

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659709

研究課題名(和文)糖鎖生物学を利用した膀胱癌に対する新規膀胱内注入療法の開発

研究課題名(英文)Development of new intravesical therapy for urinary bladder cancer using glycobiology

研究代表者

三塚 浩二 (Mitsuzuka, Koji)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80568171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞の細胞膜に存在する糖鎖は癌細胞の運動能や浸潤能などと関連し、癌の悪性度と深く関連していることが知られている。泌尿器癌ではこれまでに種々の癌細胞や人の組織における糖鎖と予後に関する解析が行われている。我々はその中でも膀胱癌におけるGM3糖鎖の発現とその意義に着目し、膀胱癌細胞においてGM3糖鎖がCD9やIntegrinと複合体を形成し癌の悪性度と大きく関連することを示した。このGM3やCD9などの発現をコントロールすることにより癌の悪性度を制御できることが細胞を使用した基礎実験で明らかにすることができた。今後このGM3を用いた膀胱癌の治療に応用することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Gangliosides which exist on cell membrane are known to be associated with cancer cell malignancy like motility or invasion. Several studies have revealed relationship between gangliosides and prognosis of urological cancers. We focused GM3 ganglioside in urinary bladder cancer and revealed GM3 conformed microdomain with CD9 and integrin on cell membrane, which may control cell malignancy. Moreover, we increased or decreased GM3 expression using siRNA, which resulting in controlling cell malignancy. These results are expected to be applied to treatment of urinary bladder cancer.

研究分野：泌尿器科腫瘍

キーワード：泌尿器癌 糖鎖 膀胱癌 腎癌 GM3

1. 研究開始当初の背景

臨床的に転移のない膀胱がんは一般的に筋層浸潤癌と非筋層浸潤癌に分類される。筋層浸潤癌では主に化学療法や膀胱全摘などが施行されることが多い。一方、筋層非浸潤癌では内視鏡による切除が可能であるが、膀胱がんの多中心性や手術操作による播種等の問題により、膀胱内に高頻度に再発することが問題となっており、その割合は術後2年間で約40-50%とも言われている。また再発を繰り返しているうちに浸潤癌に発展することも少なからず存在し、内視鏡切除後の再発をできるだけ抑制することが重要な課題となっている。再発抑制のために、以前から抗癌剤やBCGの膀胱内注入療法が行われてきたが、その再発抑制効果やBCG膀胱内注入療法に伴う高度の有害事象発生などの問題から、決して満足のいく結果が得られていないのが現状である。そこで現在この膀胱内再発を抑制するために様々な研究が行われており、再発抑制効果が高く、かつ有害事象が軽度な新規の治療法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

細胞に発現する糖鎖は、細胞間相互認識・接着・運動・湿潤などの役割を担っており、癌細胞での浸潤転移などのプロセスにおいてkey moleculeとして果たす役割が注目されている。我々はこれまでに主に膀胱癌や腎癌、前立腺癌の細胞や組織において、ある種の糖鎖の発現が癌の悪性度と大きく関連していることを糖鎖生物学、分子生物学的、病理組織学的に明らかにしてきた。その中で膀胱癌細胞膜に存在する糖脂質であるGM3糖鎖が膀胱癌細胞や組織において癌の悪性度をコントロールするkey moleculeになり得る可能性が明らかとなってきたため、本研究ではこれまでに得られた膀胱癌に関するGM3糖鎖の治験を再度確認するとともに、糖鎖を用いた新規膀胱内注入療法の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

まず膀胱内注入療法に用いる糖鎖の候補として、これまでの研究から非筋層浸潤性膀胱癌組織や細胞に多く存在することがわかっているGM3糖鎖と、筋層浸潤性膀胱癌組織や細胞に多く存在することがわかっているGM2糖鎖に着目し、これらの糖鎖の発現と悪性度の関連を明らかにすることとした。

非筋層浸潤性膀胱癌由来の細胞株KK47と筋層浸潤性膀胱癌細胞由来の細胞株YTS1を用いて、両細胞株でGM3糖鎖やGM2糖鎖の発現の程度を確認し、その発現を亢進または抑制することで、細胞の運動能や接着能、浸潤能などにどのような影響を与えるか検討した。

GM3糖鎖を初めとした糖脂質は癌細胞膜においてラフトと呼ばれる複合体を形成し他の分子と共存して機能を獲得することが報告されており、このGM3糖鎖がどのような分子と複合体を形成し機能しているか、免疫沈降法やconfocal microscopyなどの手法を用いて観察を行った。

また分子生物学的にもどのような機序でGM3が癌の悪性度と関連するか確認するために、western blotting法などを用いてこのGM3糖鎖の動きに関連する情報伝達物質の検索を行った。

GM3糖鎖が膀胱癌細胞において癌の悪性度をコントロールするkey moleculeであることを確認した上でこれを膀胱内注入に用いるために、マウスにおける膀胱内注入の適切な濃度について確認を行うこととした。

4. 研究成果

(1) 膀胱癌細胞・組織におけるGM3糖鎖とGM2糖鎖の発現と悪性度の関連

非筋層浸潤性膀胱癌と筋層浸潤性膀胱癌の過去に採取された組織の一部を使用し、膀胱癌組織におけるGM3糖鎖とGM2糖鎖の発現を検討し、筋層非浸潤癌ではGM3糖鎖の発現が亢進し、筋層浸潤癌ではGM3糖鎖の発現は少なく代わりにGM2糖鎖の発現が亢進していることを確認した。次に筋層非浸潤性膀胱癌由来細胞株であるKK47細胞と筋層浸潤性膀胱癌細胞株由来であるYTS-1細胞において、KK47細胞ではGM3糖鎖の発現が亢進し、逆に

YTS-1 細胞では GM2 糖鎖の発現が亢進していることを確認した。

(2) GM3 糖鎖の付加・抑制による膀胱癌細胞の運動能や接着の変化

筋層浸潤性膀胱癌細胞株である KK47 細胞において GM3 の発現を薬剤を用いて抑制することにより細胞の運動能や接着の亢進が見られた。逆に筋層浸潤性膀胱癌細胞株である YTS-1 に GM3 糖鎖を付加することにより細胞の運動能や接着能が減少することが確認された。以上から膀胱癌細胞において GM3 糖鎖や GM2 糖鎖の存在が癌の悪性度に深く関連している可能性が示された。

(3) 膀胱癌細胞膜における GM3 糖鎖と CD9・インテグリンとの複合体形成による悪性度の制御

糖鎖は通常細胞膜でマイクロドメインを形成し、他の分子と複合体を形成して機能を発現することが言われている。そこで GM3 がどのような分子と複合体を形成し機能を発現しているか確認したところ、免疫沈降法や confocal microscopy を用いた実験により GM3 糖鎖は CD9 およびインテグリンといった分子と共存し複合体を形成し相互作用することにより機能を発現している可能性が示された。

(4) siRNA による CD9 抑制による癌の悪性度の制御

GM3 糖鎖が CD9 やインテグリンといった分子と共存し機能を発現することを示すために、CD の発現を siRNA を用いて knockdown したところ、GM3 の発現を薬剤を用いて抑制したときと同様に細胞の運動能や接着能の低下を認めた。従って GM3 糖鎖は単独で機能を発現しているのではなく、CD9 やインテグリンをいった分子と協調して機能を発現している可能性が示された。

(5) 以上の結果から、GM3 がやはり膀胱癌細胞における悪性度をコントロールする Key molecule であることが示唆されたため、現在マウス皮膚に膀胱癌を作成し GM3 を投与した際の腫瘍縮小効果の有無や、GM3 を用いた膀胱内注入療法のためにマウスに対する適切な注入濃度や方法につき検討を行って

いる。

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 4 件)

Mitsuzuka K, Narita S, Koie T, Kaiho Y, Tsuchiya N, Yoneyama T, Kakoi N, Kawamura S, Tochigi T, Ohyama C, Habuchi T, Arai Y. Lymphovascular invasion is significantly associated with biochemical relapse after radical prostatectomy even in patients with pT2NO negative resection margin. Prostate cancer and prostatic diseases. 2015;18(1):25-30 査読有

Kawasaki Y, Ito A, Kakoi N, Shimada S, Itoh J, Mitsuzuka K, Arai Y. Ganglioside, Disialosyl Globopentaosylceramide (DSGb5), Enhances the Migration of Renal Cell Carcinoma Cells. Tohoku J Exp Med. 2015;236(1):1-7. 査読有

Mitsuzuka K, Yamashita S, Namiki S, Yamada S, Sato K, Saito H, Kaiho Y, Ito A, Nakagawa H, Arai Y. Low-dose maintenance gemcitabine-carboplatin chemotherapy could be an alternative to continuous standard chemotherapy for patients with metastatic urothelial carcinoma. International journal of urology. 2014;21(11):1114-9 査読有

Shimada S, Ito A, Kawasaki Y, Kakoi N, Taima T, Mitsuzuka K, Watanabe M, Saito S, Arai Y. Ganglioside disialosyl globopentaosylceramide is an independent predictor of PSA recurrence-free survival following radical prostatectomy. Prostate cancer and prostatic diseases. 2014;17(2):199-205 査読有

[学会発表](計 3 件)

嶋田修一、伊藤明宏、川崎芳英、梅井成彦、三塚浩二、伊藤淳、斎藤誠一、荒井陽一 前立腺癌における DsGb5 糖脂質発現の意義 第 23 回泌尿器分子・細胞研究会 (2014/3/14 山形市)

三塚浩二 進行尿路上皮癌に対するメトロノミック化学療法の有用性に関する検討 第 102 回日本泌尿器科学会総会 ワークショップ 10 「高齢化する進行尿路上皮癌患者: 治療戦略の再考」(2014/4/27 神戸)

三塚浩二 進行尿路上皮癌に対するメト

ロノミック化学療法の有用性に関する検討
第 77 回日本泌尿器科学会東部総会
(2012/10/17-19 東京)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三塚 浩二 (Mitsuzuka, Koji)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：8 0 5 6 8 1 7 1