

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462429

研究課題名(和文) 尿路上皮癌における抗がん剤耐性獲得下の微小環境とユビキチンシステムの解明

研究課題名(英文) Tumor microenvironment and ubiquitin system in platinum resistance urothelial carcinoma

研究代表者

田中 伸之 (TANAKA, NOBUYUKI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号：60445244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：シスプラチン(CDDP)治療後の再燃性尿路上皮癌では上皮間葉転換(EMT)が治療標的となり得る。我々はCDDP耐性尿路上皮癌T24PR・5637PR細胞のアレイ解析から、CDDP耐性下のFBX032発現低下に注目した。In vitroではFBX032ノックダウンに伴うEMT誘導が確認され、結果は過剰発現系で検証された。臨床組織ではFBX032低発現群におけるEMT誘導が確認された。FBX032発現低下の原因として、T24PR細胞ではFBX032遺伝子のコード領域でヘテロ接合性消失が確認された。5637PR細胞ではFOXO1/3aの核内発現が低下しており、FBX032発現抑制の一因と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To identify the molecules involved in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in tumors post acquired platinum resistance (PR), we examined the changes in gene expression before and after platinum treatment. Four urothelial carcinoma cell lines, T24, 5637, and their PR sublines of T24PR and 5637PR, were assessed by microarray, and FBX032 was newly identified as a negative regulator of EMT. In vitro study showed an intimate relationship between FBX032 expression and EMT, demonstrating that FBX032 knockdown resulted in the EMT acquisition. In contrast, FBX032 overexpression suppressed EMT. The association between FBX032 expression and EMT was further validated using human specimens. CGH array analysis demonstrated loss of heterozygosity at 8q24.13 in T24PR cells, which harbors FBX032. In 5637PR cells, decreased nuclear FOXO1/3a expression seemed to affect FBX032 dysregulation. These results suggest the association between EMT and ubiquitin-proteasome regulation when tumors develop PR.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路上皮癌 上皮間葉転換 シスプラチン FBX032 抗がん剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

転移性尿路上皮癌における治療標準は、シスプラチン(CDDP)を基盤とした化学療法である。しかし奏功は一時的であり、その後進行する。化学療法後の再燃性尿路上皮癌に対するセカンドライン療法は限界がある。これまで我々は、尿路上皮癌における抗がん剤投与とその後の血管新生亢進を中心とした癌微小環境変化の検討を重ねてきた。その経験から、CDDP 耐性下での最適な標的分子の探索には、耐性獲得前後の癌細胞のみならず宿主自身の微小環境変化に着目した包括的治療が必要と考えた。

独自に樹立した CDDP 耐性尿路上皮癌細胞の詳細な観察では、細胞の形態変化、即ち CDDP 耐性下における上皮間葉転換(Epithelial-to-Mesenchymal transition: EMT)が示唆された。EMT は微小環境の形成・維持に深く関与し、その制御は全ての癌腫において治療標的となり得る。CDDP 治療後の EMT 誘導機構を明らかにするため施行したアレイ解析では、CDDP 治療に伴い共通して変化を来す 49 遺伝子が抽出された。この内、ユビキチン依存性蛋白分解の変化による癌微小環境への修飾作用の可能性から、ユビキチンリガーゼ(E3)である FBX032(F-box protein 3, atrogin 1/MAFbx)の CDDP 耐性尿路上皮癌細胞における発現低下に焦点を当てた。

## 2. 研究の目的

難治性である化学療法後の転移・再燃性尿路上皮癌に対する新規治療アプローチとして、抗がん剤治療が誘導する癌微小環境の変化並びにその誘導因子に着目した。樹立した 2 種の CDDP 耐性尿路上皮癌細胞株を利用したアレイ解析では、CDDP 治療に伴い共通して変化を来す 49 遺伝子(Up-regulated: 25 遺伝子、Down-regulated: 24 遺伝子)が抽出され、ユビキチン依存性蛋白分解の変化による癌微小環境への修飾作用として、ユビキチンリガーゼ FBX032 発現低下に伴う EMT 誘導が示唆さ

れた。本研究は、FBX032 発現制御・機能解析を通して、CDDP 耐性獲得過程におけるユビキチンシステム変化を介した EMT 制御機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

H26 年度：慶應義塾大学病院における上部尿路上皮癌症例を用いて、免疫組織学的に FBX032 発現並びに EMT 誘導を検討した。更に得られた染色結果を、後ろ向き生存解析に利用し、FBX032 発現レベルに応じた術後再発・癌死の有無を統計学的に検討した。*In vitro* では尿路上皮癌細胞株に対する FBX032 ノックダウン・過剰発現後の EMT・細胞浸潤能を検討した。CDDP 耐性下の FBX032 発現制御として、尿路上皮癌細胞株を用いた CGH アレイ法による遺伝子解析を行った。

H27 年度：CDDP 耐性尿路上皮癌細胞株を用いて、EMT 誘導の原因となる FBX032 下流カスケード、更には CDDP 耐性獲得下の FBX032 発現低下を制御する上流カスケードをタンパク発現レベルで検討した。また慶應義塾大学病院における膀胱癌症例を用いて、FBX032 発現及び EMT 誘導、FBX032 発現レベルに応じた術後再発・癌死を統計学的に検討し、上部尿路上皮癌症例の解析結果を検証した。

H28 年度：得られた知見の一般化を目的として、異なる尿路上皮癌細胞株を利用した FBX032 ノックダウン・過剰発現後の EMT 誘導を検討した。更に CDDP 耐性獲得機構の解明を目的として、尿路上皮癌細胞における FBX032 ノックダウン・過剰発現後の CDDP 感受性変化も検討した。尿路上皮癌におけるバイオマーカーとしての FBX032 発現を明確化する目的で、実際に CDDP が施行された治療症例に限るサブグループ生存解析を行った。

## 4. 研究成果

H26 年度：上部尿路上皮癌データベースと臨床検体( $n = 201$ )を用いた後ろ向き解析では、FBX032 低発現群における SNAIL 高発現と

E-cadherin 低発現が確認され、FBX032 発現低下を介した EMT 誘導が示唆された。更に本データベースを用いた上部尿路上皮癌の予後解析においては、上部尿路上皮癌における予後予測マーカーとしての FBX032 発現の有用性が示唆された。

CDDP 耐性尿路上皮癌細胞株 T24PR 細胞を用いた *In vitro* 解析では、FBX032 ノックダウンに伴う EMT 誘導と FBX032 過剰発現に伴う細胞浸潤能の低下が確認され、新規 EMT 制御因子 FBX032 が示唆された。また CDDP 耐性下における FBX032 発現抑制のメカニズム解明として、T24PR 細胞を用いた CGH アレイ解析を行い、CDDP 耐性株における 8 番染色体長腕領域の LOH が確認された。本領域は *FBX032* 遺伝子のコード領域であり、T24PR 細胞における染色体レベルでの FBX032 発現制御が示唆された。

H27 年度：FBX032 発現低下に伴う EMT 誘導機構として、FBX032 下流カスケード解明に焦点を当てた。FBX032 のユビキチン化基質である MyoD 発現が 2 種の CDDP 耐性尿路上皮癌細胞株で上昇しており、EMT 誘導の一因と考えられた。SiRNA 法による MyoD ノックダウンではがん浸潤能低下を認めた。また CDDP 耐性獲得下の FBX032 発現低下の調節分子として、FOXO 転写因子である FOXO1/3a の核内発現が、CDDP 耐性尿路上皮癌細胞株 5637PR では AKT リン酸化上昇に併せて低下しており、5637PR 細胞における FBX032 発現低下の原因と考えられた。

膀胱全摘術が行われた膀胱癌組織 ( $n = 94$ ) を用いた免疫組織学的染色では、FBX032 低発現群における SNAIL 高発現並びに E-cadherin 低発現が確認され、膀胱癌臨床組織において FBX032 低発現群での EMT 誘導が示唆された。本染色結果を用いた予後解析では、膀胱癌において FBX032 低発現が術後再発・癌死に関連する危険因子であり、膀胱癌における予後予測マーカーとしての有用性が示唆された。

H28 年度：前年度までに得られた知見を一般化する基礎・臨床データの集積に加えて、FBX032 発現を介した CDDP 耐性獲得機構の同定に焦点を当てた。FBX032 発現低下に伴う EMT 誘導の基礎データの集積として、ヒト尿路上皮癌細胞株 5637 への SiRNA 法による、FBX032 ノックダウンに伴う EMT 誘導を検証した。FBX032 発現低下に伴い E-cadherin 発現抑制及び SNAIL・Vimentin の発現誘導が確認され、先行研究で得られたヒト尿路上皮癌細胞株 T24 と同様の結果であった。また特異的基質である MyoD 発現も先行研究 (T24PR 細胞) と同様、5637 細胞より誘導された CDDP 耐性尿路上皮癌細胞株 5637PR 細胞で上昇が確認され、CDDP 耐性下における FBX032 発現低下による EMT 誘導機構がより一般化された。

膀胱癌臨床組織を用いた CDDP 治療前後の比較検討では、CDDP 治療後の FBX032 発現低下並びに SNAIL 高発現が免疫組織学的に確認され、CDDP 治療に伴う FBX032 発現抑制がヒト腫瘍組織で確認された。術後補助治療として CDDP が投与された膀胱癌症例による後ろ向き生存解析 ( $n = 35$ ) では、FBX032 低発現群における有意に高い術後死亡率が確認され、化学療法の感受性を予測するバイオマーカー FBX032 の可能性が示唆された。

次に、*FBX032* 遺伝子の CDDP 耐性獲得機構への関与を明らかにするため、FBX032 ノックダウン・過剰発現に伴う CDDP 感受性変化を検討した。CDDP 感受性下にある T24 細胞では FBX032 発現抑制に伴う CDDP 耐性の獲得、CDDP 耐性下にある T24PR 細胞では FBX032 発現上昇に伴う CDDP 感受性の再誘導が確認された。また FBX032 発現抑制に伴う CDDP 耐性獲得は、FBX032 ノックダウン後の 5637 細胞でも一般化された。

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 10 件)  
(1) Tanaka N, Mizuno R, Yasumizu Y, Ito K,

Shirotake S, Masunaga A, Ito Y, Miyazaki Y, Hagiwara M, Kanao K, Mikami S, Nakagawa K, Momma T, Masuda T, Asano T, Oyama M, Oya M. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with first-line and subsequent second-line targeted therapy: A proposal of the modified-IMDC risk model. *Urol Oncol* 2017; 35: 39.e19-39.e28. 査読有. DOI: 10.1016/j.urolonc.2016.10.001.

(2) Tanaka N, Kosaka T, Miyazaki Y, Mikami S, Niwa N, Otsuka Y, Minamishima YA, Mizuno R, Kikuchi E, Miyajima A, Sabe H, Okada Y, Uhlén P, Suematsu M, Oya M. Acquired platinum resistance involves epithelial to mesenchymal transition through ubiquitin ligase FBX032 dysregulation. *JCI Insight* 2016; 1: e83654. 査読有. DOI: 10.1172/jci.insight.83654.

(3) Shirotake S, Yasumizu Y, Ito K, Masunaga A, Ito Y, Miyazaki Y, Hagiwara M, Kanao K, Mikami S, Nakagawa K, Momma T, Masuda T, Asano T, Oyama M, Tanaka N, Mizuno R, Oya M. Impact of Second-Line Targeted Therapy Dose Intensity on Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2016; 14: e575-83. 査読有. DOI: 10.1016/j.clgc.2016.03.014.

(4) Tanaka N, Mizuno R, Shirotake S, Ito K, Yasumizu Y, Masunaga A, Ito Y, Miyazaki Y, Hagiwara M, Kanao K, Mikami S, Nakagawa K, Momma T, Masuda T, Asano T, Oyama M, Oya M. Effect of reclassification of the IMDC model in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with targeted therapy in the first-line and second-line settings. *Urol Oncol* 2016; 34: 293.e17-25. 査読有.

DOI: 10.1016/j.urolonc.2016.02.023.

(5) Obata J, Tanaka N, Mizuno R, Kanao K, Mikami S, Matsumoto K, Kosaka T, Kikuchi E, Jinzaki M, Oya M. Plasma fibrinogen level: an independent prognostic factor for disease-free survival and cancer-specific survival in patients with localised renal cell carcinoma. *BJU Int* 2016; 118: 598-603. 査読有.

DOI: 10.1111/bju.13414.

(6) Tanaka N, Mizuno R, Ito K, Shirotake S, Yasumizu Y, Masunaga A, Ito Y, Miyazaki Y, Hagiwara M, Kanao K, Mikami S, Nakagawa K, Momma T, Masuda T, Asano T, Oyama M, Oya M. External Validation of the MSKCC and IMDC Risk Models in Patients Treated with Targeted Therapy as a First-line and Subsequent Second-line Treatment: A Japanese Multi-institutional Study. *Eur Urol Focus* 2016; 2: 303-9. 査読有.

DOI: 10.1016/j.euf.2015.11.001.

(7) Tanaka N, Kikuchi E, Kanao K, Matsumoto K, Shirotake S, Miyazaki Y, Kobayashi H, Kaneko G, Hagiwara M, Ide H, Obata J, Hoshino K, Hayakawa N, Kosaka T, Hara S, Nakagawa K, Jinzaki M, Oya M. Impact of combined use of blood-based inflammatory markers on patients with upper tract urothelial carcinoma following radical nephroureterectomy: Proposal of a cumulative marker score as a novel predictive tool for prognosis. *Eur Urol Focus* 2015; 1: 54-63. 査読有.

DOI: 10.1016/j.euf.2015.02.001.

(8) Niwa N, Matsumoto K, Hayakawa N, Ito Y, Maeda T, Akatsuka S, Masuda T, Nakamura S, Tanaka N. Comparison of outcomes between ultrasonography and cystoscopy in the surveillance of patients with initially diagnosed TaG1-2 bladder

cancers: A matched-pair analysis. Urol Oncol 2015; 33: 386.e15-21. 査読有.

DOI: 10.1016/j.urolonc.2015.04.018.

(9) Ito Y, Kikuchi E, Tanaka N, Kosaka T, Suzuki E, Mizuno R, Shinojima T, Miyajima A, Umezawa K, Oya M. Down-regulation of NF kappa B activation is an effective therapeutic modality in acquired platinum-resistant bladder cancer. BMC Cancer 2015; 15: 324. 査読有. DOI: 10.1186/s12885-015-1315-9.

(10) Tanaka N, Kikuchi E, Kanao K, Matsumoto K, Shirotake S, Miyazaki Y, Kobayashi H, Kaneko G, Hagiwara M, Ide H, Obata J, Hoshino K, Hayakawa N, Kosaka T, Hara S, Oyama M, Momma T, Nakajima Y, Jinzaki M, Oya M. A multi-institutional validation of the prognostic value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio for upper tract urothelial carcinoma treated with radical nephroureterectomy. Ann Surg Oncol 2014; 21: 4041-8. 査読有. DOI: 10.1245/s10434-014-3830-3.

〔学会発表〕(計1件)

田中伸之, 小坂威雄, 宮崎保匡, 丹羽直也, 菊地栄次, 宮嶋哲, 大家基嗣. 尿路上皮癌における抗がん剤耐性克服とEMT制御. 第24回泌尿器科分子・細胞研究会, JPタワー(東京都・千代田区), 2015/2/28

〔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

<http://www.keio-urology.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 伸之 (TANAKA NOBUYUKI)

慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)  
研究者番号: 60445244

### (2) 研究分担者

小坂 威雄 (KOSAKA TAKEO)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号: 30445407

大家 基嗣 (OYA MOTOTSUGU)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号: 00213885

松本 一宏 (MATSUMOTO KAZUHIRO)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 80366153

丹羽 直也 (NIWA NAOYA)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 40626743