

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592407

研究課題名(和文)尿路上皮癌患者に対する多剤併用化学療法の効果予測を目的としたバイオマーカーの確立

研究課題名(英文) Establishment of the biomarker in urothelial cancer patients treated with systemic combination chemotherapy.

研究代表者

松村 永秀 (Matsumura, Nagahide)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30316103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ゲムシタピンの腫瘍細胞内への取り込みに中心的な役割を果たしている蛋白であるhENT1の高発現レベルが転移病変を有する膀胱癌の患者において独立した効果予測因子であることを証明してきた。今回の研究でリボヌクレオチド還元酵素1(RRM1)が、ゲムシタピンの耐性獲得に関与する物質である可能性が示唆された。我々の研究結果では、尿路上皮腫瘍細胞におけるRRM1の高発現およびhENT1の低発現がゲムシタピンを含んだ多剤併用化学療法を使って治療された転移の膀胱癌の患者の予後不良と関連するのを証明した。本研究結果は、化学療法を施行する尿路上皮癌患者における個別医療導入への礎となる成果である。

研究成果の概要(英文)：We recently demonstrated that high expression levels of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1), the major nucleoside transporter protein required for efficient uptake of gemcitabine into cytoplasm, was an independent prognostic marker as a positive regulator in patients with metastatic bladder cancer treated using gemcitabine-containing systemic chemotherapy. Ribonucleotide reductase 1 (RRM1) represents a mechanism of resistance to gemcitabine, and was shown in this study as a negative regulator response to gemcitabine-platinum chemotherapy. Our data demonstrated that high expression of RRM1 and low expression of hENT1 in tumor cells is associated with shorter survival in patients with metastatic bladder cancer treated using gemcitabine-containing chemotherapy. This outcome will lead to personalized medicine in urothelial cancer patients treated with systemic chemotherapy.

研究分野：尿路上皮癌

キーワード：尿路上皮癌 膀胱癌 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 進行性尿路上皮癌症例に対する全身化学療法は、近接効果においては比較的良好な成績であるものの長期にわたって完全寛解を示す症例は少ない。現状では、二者択一的な標準化学療法である M-VAC 療法と GC 療法が、各医療機関で漫然と無作為に使用されている。

(2) このような背景の下、国内外において進行性尿路上皮癌患者に対する化学療法の成績向上を目指して GC 療法/M-VAC 療法の個別化医療の確立が喫緊の重要課題である。当教室では、CDDP 効果予測因子とともに、GEM を腫瘍細胞内に取り込む際に最も重要な物質である Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (以下 hENT1) に着目した研究をおこなってきた。これらのバイオマーカー候補物質発現の多寡と、GEM と CDDP を含んだ全身化学療法を施行した膀胱癌患者における近接効果や生命予後との関連性についての研究である。GEM と CDDP の薬学的バイオマーカーを複数導入し個別化医療が可能となれば、“初回化学療法において、GEM が無効と予測される症例には M-VAC 療法を施行する”や“GEM は有効と予想されるが、Cisplatin は無効であろう症例には GEM 単剤の化学療法を行う”など個々の症例に応じた対応が可能となり、患者さんが得られる恩恵は計り知れない。

## 2. 研究の目的

(1) 標準治療を効率的に選択し、治療成績を向上させるためには個別化治療の確立が必要不可欠である。これまでに我々は、進行性尿路上皮癌患者に対する化学療法の治療効果を予測する上で薬学的バイオマーカー (hENT1) が有効であると研究成果を報告してきた。今回の研究目的は、これまでの研究成果をさら

に発展させて(多施設共同前向き研究を含む)尿路上皮癌患者に対する化学療法の感受性規定因子を解明し個別化治療を確立する事である。

(2) 一般的に、複数の薬剤を用いた治療効果を予測する上で、一つの薬剤に関連する単一因子で効果予測することには限界があることは言うまでもない。そこで我々は、これまでの研究成果を踏まえた上で、CDDP および GEM それぞれの薬剤の効果予測因子について、GEM に対する耐性獲得に関与している Ribonucleotide reductase regulatory subunit 1 (以下 RRM1) を含めて検討した。すなわち、本研究の目的は複数の有力な因子を特定し、それらの因子を組み合わせることで治療前評価を行うことで尿路上皮癌症例における全身化学療法の個別化治療導入に関する基盤となる臨床研究を行うことである。

## 3. 研究の方法

(1) バイオマーカー候補物質の免疫組織学的評価法の確立: 当院における尿路上皮癌症例の摘除標本(60例)において、GEM の代謝に関与する候補物質と CDDP の耐性獲得に関与する物質の発現の評価し、各種臨床病理学的因子との関係を検討する。

(2) バイオマーカーの特定と個別化治療導入に向けた多施設共同前向き研究の実施: 上記研究で得られた結果との整合性を検証したバイオマーカーを選挙して多施設共同前向き研究を行う。

## 4. 研究成果

(1) 臨床検体を用いて免疫組織染色を行った (retrospective study)。

【免疫染色結果】\* 発現評価法: 強度と分布

の結果に応じて評価した。

強度 internal control (内皮細胞)が 2+ それ以上 3+ 以下 1+ 発現なし 0

➤ 2+で分布 50%以上を強発現群、条件を満たさないものを弱発現群と分類

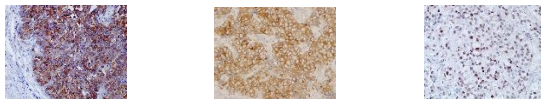
分布 50 ~ 100% : score 1, 49 ~ 10% : score 0.5, 9 ~ 0% : score 0.1

➤ H-score 2 以上を強発現群、2 未満を弱発現群と半定量化した。

H-score=intensity × 分布 score(0 ~ 3)

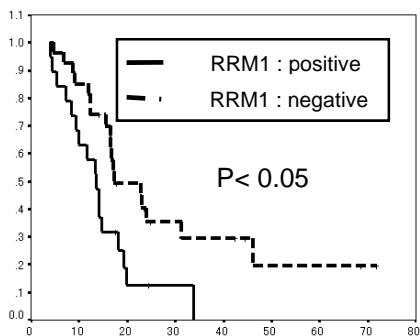
➤ 上記と同様の免疫染色を GEM の代謝関連物質 : hENT1, DCK, CDA, RRM1, RRM2, ENT1 CDDP の耐性獲得関連物質 : ERCC1, ERCC2 について各種物質の発現レベルが治療効果・予後予測因子となり得るかにつき統計学解析を行った。

以下は免疫染色結果のサンプルである。



hENT1 陽性例 RRM1 の陽性例 ERCC1 陽性例

評価可能であった総症例数 46 例で解析を行った。以下の図は、今回の検討で新たに有効性が示唆される結果が得られた RRM1 についての解析結果である。



治療目的に採取した膀胱癌組織における免疫染色で RRM1 が低発現群においては、高発現群と比較して有意に良好な全生存率を示した。

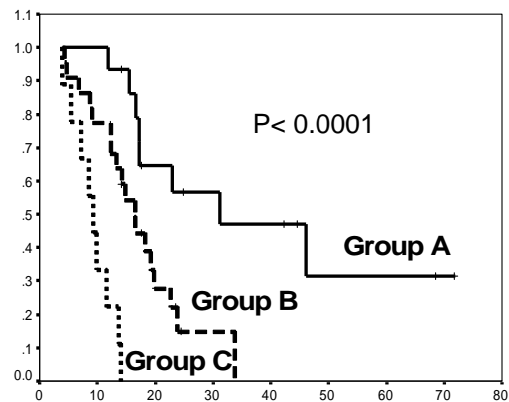
hENT1 についてもこれまでの研究結果にさら

に症例数を増加して解析を行ったところ、RRM1 と同様に有効なバイオマーカーであることが示唆された。

そこで我々は、hENT1 と RRM1 のそれぞれの発現結果に応じて組み合わせた解析を行った。

以下は、そのグループ化による解析結果である。グループ A とグループ C でより明確に予後に相違が生じることを示した。

	hENT1	RRM1
Group A	high	low
Group B	high	high
Group C	low	high



(2) 臨床検体を用いた多施設共同研究 (prospective study) を実施中である。

➤ 本研究は、和歌山県立医大泌尿器科が研究実施機関および事務局となった多施設共同前向き研究のプロトコルが作成済みであり、当院および関連病院での倫理委員会で承認された研究である。'進行性・転移性膀胱癌症例に対する標準化学療法 (GC 療法、Gem+Carbo 療法) の効果予測因子に関する前向き研究' として多施設共同臨床試験を開始しており、現在進行中である。共同研究機関は、大阪大学・神戸大学・京都府立・医科大学・大阪市立大学・近畿大学・大阪医科大学・関西医大・山口大学・鳥取大学などである。

【研究の概要】進行性・転移性膀胱癌患者から同意を得たのちに、手術材料を用いバイオマーカー候補物質の発現を調べ抗癌剤感受性の予測を行う。抗癌化学療法としてGC療法を施行する。フォローアップを行い、近接効果、非進展生存率、疾患特異的生存率、全生存率に関する情報を収集し、バイオマーカーの発現が予後予測因子となり得るか否かにつき統計学的に多変量解析を行う。

【対象物質候補】

ゲムシタピンの代謝関連物質：hENT1, DCK, CDA, RRM1, RRM2, ENT1, CNT3 シスプラチンの耐性獲得関連物質：ERCC1, ERCC2

(対象症例) 評価可能病変を有する進行性・転移性膀胱癌患者を対象とする。

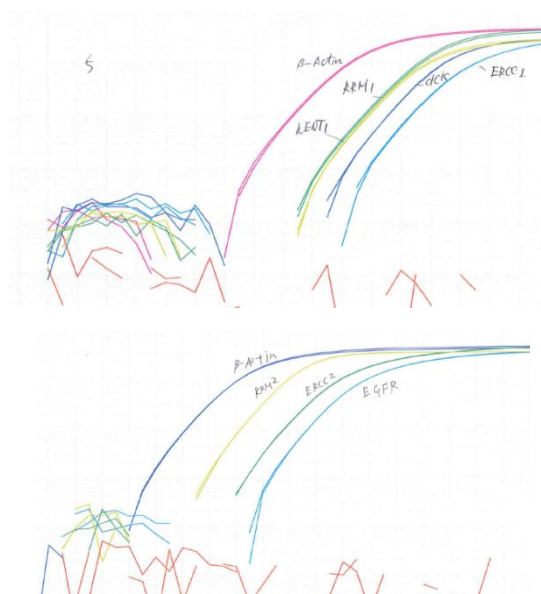
【選択基準】組織学的に移行上皮癌(ごく一部に移行上皮癌成分を含むものはentry可)と確認された進行性・転移性膀胱癌患者であり、化学療法前のPerformance status(PS)が0から2の患者で、血清Cr値が1.5以下(eGFR 30ml/min)の症例。(施行する化学療法)

First line chemotherapyとして、全例にGC療法を施行する。重篤な副作用を発症しない限り、原則として2サイクルは行い、画像検査で近接効果を評価する。再発・進行を認めない場合、連続したGC療法は最高6サイクルとする。再発・進行を認めた場合やMVAC療法を含む他の治療法に変更する。

(研究対象病理標本の採取と取扱いについて) 臨床研究参加に関する同意を得た上で、治療・診断の際に得られた尿路上皮癌標本の一部(凍結切片とパラフィン包埋ブロックとして保存)を採取する。central pathologyで組織学的評価と以下の物質における免疫組織染色および定量的RT-PCR法を用いてmRNAレベルを測定する。

Primary endpoint : Overall survival, Secondary endpoint : clinical response 近接効果、非進展生存期間、疾患特異的生存期間、全生存期間、副作用に関する情報を収集する。術前の古典的臨床病理学的因子(PS、臓器転移の有無、Bajorin リスク分類、貧血、血清Ca, LDH, CRP値など)と各種物質の発現(免疫での発現とmRNAレベル)が治療効果・予後予測因子となり得るか否かにつき統計学解析を行う。

本研究は、現在も進行中であり未だ解析には至っていない。以下に各種バイオマーカーの評価結果のサンプルを示す。



このように各種バイオマーカーのmRNAレベルの測定に関しても順調に解析できている。並行して免疫染色法による蛋白レベルでの発現解析についても解析している。問題となるのは、本臨床研究の症例エントリーである。現時点での症例登録数は未だ30例にすぎない。当初100例以上の症例登録を予定していたが、50例を超えた時点で本研究の最終解析を行った上で、学会および論文発表を随時行っていく所存である。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計5件)

発表者 松村 永秀

尿路上皮癌に対する術後補助化学療法としてGC療法を施行した症例における薬学的バイオマーカー (hENT1, RRM1, ERCC1) の発現に関する検討

第102回 日本泌尿器科学会総会

2014年4月26日 神戸

発表者 松村 永秀

GC療法を施行した尿路上皮癌症例におけるERCC1, hENT1 および RRM1 発現に関する検討

第51回 日本癌治療学会

2013年10月25日 京都

発表者 松村 永秀

尿路上皮癌に対する化学療法の効果は予測できるか? 効果予測因子としてのバイオマーカーの検討 (シンポジウム)

第101回 日本泌尿器科学会総会

2013年4月27日 札幌

発表者 松村 永秀

THE SIGNIFTHE SIGNIFICANCE OF COMBINED ANALYSIS OF HUMAN EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTER 1(hENT1) AND RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE M1 (RRM1) IN ADVANCED BLADDER CANCER PATIENTS WITH GEMCITABINE-BASED CHEMOTHERAPY

AUA annual meeting

2012年5月21日 アトランタ

発表者 松村 永秀

ゲムシタピン併用化学療法を施行した進行性・転移性膀胱癌患者における薬学的バイオマーカー候補物質(hENT1, RRM1, ERCC1)の発現の意義について

第100回 日本泌尿器科学会総会

2012年4月22日 横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松村 永秀 (MATSUMURA, Nagahide)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号 30316103

### (2) 連携研究者

原 勲 (HARA, Isao)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号 10263378

中村 靖司 (NAKAMURA, Yasushi)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

(2015年4月退職)

研究者番号 60275352