慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	オートファジー抑制による尿路上皮癌の新規治療戦略検討
Sub Title	The new strategy for urothelial carcinoma by inhibiting autophagy
Author	福本, 桂資郎(Fukumoto, Keishiro) 菊地, 栄次(Kikuchi, Eiji) 三上, 修治(Mikami, Shuji) 宮嶋, 哲(Miyajima, Akira) 大家, 基嗣(Oya, Mototsugu)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では, オートファジーに注目し, 尿路上皮癌においてこれを制御することで新たな治療戦略を見出すことを目的とした。オートファジーを制御するコノフィリンを膀胱癌細胞株に暴露したところ, 抗腫瘍効果を認めた。さらに, 既存の抗癌剤との併用効果も認め, その機序を解明するためにHSP90という蛋白に着目したところ, 既存抗癌剤によって増加したHSP90が新規薬剤と併用することによって減少した。これにより, HSP90が新規薬剤の作用機序の一端を担っていることが推測される。さらにマイクロアレイ解析を行ったところGEP97という細胞表面の蛋白も新規薬剤の作用機序にかかわっていることが示唆された。 In this study, we focused on autophagy and explored the new strategy for urothelial carcinoma by inhibiting autophagy. By using Conophylline which regulate autophagy, we could confirm anti-tumor effect. In addition, Conophylline had the synergistic effect with cisplatin. To reveal this mechanism, we focused on HSP90. HSP90 induced by cisplatin was reduced by Conophylline, and it might be the key protein for this mechanism. Furthermore, microarray assay showed GEP97 was also associated with anti-tumor effect of Conophylline.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2015～2016 課題番号：15K20107 研究分野：尿路上皮癌
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K20107seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ５ 月 ２９ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2016
課題番号：１５Ｋ２０１０７

研究課題名（和文）オートファジー抑制による尿路上皮癌の新規治療戦略検討

研究課題名（英文）The new strategy for urothelial carcinoma by inhibiting autophagy

研究代表者
福本　桂資郎（Fukumoto, Keishiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：００５９４６７３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、オートファジーに注目し、尿路上皮癌においてこれを制御することで新たな治療戦略を見出すことを目的とした。オートファジーを制御するコノフィリンを膀胱癌細胞株に暴露したところ、抗腫瘍効果を認めた。さらに、既存の抗癌剤との併用効果も認め、その機序を解明するためにHSP90という蛋白に着目したところ、既存抗癌剤によって増加したHSP90が新規薬剤と併用することによって減少した。これにより、HSP90が新規薬剤の作用機序の一端を担っていることが推測される。さらにマイクロアレイ解析を行ったところGEP97という細胞表面の蛋白も新規薬剤の作用機序にかかわっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on autophagy and explored the new strategy for urothelial carcinoma by inhibiting autophagy. By using Conophylline which regulate autophagy, we could confirm anti-tumor effect. In addition, Conophylline had the synergistic effect with cisplatin. To reveal this mechanism, we focused on HSP90. HSP90 induced by cisplatin was reduced by Conophylline, and it might be the key protein for this mechanism. Furthermore, microarray assay showed GEP97 was also associated with anti-tumor effect of Conophylline.

研究分野：尿路上皮癌

キーワード：オートファジー　尿路上皮癌　PD-1　Tumor Budding　HSP90

１．研究開始当初の背景

オートファジーとは「リソソームを分解の場とする、細胞質成分の分解機構」の総称であり、酵母をモデルとしたオートファジー関連遺伝子（Atg 遺伝子）群の発見を契機に、この 10 年あまりでオートファジーの研究は飛躍的に進展した。オートファジーには①マクロオートファジー②ミクロオートファジー③シャペロン介在型オートファジーの３種類が存在するが、最もよく研究されているのは①マクロオートファジーであり、このタイプでは、細胞質の一部が隔離膜によって取り囲まれ、直径約１μｍのオートファゴソームが形成される。これにリソソームが融合すると、オートファゴソームの内容物が分解される。オートファジーは低酸素環境下により活性化するため、細胞増殖が活発な癌組織においても亢進していると考えられる [1]。近年、オートファジーが癌細胞の抗癌剤耐性獲得に関与しているとする報告が多くなされ、オートファジーを制御することで癌治療に応用しようとする試みがなされている [2]。中でも、抗マラリア薬である CQ (chloroquine)、HCQ(hydroxychloroquine)はオートファジーを抑制することで抗癌剤感受性を亢進させる可能性が示唆されている [3]。

２．研究の目的

筋層非浸潤性膀胱癌に対しては経尿道的膀胱腫瘍切除術(TUR-BT)が第一選択となるが、多くの症例で再発を来たし、進行癌に進展するものも少なくない。再発予防として BCG や抗癌剤の膀胱内注入療法が広く施行されているが、依然として再発や進展を認める症例が多い。早い段階での膀胱全摘除術に関しては、患者の QOL を考慮すると判断に悩ましく、泌尿器科領域における重要な Clinical question の一つである。また、BCG 膀胱内注入療法においては、誘導される免疫反応により、高頻度に排尿困難、血尿、発熱等の強い副作用を認め、時に治療継続が困難となる。一方、転移を伴う尿路上皮癌に対する治療方法としては CDDP(Cisplatin)を含む多剤併用化学療法による治療が一般的であり、一定の奏効率を有するものの、最終的には治療抵抗性となり癌死に至る。これらの問題点を解決するためにオートファジーに着目し、オートファジーを制御することで尿路上皮癌に対する既存の化学療法や膀胱内注入療法の効果を増強することを研究の目的とした。

３．研究の方法

(1)臨床データ及び未染病理プレパラートを用いた免疫染色法によるオートファジー発現の確認、その他予後規定因子の検討

当院にて保管されている尿路上皮癌の未染プレパラートを LC3（Abgent, AP1805a）にて染色し、オートファジーに特徴的な染色様式である Stone like structure（図 1）[4]を確認、筋層非浸潤性膀胱癌の臨床的予後との関係を検討する。また、近年、大腸がんにおいてオートファジー抑制によって PD-1(Programmed cell death-1)陽性免疫細胞が減少すると報告されており [5]、PD-1(AF1086, R&D Systems)、さらには大腸がんの予後規定因子である Tumor Budding[6] についても評価を行う。

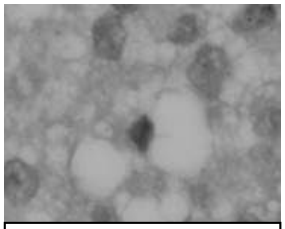

図 1：LC3 免疫染色標本。矢印部が Stone like structure。

(2)膀胱癌細胞株における抗癌剤(CDDP)およびオートファジー制御因子の治療効果検討

①WST assay による抗腫瘍効果の検討

我々は、オートファジーを制御する植物由来の薬剤、コノフィリン [7]を入手。当教室が保有しているヒト膀胱癌細胞株(T24、5637)に暴露させ、コノフィリンの抗腫瘍効果、CDDP との併用効果に関して検討を行う。

②マイクロアレイ、Western blot による関連タンパクの検討

ヒト膀胱癌細胞株にコノフィリン、CDDP を暴露させ、タンパクを回収、マイクロアレイや Western blot によって関連タンパクを同定する。

４．研究成果

(1) 臨床データ及び未染病理プレパラートを用いた免疫染色法によるオートファジー発現の確認、その他予後規定因子の検討

①LC3 による免疫染色

オートファジー関連タンパクである LC3 に対する抗体を用い、免疫染色を行った。当初予定では、LC3 免疫染色における特徴的な染色様式である、stone like structure と予後の関係を検討する予定であった。病理専門医と検討を行ったところ、非特異的な免染様式であり、検討が困難であることが判明、断念した。

②PD-1 による免疫染色

大腸がんにおいて、オートファジー抑制によって PD-1 陽性免疫細胞が減少すると報告されており、臨床検体を用いた膀胱癌における PD-1 発現の意義を検討した。BCG 注入療法を行い、再発をきたした症例を集積し、PD-1 による免疫染色を行った。腫瘍に浸潤した PD-1 陽性炎症細胞をカウントしたところ、BCG 注入によって PD-1 陽性細胞数の増加(図 2)を認めた。また、BCG 後、再発時の PD-1 陽性細胞とその後の病期進展は有意な相関を認めた。オートファジーの抑制や PD-1 阻害は BCG 注入療法を行う膀胱癌の予後を改善させる可能性が示唆された。

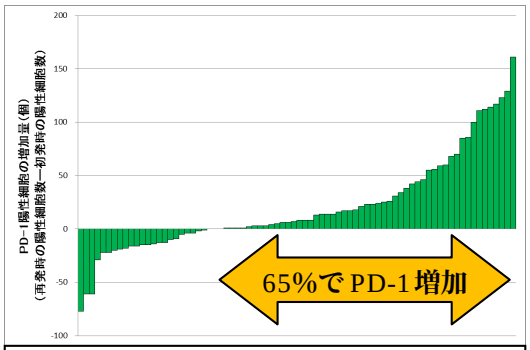

図 2：BCG 治療前後の PD-1 陽性細胞数の変化

③Tumor Budding の評価

②に関連し、大腸がんの予後予測因子である Tumor Budding に関しても、膀胱癌における検討を行った。Tumor Budding は「癌発育先進部間質に浸潤性に存在する単個または 5 個未満の構成細胞からなる癌胞巣」と定義され、粘膜下層への浸潤様式を定量的に評価する手法である。経尿道的に切除した膀胱癌の Tumor Budding と予後の関係を評価したところ、Tumor Budding 陽性症例は術後の病期進展のリスクが有意に高かった。経尿道的治療後、病期進展が強く予測される症例には膀胱全摘除が推奨されるが、すべての症例に膀胱全摘除を行うことは過剰医療につながる。Tumor Budding は膀胱全摘除が必要な症例の選択に有用である可能性が示唆された。

(2) 膀胱癌細胞株における抗癌剤(CDDP)およびオートファジー制御因子の治療効果検討

①WST assay による抗腫瘍効果の検討

オートファジーを制御するコノフィリンを入手し、膀胱癌細胞株(T24, 5637)に対する抗腫瘍効果を検討した。図 3 のごとく、コノフィリンは 5637, T24 のどちらに対しても抗腫瘍効果を認め、また、5637 に対する抗腫瘍効果のほうが高い傾向を認めた。次に、既存の抗癌剤である CDDP との併用効果について検討した。CDDP は 5637 においては 1μM より、また、T24 においては 5μM より抗腫瘍効果を認めた。5637 では、コノフィリン存在下において CDDP0.01 μM より抗腫瘍効果を認めた。先述の CDDP 単剤に比較して低濃度においても抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆される。一方、T24 においてはコノフィリンの存在下においても CDDP の抗腫瘍効果は変化を認めなかった。コノフィリンは膀胱癌に対する抗腫瘍効果が期待できるうえに、腫瘍細胞によっては既存抗癌剤との併用効果の可能性が示唆された。戦術の通り、コノフィリンは植物由来の成分であり、抗癌剤に比較して高い安全性が期待され、副作用の強い既存抗癌剤とは違った治療戦略の確立が期待される。

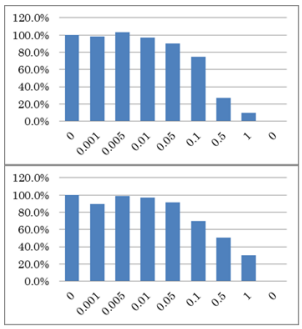

図 3：5637(上)、T24(下)に対するコノフィリンの抗腫瘍効果(横軸は濃度μg/ml)

②マイクロアレイ、Western blot による関連タンパクの検討

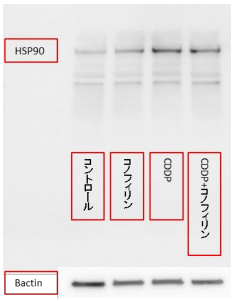

図 4：コノフィリン・CDDP 暴露による HSP90 の変化

コノフィリンが抗腫瘍効果をもたらす機序を解明するために HSP90 (Heat shock protein 90)に着目した。HSP90 は膀胱癌において発現の上昇を認め、Anti-apoptotic pathway, tumor growth, metastasis に関与している [8]。5637 を①コントロール、②コノフィリン、③CDDP、④コノフィリン+CDDP の 4 群に分け、HSP90 の発現を検討した（図 4）。コノフィリン単剤では HSP90 の発現に大きな影響を与えていない。一方、CDDP によって発現が亢進した HSP90 がコノフィリンの併用によって発現の低下を認めた。コノフィリンが単独での腫瘍効果だけでなく、既存抗癌剤との併用効果がある機序には HSP90 が関与している可能性がある。

他に、コノフィリンの抗腫瘍効果に関連しているタンパクを検索するために、マイクロアレイを施行した。T24、5637 に対してコノフィリン投与群、非投与群を作成、マイクロアレイによって変動しているタンパクの同定を行った。変動したタンパクの一つに GPR87(G Protein-Coupled Receptor 87)を認めた。GPR87 は細胞表面に発現する receptor であり、膀胱癌の増殖・転移・抗癌剤耐性にかかわっている [9]。マイクロアレイ解析によると、T24、5637、ともにコノフィリンの投与によって GRP87 の発現低下を認めた。今後、当タンパクに着目した検討を行う予定である。

(3)研究成果の総括及び今後の展望

臨床検体を用いた検討において、オートファジー関連タンパクと予後の検討においては結果を出すことに失敗したもの、PD-1 および Tumor Budding に関する検討では予後との関係を認めた。膀胱癌治療戦略においては、「過剰医療にならない範囲で、予後不良な症例に対して早めに追加治療を行う」という判断が求められる。その点、当検討の結果は今後の膀胱癌に対する治療方法の選択において一助となると考える。

一方、膀胱癌細胞株を用いた検討では、コノフィリンを用いたオートファジー制御による抗腫瘍効果を認めた。先述の通り、コノフィリンは植物由来の成分であり、既存の抗癌剤に比較して副作用が少ない可能性が高

い。臨床応用されれば、比較的安価・安全に導入される可能性が高く、再発・進展を抑制することで、再手術による医療コスト増大やQOL 低下といった社会的損失を防ぐことに寄与すると思われる。

今回の検討ではいまだに解明されていないことも多い。

今後は

①関連タンパク解明による機序の検討

②マウスなどを用いた in vivo の検討でも抗腫瘍効果をもたらすか。

これらに着目し、最終的にはコノフィリンの臨床的応用を目指すことを今後の展望とする。

＜引用文献＞

1. Pyo, J. O., Nah, J., Jung, Y. K.: Molecules and their functions in autophagy. Exp Mol Med, 44: 73, 2012
2. Amaravadi, R. K., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X. M. et al.: Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. Clin Cancer Res, 17: 654, 2011
3. Amaravadi, R. K.: PUMA: a puzzle piece in chloroquine's antimelanoma activity. J Invest Dermatol, 133: 2133, 2013
4. Sivridis, E., Koukourakis, M. I., Mendrinos, S. E. et al.: Patterns of autophagy in urothelial cell carcinomas--the significance of "stone-like" structures (SLS) in transurethral resection biopsies. Urol Oncol, 31: 1254, 2013
5. Patel, S., Hurez, V., Nawrocki, S. T. et al.: Vorinostat and hydroxychloroquine improve immunity and inhibit autophagy in metastatic colorectal cancer. Oncotarget, 7: 59087, 2016
6. Ueno, H., Murphy, J., Jass, J. R. et al.: Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. Histopathology, 40: 127, 2002
7. Sasazawa, Y., Sato, N., Umezawa, K. et al.: Conophylline protects cells in cellular models of neurodegenerative diseases by inducing mammalian target of rapamycin (mTOR)-independent autophagy. J Biol Chem, 290: 6168, 2015
8. Chehab, M., Caza, T., Skotnicki, K. et al.: Targeting Hsp90 in urothelial carcinoma. Oncotarget, 6: 8454, 2015
9. Zhang, X., Liu, D., Hayashida, Y. et al.: G Protein-Coupled Receptor 87 (GPR87) Promotes Cell Proliferation in Human Bladder Cancer Cells. Int J Mol Sci, 16: 24319, 2015

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１件）

①Fukumoto K, Kikuchi E, Mikami S, Ogihara K, Matsumoto K, Miyajima A, Oya M. Tumor budding, a novel prognostic indicator for predicting stage progression in T1 bladder cancers. Cancer science. 2016;107(9):1338-44.
doi: 10.1111/cas.12990.（査読あり）

〔学会発表〕（計３件）

① Keishiro Fukumoto et al.: “Tumor budding”, a novel prognostic indicator for predicting stage progression in T1 bladder tumors. 14th Urological Association of Asia Congress 2016. Best of the Best Abstracts in Asia. 2016/7/21. Singapore (Singapore)

②福本桂資郎　他. BCG 注入療法を施行した筋層非浸潤性膀胱癌における PD-1 発現の臨床的意義. 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会. 2016 年 5 月 31 日. 別府国際コンベンションセンター（大分県・別府市）.

③福本桂資郎　他. ”Tumor Budding”、T1 筋層非浸潤性膀胱癌における新たな病理学的予後予測因子. 第 104 回日本泌尿器科学会総会. 2016 年 4 月 23 日. 仙台国際センター（宮城県・仙台市）.

６．研究組織

(1)研究代表者

福本　桂資郎（Fukumoto, Keishiro）
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教
研究者番号：00594673

(2)研究協力者

菊地　栄次（Kikuchi, Eiji）
三上　修治（Mikami, Shuji）
宮嶋　哲（Miyajima, Akira）
大家　基嗣（Oya, Mototsugu）