日本癌治療学会学術集会。2009.9.14.(東京)
- ② Matsuyama, H., Yamamoto, Y., Nagao, K., Sakano, S., Sasaki, K. Clinical significance of false positive mucosa by photodynamic diagnosis-possible existence of premalignant genomic alterations-. AUA (American Urological Association) 2009 Annual meeting. 2009.4.27. (Chicago, USA)
- ③ 宮近義浩、松山豪泰、山本義明、内藤克輔、坂野 滋、原 貴彦、井上 亮、江口 賢、伊藤英昭、赤尾淳平、三角 拓。膀胱癌における中心体複製異常の臨床的検討—膀胱洗浄液検体を用いた検討—。第97回日本泌尿器科学会総会。2009.4.18. (岡山) (日本泌尿器科学会雑誌。100: 115, 2009)
- ④ Matsuyama, H., Yamamoto, Y., Miyachika, Y. Clinical significance of centrosome amplification as prognostic marker for tumor progression in non-muscle invasive bladder cancer. The 24th Annual EAU (European Association of Urology) Congress, 2009.3.19. (Stockholm, Sweden)
- ⑤ 松山豪泰、山本義明、江口 賢、長尾一公、大見千英高、坂野 滋、佐々木 功典、内藤克輔。膀胱癌における中心体複製異常の臨床的応用—膀胱洗浄液検体を用いた検討—。第96回日本泌尿器科学会総会。2008.4.27. (横浜)

⑥ Matsuyama, H., Nagao, K., Ohmi, C., Sakano, S., Naito, K. Could all non-malignant fluorescent mucosa be interpreted as insignificant false-positive observation? Molecular analysis on bladder mucosa with and without red fluorescence detected by fluorescence cystoscopy using 5-aminolevulinic acid. The 23rd Annual EAU (European Association of Urology) Congress, 2008.3.27. (Milan, Italy)

⑦ Matsuyama, H., Yamamoto, Y., Akao, J., Misumi, T., Kawai, Y., Eguchi, S., Nagao, K., Ohmi, C., Sakano, S., Sasaki, K., Naito, K. Clinical significance of centrosome amplification and its associated numerical aberrations in non-muscle invasive bladder cancer. 102nd annual meeting of the American Urological Association. 2007.5.21.(Anaheim, USA)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：中心体複製異常を指標とした膀胱癌の予後診断

発明者：松山豪泰、内藤克輔、佐々木功典、奥田 優

権利者：山口大学

種類：特許 (公開)

番号：特開 2006-275989

出願年月日：平成17年3月30日

国内外の別：国内

○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

松山 豪泰 (MATSUYAMA HIDEYASU)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70209667

(2) 研究分担者

長尾 一公 (NAGAO KAZUHIRO)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70379949

奥田 優 (OKUDA MASARU)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：10325243

佐々木 功典 (SASAKI KOUSUKE)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80116722

(3) 連携研究者
なし