HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 尿路上皮癌における抗がん剤治療がもたらす腫瘍血管の耐性獲得［論文内容及び審査の要旨］ |
| Author(s) | 菊地, 央 |
| Description | 配架番号：2374 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(医学) |
| Dissertation Number | 甲第12995号 |
| Issue Date | 2018-03-22 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/70395 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Hiroshi_Kikuchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨 |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医 学）　氏 名　菊地　央

学 位 論 文 題 名

# 尿路上皮癌における抗がん剤治療がもたらす腫瘍血管の耐性獲得

(Chemotherapy-induced resistance in tumor endothelial cells of urothelial carcinoma)

【背景と目的】　尿路上皮癌は尿路（腎盂，尿管，膀胱，尿道）に発生する癌である．進行癌に対しては集学的治療が必要となり，筋層浸潤性膀胱癌の根治治療では，一般的にシスプラチンベースの多剤併用による術前化学療法後に膀胱全摘を行う．しかし，根治治療を行った場合でも再発率は40%ほどであり，また再発症例の予後は不良である．手術不能な局所進行例や転移症例には抗がん剤による全身治療が行われるが，通常はゲムシタビン/シスプラチンによる化学療法が第一選択となる．しかし，ほとんどの症例は1次化学療法に抵抗性となり，タキサンなどを含む2次化学療法が行われるが，治療効果は乏しい．このように薬剤耐性は尿路上皮癌の予後不良の大きな要因となっており，その克服は治療上重要な課題のひとつである．一般的に抗がん剤への耐性獲得要因として，腫瘍細胞による耐性獲得やがん幹細胞の存在があげられる．薬剤耐性獲得の分子メカニズムとして，薬剤排出トランスポーターの発現亢進などといった，腫瘍細胞の形質変化が知られている．一方で，近年では間質ががんの悪性化，抗がん剤耐性に関わることが報告されている．腫瘍血管の内腔を裏打ちする腫瘍血管内皮細胞もがん間質細胞のひとつである．我々の研究室では，血管内皮細胞が遺伝学的に安定で均一な細胞集団であるというこれまでの概念に反して染色体異常や幹細胞性があることを報告してきた．また腫瘍血管内皮細胞は，薬剤トランスポーターのMDR1/ABCB1 発現が高く，その排出基質であるパクリタキセルなどの抗がん剤に対して耐性を示すことを見出した．さらに，ABCB1 阻害剤併用によりパクリタキセルに対する薬剤耐性がキャンセルされ，メラノーマ担癌マウスにおいて血管新生阻害効果ならびに抗腫瘍効果の増強がもたらされることを報告した．しかし，ヒト尿路上皮癌腫瘍血管内皮細胞における薬剤耐性獲得の有無，ならびにそのメカニズムについては不明である．

本研究では，新たな薬剤耐性克服戦略の構築を視野にいれ，ヒト腫瘍血管内皮細胞の耐性獲得の分子機構を明らかにすることを目的とした．ヒト尿路上皮癌臨床検体を用いて，抗がん剤治療による腫瘍血管内皮細胞の薬剤トランスポーターABCB1 の発現変化を解析した．さらに，抗がん剤による腫瘍血管内細胞の ABCB1 発現変化のメカニズムを解析し，尿路上皮癌治療における ABCB1 阻害剤併用の有用性を検討した．

【材料と方法】　北海道大学病院および関連施設において 1 次化学療法が施行された 66 例の尿路上皮癌を対象とし，化学療法前後の手術摘出組織標本を用いて免疫染色を行った．ABCB1 陽性血管の割合により腫瘍血管 ABCB1 発現を評価し，Kaplan-Meier 法により全生存率との関連を解析した．続いて抗癌剤による腫瘍微小環境の変化が血管内皮に与える影響

を *in vitro, in vivo* 実験にて解析した．*In vitro* においてゲムシタビン，シスプラチン処理によりヒト膀胱癌細胞 (UMUC3) において分泌されるサイトカインがヒト血管内皮細胞 (HMVEC) の MDR1 mRNA 発現レベルに与える影響を qRT-PCR で評価した．*In vivo* においては，膀胱癌 UMUC3 担癌マウスに抗がん剤を投与し，腫瘍組織，腫瘍血管内皮細胞の変化を qRT-PCR，免疫染色，ELISA で評価した．*In vivo* における ABCB1 阻害実験は，Luc2 遺伝子発現 UMUC3 をマウスに皮下移植し，パクリタキセルと ABCB1 阻害剤ベラパミルの併用治療を行った．抗腫瘍効果を腫瘍体積により評価し，血管新生阻害効果を血管におけるアポトーシスとして Cleaved Caspase 3 免疫染色により評価した．IVIS を用いた in vivo イメージング解析および，肺組織における Luc2 遺伝子の発現解析により肺転移を評価した．

【結果】 1 次化学療法前・後の腫瘍血管における ABCB1 陽性率はそれぞれ 0.00-16.27% (中央値 0.38%)，0.00-58.84% (中央値 2.47%) であり，化学療法後に ABCB1 陽性血管の割合が有意に増加した ($p<0.0001$)．さらに，化学療法後の腫瘍血管 ABCB1 高発現群は，低発現群と比較して全生存期間が有意に短かった ($p=0.0168$)．ゲムシタビン，シスプラチンにより UMUC3 細胞の炎症性サイトカイン IL-8 mRNA 発現が亢進した．IL-8 処理により HMVEC の MDR1 mRNA 発現が亢進し，抗がん剤処理後の UMUC3 培養上清に IL-8 中和抗体を添加することで HMVEC の MDR1 mRNA 発現レベルが低下した．*in vivo* においても同様にゲムシタビン，シスプラチンにより UMUC3 腫瘍組織の IL-8 発現レベルが上昇し，血中の IL-8 レベルも上昇した．また，抗がん剤投与により UMUC3 腫瘍内の腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 発現レベルが上昇した．一方で，IL-8 ノックダウン UMUC3 腫瘍ではコントロール腫瘍に比べ，抗がん剤処理後の腫瘍血管内皮細胞 ABCB1 発現は低下した．さらに膀胱癌担癌マウスに一次治療としてゲムシタビン/シスプラチン投与後，2 次治療としてパクリタキセルと ABCB1 阻害剤ベラパミルを併用投与すると，腫瘍増大率の減少，腫瘍血管内皮細胞のアポトーシスの増加がもたらされた．さらに，ベラパミル併用により肺のルシフェラーゼ活性の減少，ならびに肺組織の Luc2 遺伝子の発現レベルの低下傾向が認められた．

【考察】 本研究では抗がん剤治療により尿路上皮癌内の腫瘍血管内皮細胞における薬剤排出トランスポーターABCB1 の発現が亢進することが示された．そのメカニズムとして，ゲムシタビンとシスプラチン投与による腫瘍細胞からの IL-8 分泌増加が関与していた．さらに腫瘍血管内皮細胞における ABCB1 発現は尿路上皮癌の予後と相関し，抗がん剤耐性獲得に寄与している可能性が示唆された．パクリタキセルを用いた尿路上皮癌二次化学療法において，ABCB1 阻害剤の併用により血管新生阻害効果を伴う抗腫瘍効果と転移抑制効果がもたらされた．今後さらなる検討が必要ではあるが，腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 を標的とする治療は，尿路上皮癌臨床における問題点である耐性を克服する一つの方法になりうることが示唆された．

【結論】 抗がん剤治療による尿路上皮癌腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 発現亢進が抗がん剤耐性に寄与している可能性が示唆された．腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 を標的とした治療は従来の抗がん剤治療の効果を高め，アトラクティブな治療戦略となる可能性があると考えられた．